

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Potensi sponsa di perairan laut Indonesia

Indonesia dikenal sebagai pusat keberagaman (*center of biodiversity*) mempunyai perairan yang sangat kaya akan keanekaragaman biota laut (Wallace, 2000) diantaranya adalah sponsa. Jumlah dan penyebaran sponsa sangat beragam. Sekitar 7000 jenis sponsa telah dipublikasi, tetapi berdasarkan perkiraan sekitar 15.000 spesies hidup di perairan laut dan danau (Hooper, 2000). Menurut Collin and Arneson (1995) terdapat lebih dari 1000 spesies sponsa hidup tersebar di wilayah perairan Indonesia. Kekayaan tersebut merupakan salah satu aset penting yang perlu dilindungi dan dilestarikan. Namun akibat kurang sadarnya sebagian besar masyarakat dan pihak tertentu terhadap lingkungan laut seperti pengeboman, penggunaan jaring pukat harimau, penyetruman, penggunaan bahan kimia, dan aktifitas perindustrian yang cenderung merusak lingkungan, tidak sebanding dengan hasil yang didapat terhadap kerusakan lingkungan yang telah ditimbulkan dalam jangka waktu yang lama.

Tingkat kerusakan yang parah akan menyebabkan terganggunya habitat kehidupan sponsa di dasar perairan. Hal inilah yang menjadi salah satu tujuan para peneliti dalam dan luar negeri untuk dapat melakukan inventarisasi keragaman, distribusi, kelimpahan dan juga kandungan metabolit sekunder tiap

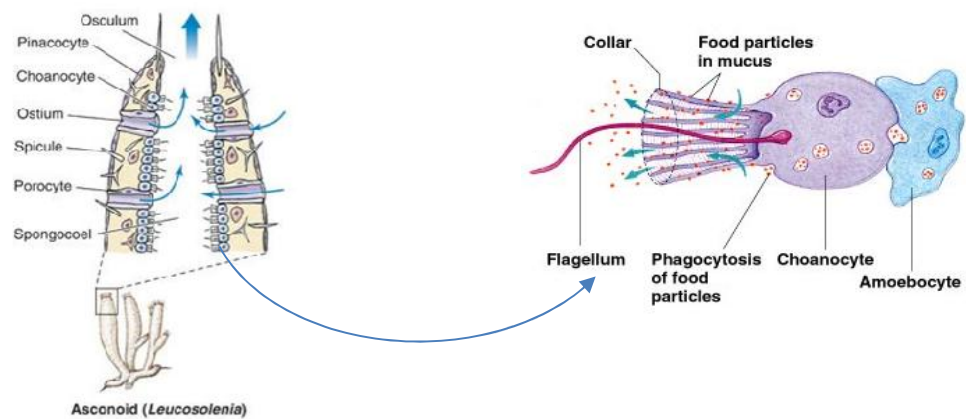
jenis sponsa yang ada sebelum terjadi kepunahan. Hasil dari penelitian yang dilakukan diharapkan dapat digunakan untuk membantu perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta memanfaatkannya untuk kepentingan dunia kedokteran dalam menangani kasus suatu penyakit.

2.1.1. Sponga

Sponga merupakan biota laut multiseluler primitif sederhana yang bersifat *filter feeder*, menghisap air dan bahan-bahan lain disekelilingnya melalui pori-pori (*ostia/ostium*) kemudian dialirkan ke seluruh bagian tubuhnya melalui saluran (*canal*) dan dikeluarkan melalui pori-pori yang terbuka (*ostula/osculum*). Sponga termasuk hewan laut dalam filum porifera yang berarti memiliki pori-pori dan saluran (Romimohtarto dan Juwana, 2001; Cetkovic dan Lada, 2003). Struktur tubuh sponsa secara umum terdiri dari 3 lapisan yaitu *pinacocytes*, *choanocytes*, dan *mesohyl*. *Pinacocyte* merupakan lapisan sel di bagian luar tubuh sponsa, *choanocyte* (dalam bahasa Yunani = *choane*: cerobong, *kytos* = berongga) adalah lapisan sel bagian dalam yang merupakan sel berflagellum (memiliki ekor). *Choanocyte* inilah yang mengatur masuknya air ke dalam tubuh sponsa. *Choanocyte* memiliki *collar* (semacam rambut/serabut) yang letaknya di sekitar flagellum, fungsinya adalah untuk menangkap sumber makanan yang diambil dari air yang dilewatkan.

Jaringan antara *pinacocyte* dan *coanocyte* merupakan lapisan gelatin yang disebut *mesohyl*. Di dalam *mesohyl* ini terdapat *amoebid cell* yaitu sel yang dapat bergerak bebas dalam lapisan *mesohyl* karena tidak terikat pada tempat

tertentu. Selain itu juga terdapat *spicule*/spikula, yaitu suatu struktur berupa kristal yang terbentuk secara spesifik oleh spesies tertentu sehingga biasa dijadikan dasar untuk proses identifikasi (taksonomi). Spikula terbentuk dari garam-garam karbonat maupun silikat. Strukturnya ada yang berupa *aragonite*, *calcite*, atau *spongin*.



Gambar 1. Bentuk dan struktur dinding tubuh sponga (Miller *and* Harley, 2001)

Berdasarkan bahan penyusun rangkanya (Müller, 2003), sponga diklasifikasikan menjadi tiga kelas, yaitu *Hexactinellida* atau *Hyalospongiae*, *Demospongiae*, dan *Calcarea* (*Calcispongiae*).

a. *Hexactinellida* (*Hyalospongiae*)

Hexactinellida (dalam bahasa Yunani, *hexa* = enam) atau *Hyalospongiae* (dalam bahasa Yunani, *hyalo* = kaca/transparan, *spongia* = sponga) memiliki spikula yang tersusun dari silikat dan biasanya memiliki 6 cabang hingga struktur yang kompleks dan tersusun secara simetris (biasanya ortogonal). *Hexactinellida* biasa disebut sebagai “*glass sponge*”. Spikulanya terkadang bersatu dengan struktur jaringan sehingga membentuk jalinan yang rumit

seperti ring basket, selain itu ada juga yang berbentuk mangkuk atau vas bunga. Kelompok ini memiliki tipe saluran air sikonoid dan dapat ditemukan di kedalaman 450-900m di perairan tropis (Samudra India Barat atau daerah timur Pasifik). Tapi ada juga yang bisa hidup pada kedalaman 5000 m. Contoh kelas ini adalah *Euplectella* sp. (Venus flower-basket) dan *Oopsacas minuta*.



a



b

Gambar 2. (a) Spongia *Euplectella* sp. dan (b) spongia *Oopsacas minuta* (<http://www.bumblebee.org>).

b. *Demospongiae*

Demospongiae, terkadang ada yang menyebutnya dengan *Demospongia*, atau *Demospongea* (dalam bahasa Yunani, *demo* = tebal, *spongia* = sponsa) memiliki rangka yang tersusun dari serabut spongin atau silikat atau keduanya. Tubuhnya berwarna cerah karena mengandung pigmen yang terdapat pada amoebosit dengan spikula berbentuk jarum atau bercabang 4. Bentuk tubuhnya tidak beraturan dan bercabang. Tinggi dan diameternya ada yang mencapai lebih dari 1 meter. Seluruh *Demospongiae* memiliki saluran air tipe leukonoid. Habitat *Demospongiae* umumnya di laut dalam maupun dangkal, meskipun ada yang di air tawar. *Demospongiae* adalah satu-satunya

kelompok porifera yang anggotanya ada yang hidup di air tawar.

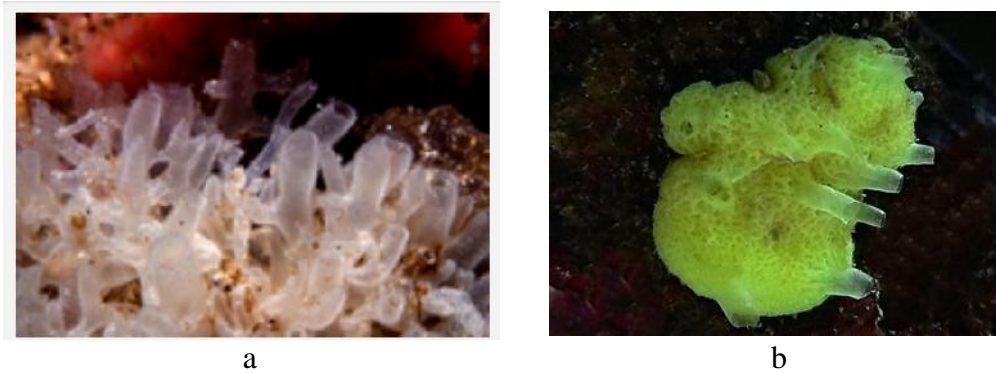
Demospongiae merupakan kelas terbesar yang mencakup 90% dari seluruh jenis porifera. Contoh *Demospongiae* adalah *spongia* sp. dan *Xestospongia testudinaria*.



Gambar 3. (a) Sponga *Spongia* sp. dan (b) sponga *Xestospongia testudinaria* (<http://www.bumblebee.org>).

c. *Calcarea* (*Calcisspongiae*)

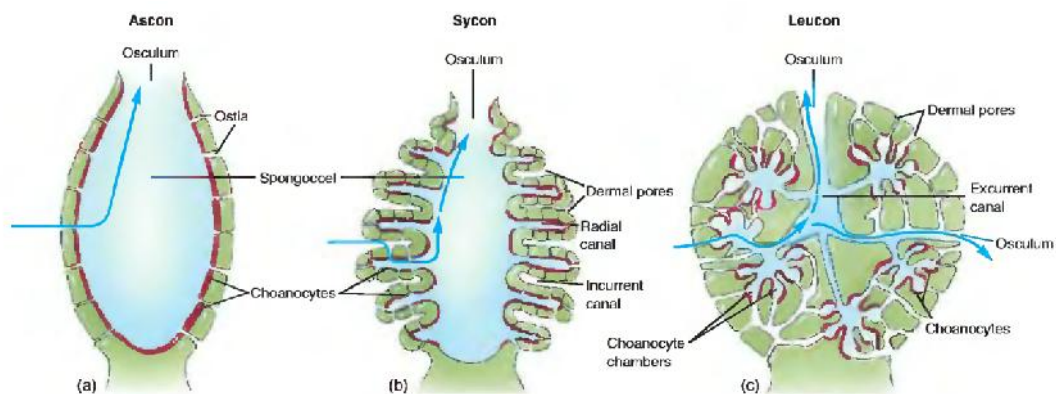
Calcarea (dalam latin, *calcare* = kapur) atau *Calcisspongiae* (dalam latin, *calci* = kapur, *spongia* = sponsa) memiliki rangka yang tersusun dari kalsium karbonat (CaCO_3) dan spikulanya berbentuk jarum tajam dan bercabang 3 atau 4. Tubuhnya kebanyakan berwarna pucat dengan bentuk seperti vas bunga, dompet, kendi, atau silinder. Tinggi tubuh kurang dari 10 cm. Struktur tubuh ada yang memiliki saluran air askonoid, sikonoid, atau leukonoid. Contoh dari kelompok ini adalah *Leucosolenia eleanor* dan *Clathrina*.



Gambar 4. (a) Sponga *Leucosolenia eleanor* dan (b) sponga *Clathrina athrustudinaria* (<http://www.bumblebee.org>).

Beberapa tipe saluran air dalam tubuh sponga :

- 1) Tipe Askon : sistem saluran air yang paling sederhana, secara berurutan terdiri atas ostia, spongiosel dan oskulum. Contohnya: *Leucosolenia* dan *Clatharina blanca*.
- 2) Tipe Sikon : saluran airnya meliputi ostia, saluran radial yang tidak bercabang, spongiosel dan oskulum. Lubang-lubang ostiumnya dihubungkan dengan saluran yang bercabang-cabang ke rongga-rongga yang berhubungan langsung dengan spongosol. Contohnya : *Pheronema* sp., *Schypa*, dan *Sycon gelatinosum*.
- 3) Tipe Leukon (ragon) : tipe ini adalah tipe yang paling kompleks/tipe terumit. Salurannya terdiri atas ostia, saluran radial yang bercabang-cabang, spongiosel, dan oskulum. Contohnya: *Euspongia officinalis* dan *Euspongia mollissima* (Amir, 1996).



Gambar 5. Tipe saluran air dalam tubuh sponga; (a) askon, (b) sikon, (c) leukon (Miller *and* Harley, 2001).

Pada umumnya sponga hidup menempel pada karang atau batuan, hidup di laut hingga ke dalaman sekitar 8000 meter. Sebagian besar sponga ($\pm 50\%$) bersifat toksik terhadap ikan, sehingga ikan bukan merupakan predator utama bagi sponga.

Karakteristik dari ekologi suatu jenis sponga dapat memungkinkan ditemukannya senyawa yang unik dan menarik dari sponga. Menurut Ahmadi (2010), salah satu karakteristik tersebut dapat dilihat berdasarkan pada habitatnya, yang dikategorikan menjadi :

- a. Habitat terbuka pada air tenang, dimana sponga tumbuh diantara alga, koral dan organisme lunak halus lainnya, yang tidak terlindung dari cahaya matahari, ikan dan predator lain. Sponga pada habitat ini memiliki perlindungan (senyawa beracun, pigmen dan spikula) terhadap serangan sinar UV seperti yang ditemukan pada cyanobakteria yang dapat menyerap sinar UV (pigmen) yang jarang dimiliki oleh organisme lain dan radiasi di sekitar air laut. Untuk melindungi dari serangan kompetitor dan predator,

sponga dapat menggunakan spikula atau senyawa beracun yang dimiliki oleh sponsa tersebut. Senyawa tersebut dapat digunakan untuk melindungi dari radiasi disekitar air laut serta predator.

- b. Habitat perairan dalam. Di habitat ini, sponsa tumbuh diantara koral dan organisme sessile keras lainnya, tetapi tidak mendapatkan sinar matahari dan terhindar dari jangkauan predator. Untuk pertahanan diri dari serangan kompetitor seperti koral dan sponsa lain, sponsa mengeluarkan senyawa beracun atau senyawa antipredator untuk melindungi diri dari kompetitor. Literatur belum menyebutkan secara jelas baik kualitatif ataupun kuantitatif apakah senyawa yang terkandung dalam sponsa untuk spesies yang sama dan yang hidup di perairan dalam.
- c. Habitat yang tersembunyi, dalam gua, di bawah bebatuan, terhindar dari jangkauan sinar matahari dan terlindung dari kompetitor dan predator lain. Sponga yang hidup di habitat ini hanya memiliki sedikit senyawa racun.

Hampir semua jenis biota laut tidak terkecuali sponsa, menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder yang merupakan hasil metabolisme dalam tubuh organisme. Senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari tubuh sponsa umumnya bersifat bioaktif dan memiliki aktivitas farmakologik yang cukup besar. Hal ini terbukti dari 6000 substansi senyawa bioaktif (*lead compound*) yang berhasil diisolasi dari biota laut dalam tiga dekade terakhir, 40% diantaranya berasal dari sponsa (Ireland *et al.*, 1993 ; Kobayashi dan Rachmaniar, 1999).

Berdasarkan dari sifat ekologi hidup sponsa, potensi ditemukannya senyawa metabolit sekunder sponsa lebih banyak pada lingkungan perairan dangkal

atau terbuka dikarenakan interaksi sponsa terhadap lingkungan dan predatornya sangat sering terjadi. Interaksi ini mengakibatkan sponsa lebih banyak dan beragam dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk pertahanan hidupnya.

2.1.2. Keragaman senyawa metabolit sekunder sponsa

Sponsa merupakan salah satu biota laut yang berpotensi memiliki banyak kandungan senyawa metabolit sekunder. Senyawa ini dihasilkan oleh tubuh sponsa yang digunakan dalam sistem pertahanan diri, yaitu untuk mempertahankan hidup dan menghindari gangguan dari organisme lain di sekitar lingkungan hidupnya. Pada setiap kondisi lingkungan berbeda beberapa jenis sponsa menghasilkan senyawa metabolit yang berbeda pula. Semula senyawa metabolit sekunder dianggap hanyalah produk buangan dari setiap biota yang merupakan sisa proses metabolisme, namun dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi peranan senyawa metabolit sekunder (*natural product*) mulai terungkap dan ternyata mempunyai manfaat yang sangat penting dan luas baik untuk dirinya sendiri maupun untuk lingkungannya (Rachmaniar, 2007). Manfaat untuk biotanya sendiri misalnya sebagai *chemical defense* untuk melindungi dirinya terhadap serangan predator, sebagai mediator dalam berkompetisi, antifouling, sebagai fasilitator reproduksi, melindungi dari radiasi ultra violet, melindungi diri dari keadaan lingkungan yang buruk seperti ombak, angin dan kondisi buruk lainnya. Manfaat senyawa metabolit bagi manusia adalah sebagai sumber potensial substansi senyawa bioaktif yang berguna untuk bahan pembuatan obat – obatan, bahan makanan, kesehatan dan kosmetik (Rachmaniar, 2007).

Beberapa senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari sponsa asal Indonesia dan telah diuji sifat bioaktifitasnya antara lain senyawa halicyclamine A (Gamabar 9 [24]) yang diisolasi dari sponsa *haliclona* sp. dengan struktur macrocyclic alkaloid unik yang diketahui mempunyai aktifitas sebagai anti-dorman *Mycobacterium smegmatis* (Arai *et al.*, 2011), senyawa lebehsterols A dan B (Gambar 6 [5-6]) yang diisolasi dari sponsa *Petrosia strongylata* dengan struktur kerangka dasar steroid dan diketahui mempunyai aktifitas untuk menghambat pembentukan enzim thymidine phosphorylase (TP) di dalam sel yang merupakan salah satu penyebab penyakit kanker (Aoki, 2002), senyawa bitungolides A-G (Gambar 8 [14-19]) dan pironetin (Gambar 8 [20]) diisolasi dari sponsa *Theonella cf. Swinhoei*. Senyawa ini merupakan golongan poliketida siklik yang diketahui secara *in vitro* menunjukkan aktifitas menghambat pembentukan protein phosphatase tipe 2A (PP2A) dari sel darah merah manusia (Sirirath *et al.*, 2002).

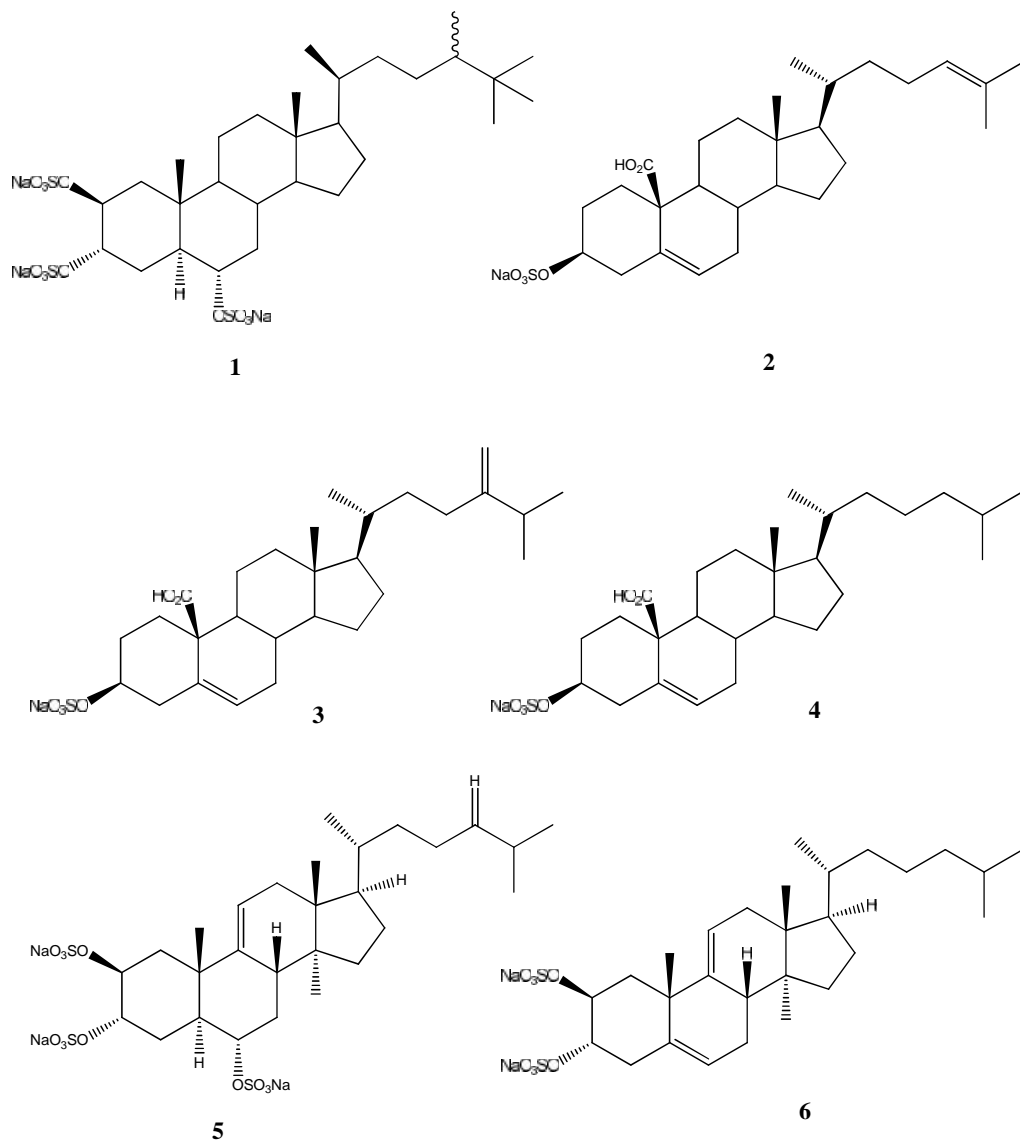
2.2. Senyawa metabolit sekunder sponsa

Pada umumnya senyawa – senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari sponsa memiliki aktivitas biologis terhadap suatu sel dan mikroorganisme. Sifat biologis ini dapat menghambat bahkan membunuh sel atau mikroorganisme dengan merusak sistem metabolisme di dalam tubuh. Senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari sponsa antara lain berasal dari golongan steroid, terpenoid, poliketida dan alkaloid (Bhakuni *and* Rawat, 2005).

2.2.1. Steroid

Steroid merupakan suatu senyawa organik lemak sterol yang tidak terhidrolisis sempurna dan dapat dihasilkan dari reaksi penurunan terpena atau skualena. Pada umumnya steroid berfungsi sebagai hormon. Steroid mempunyai struktur dasar yang terdiri dari 17 atom karbon yang membentuk tiga cincin sikloheksana dan satu cincin siklopentana. Perbedaan jenis steroid yang satu dengan steroid yang lain terletak pada gugus fungsional yang diikat oleh ke-empat cincin dan tahap oksidasi tiap-tiap cincin (Achmad, 2001).

Spongia merupakan salah satu sumber dari senyawa sterol. Beberapa diantaranya mempunyai sifat poligenetik/penurunan sifat beberapa gen. Sterol juga sangat penting untuk mempelajari fungsi dari suatu membran biologis. Sterol yang mengandung gugus sulfat dan alkaloid juga memperlihatkan aktifitas sebagai antimikroba. Halistanol (Gambar 6 [1]) yang didapatkan dari spongia *Halichondria mooriei* dan sterol (Gambar 6 [2-4]) dari spongia *Toxadocia zumi* diketahui menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 100 µg/disk dan 50 µg/disk (Bhakuni and Rawat, 2005).



Gambar 6. Beberapa senyawa steroid yang berasal dari sponsa.

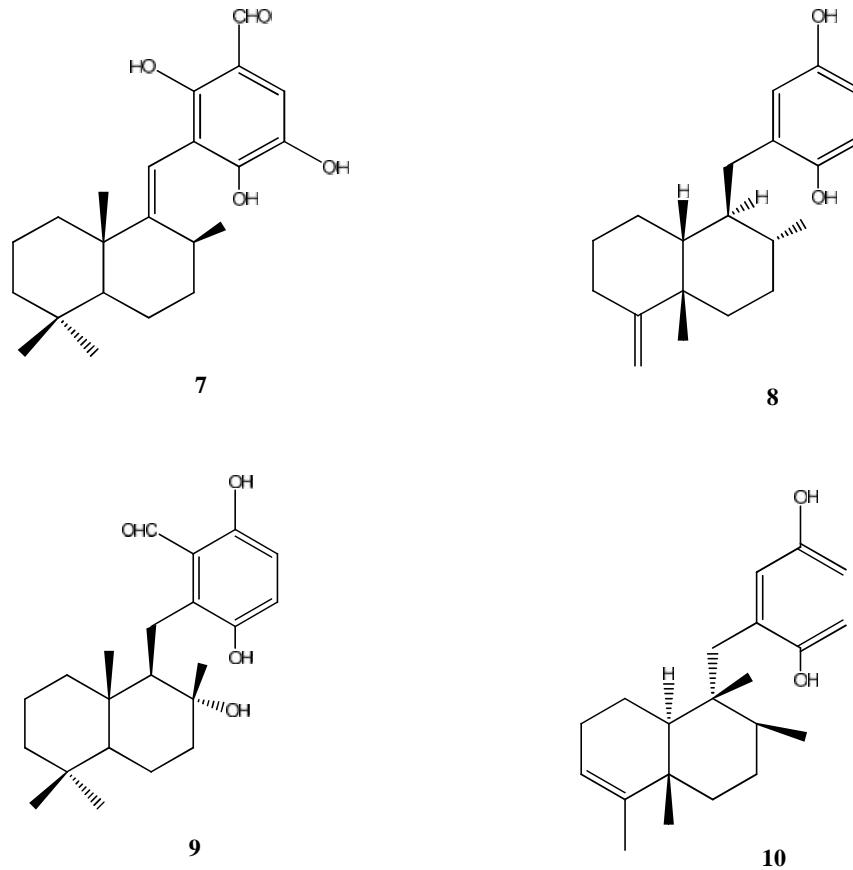
2.2.2. Terpenoid

Terpena merupakan senyawa metabolit sekunder dari golongan hidrokarbon yang banyak dihasilkan oleh tumbuhan dan sebagian hewan, terutama serangga dan beberapa hewan laut. Di samping sebagai produk senyawa metabolit sekunder, terpena merupakan kerangka penyusun sejumlah senyawa penting bagi makhluk hidup. Terpenoid terbentuk dari turunan

beberapa unit isoprena (C_5) yang bergandengan dalam model kepala ke ekor (*head-to-tail*), sedangkan unit isoprena diturunkan dari metabolisme asam asetat oleh jalur asam mevalonat (Achmad, 2001).

Sponga yang mengandung senyawa terpenoid mempunyai penyebaran yang cukup luas. Senyawa terpenoid unik sering sekali ditemukan dari hewan ini seperti senyawa dengan struktur linear furanoterpene, isoprenil quinol, sesqui, sesterpense dan diterpene. Banyak dari senyawa ini menunjukkan aktivitas biologis. Seperti furanoid sesquiterpenoid berhasil diisolasi dari tiga jenis sponga yang berbeda yaitu sponga *Dysidea*, *Euryspongia* dan *Siphonodictyon* sp. Nakafuran-8 dan nakafuran-9 yang berasal dari sponga *D. Fragilis* menunjukkan aktifitas sebagai antifedan pada ikan *D. ambliia*, sponga ini juga dilaporkan memiliki kandungan senyawa metabolit yang berbeda tergantung dimana lokasi tempat pengambilannya (Bhakuni *and* Rawat, 2005).

Sesquiterpen dengan gugus fenolik dan quinoid juga banyak ditemukan dalam sponga. Sullivan *et al.*, 1956 berhasil mengisolasi senyawa siphonodictyal-A (Gambar 7 [9]), siphonodictyal-B dan (Gambar 7 [7-8]) yang diketahui mempunyai aktifitas sebagai antimikroba. Senyawa bioaktif sesquiterpen avarol (Gambar 7 [10]) yang diisolasi dari sponga *Disidea avara* selain menunjukkan aktivitas sebagai antimikroba juga aktif terhadap virus AIDS. Senyawa ini diperoleh dari dua tempat yang berbeda yaitu Mediterrania dan Australia. Senyawa tetracyclic furanoditerpenes yang diisolasi dari sponga *S. Officinalis* juga dilaporkan mempunyai aktifitas sebagai antijamur dan antimikroba (Bhakuni *and* Rawat, 2005).



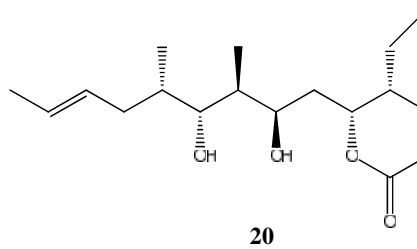
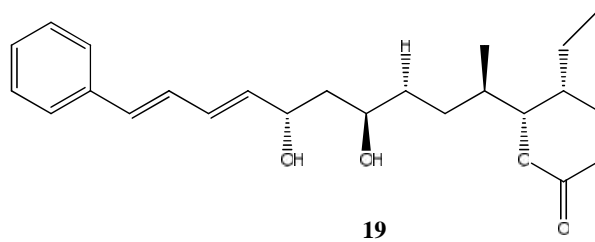
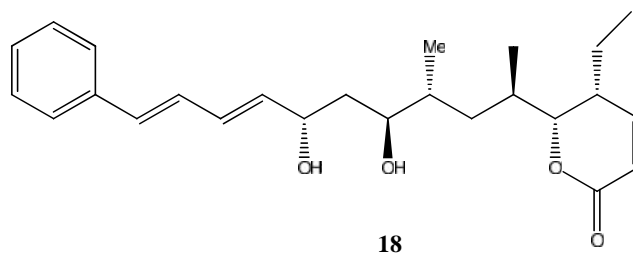
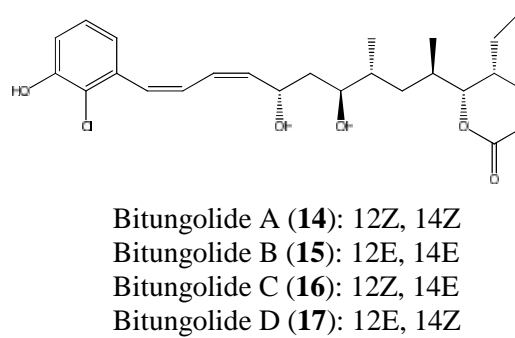
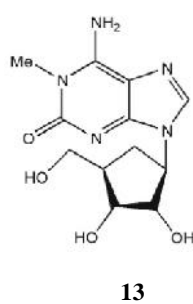
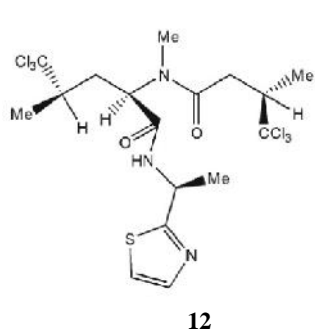
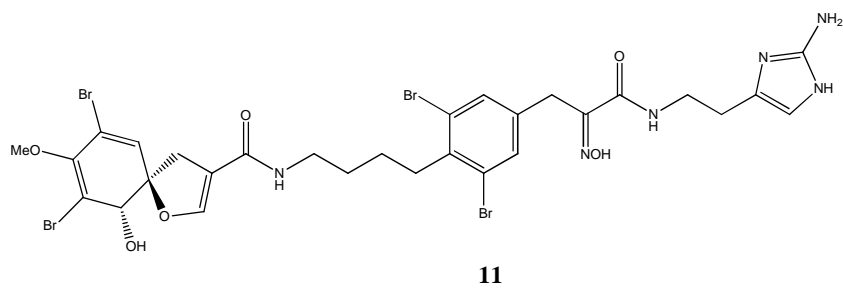
Gambar 7. Beberapa senyawa terpenoid yang berasal dari sponsa.

2.2.3. Poliketida

Poliketida merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan secara alami oleh bakteri, fungi, tumbuhan, hewan, sumber daya laut dan organisme yang memiliki keanekaragaman struktural yang tinggi (Walsh, 2004). Poliketida terbentuk akibat proses kondensasi oleh dua atau lebih gugus karbonil yang masing – masing berikatan dengan satu gugus metilen. Banyak poliketida berupa molekul siklik yang kerangkanya seringkali dimodifikasi lebih jauh melalui glikosilasi, metilasi, hidroksilasi, oksidasi dan proses lainnya untuk mencari manfaat dari sifat antibiotik yang dimiliki.

Beberapa senyawa peptida alkaloid dan protein juga banyak diisolasi dari sponsa laut. Puralin (Gambar 8 [11]) yang diisolasi dari sponsa laut perairan Okinawa diketahui mempunyai aktivitas sebagai aktivator suatu enzim yaitu modulator reaksi enzimatik dari ATP-ase. Hasil isolasi senyawa (Gambar 8 [12]) dari sponsa *Dysidea herbacea* juga diketahui menunjukkan sifat toksik. Sponsa *D. Herbacea* yang berasal dari tempat berbeda memiliki turunan senyawa metabolit asam polikloroamino yang berbeda pula. Matsunaga *et al.* berhasil mengisolasi senyawa bioaktif polipeptida dari sponsa *Discodermia kiiensis*.

Sponsa juga merupakan salah satu sumber senyawa nukleosida. Senyawa 1-Methylisoguanosine (Gambar 8 [13]) adalah senyawa nukleosida pertama yang berhasil diisolasi dari *nudibranch* dan kemudian disintesis melalui dua jalur sintesis dari sponsa *Tedania digitata*. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa nukleosida juga mempunyai aktivitas farmakologik (Bhakuni *and* Rawat, 2005).

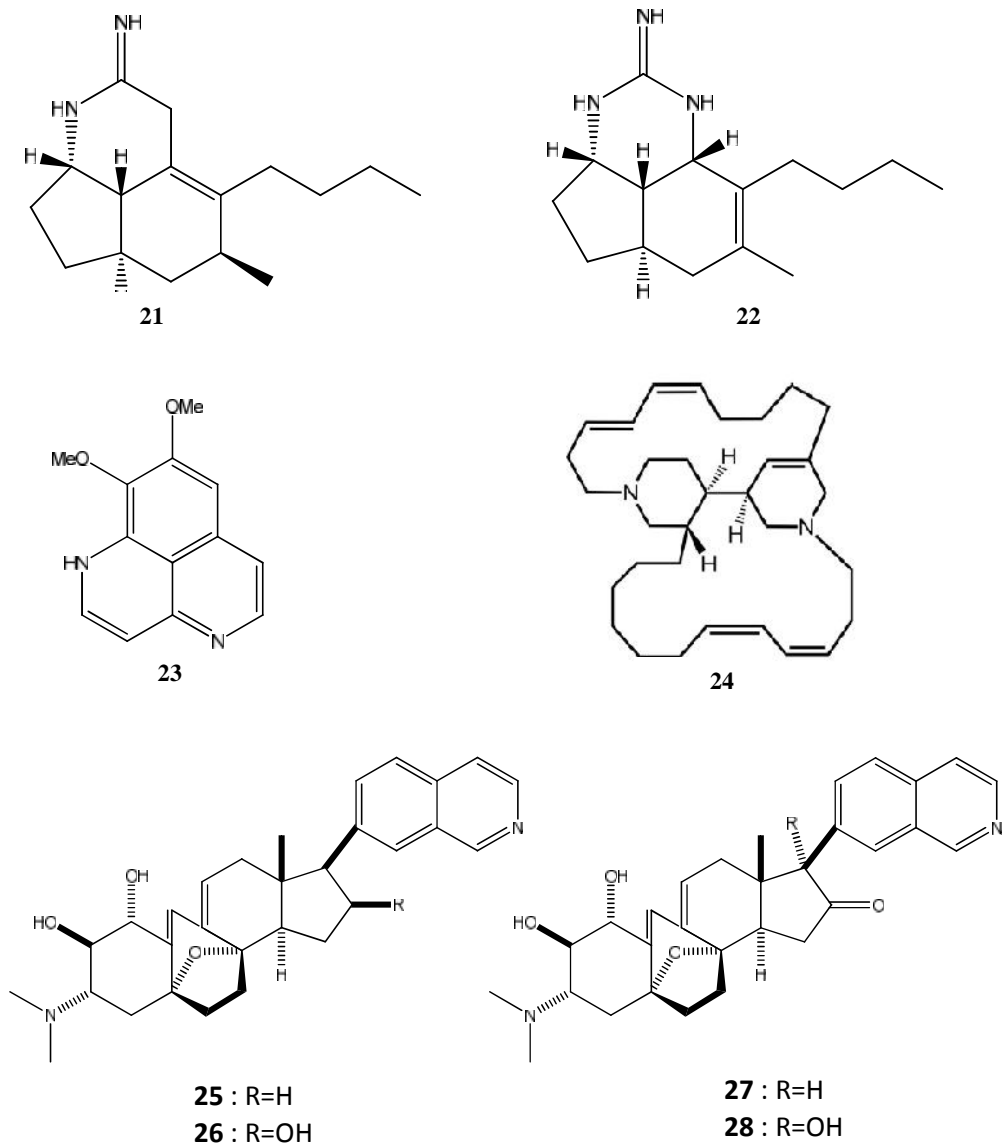


Gambar 8. Beberapa senyawa poliketida yang berasal dari sponsa.

2.2.4. Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Semua senyawa alkaloida mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Hampir semua alkaloida yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada yang sangat beracun tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan (Lenny, 2006).

Beberapa senyawa alkaloid dan nitrogen heterosiklik juga banyak ditemukan pada spons laut. Senyawa Ptilocaulin (Gambar 9 [21]) dan isoptilocaulin (Gambar 9 [22]) yang diisolasi dari sponsa *Ptilocaulistaff* dan *P. Spiculifer* menunjukkan aktivitas kuat sebagai antimikroba terhadap bakteri gram-positif dan gram-negatif serta mampu menghambat pertumbuhan sel leukemia L 1210. Senyawa Aaptamine (Gambar 9 [23]) yang berasal dari sponsa *Aaptos aaptos* dengan ikatan α -adrenoceptor juga diketahui mampu menghalangi aktivitas kerja dari pembuluh aorta seekor kelinci (Bhakuni and Rawat, 2005). Selain itu, ditemukan juga senyawa macrocyclic alkaloid baru oleh tim Arai *et al.*, 2011 yang diisolasi dari sponsa *Haliclona* sp. dari perairan laut Indonesia dengan nama Halicyclamine A (Gambar 9 [24]).



Gambar 9. Beberapa senyawa alkaloid yang berasal dari sponga.

Namun dari golongan – golongan senyawa tersebut, alkaloid merupakan golongan senyawa yang memiliki kemampuan farmakologik lebih besar jika dibandingkan dengan golongan lain (Grube *et al.*, 2007). Hal ini juga tidak menutup kemungkinan untuk menemukan jenis golongan senyawa – senyawa lain dengan tingkat aktifitas sama atau lebih besar yang berasal dari sponga.

2.3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2002). Ekstraksi digolongkan ke dalam dua bagian besar berdasarkan bentuk fasa yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat. Untuk ekstraksi cair-cair dapat menggunakan corong pisah, sedangkan ekstraksi cair-padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi dan sokletasi (Harborne, 1984). Metode ekstraksi yang umum digunakan antara lain maserasi, sokletasi, penggodokan (refluks), ekstraksi cair-cair (partisi), dan ekstraksi ultrasonik. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dan ekstraksi cair-cair.

2.3.1 Maserasi

Maserasi merupakan proses ekstraksi dengan cara perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik serta struktur senyawa tidak akan mudah rusak (Harborne, 1984).

2.3.2. Partisi (ekstraksi cair – cair)

Ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Senyawa polar akan terbawa dalam pelarut polar, senyawa semipolar akan terbawa dalam pelarut yang semipolar, dan senyawa nonpolar akan terbawa dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2002).

Ekstraksi cair-cair ditentukan oleh distribusi Nerst atau hukum partisi yang menyatakan bahwa "pada konsentrasi dan tekanan yang konstan, analit akan terdistribusi dalam proporsi yang selalu sama diantara dua pelarut yang saling tidak campur". Perbandingan konsentrasi pada keadaan setimbang di dalam 2 fasa disebut dengan koefisien distribusi atau koefisien partisi (KD) dan dirumuskan dengan:

$$KD = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq}}$$

Keterangan :

KD : Koefisien distribusi

[S]_{org} : Konsentrasi analit dalam fasa organik

[S]_{aq} : Konsentrasi analit dalam fasa air

Ekstraksi cair-cair bertahap merupakan teknik ekstraksi cair-cair yang paling sederhana, cukup dengan menambahkan pelarut pengestraksi yang tidak saling bercampur kemudian dilakukan pengocokan sehingga terjadi distribusi zat terlarut di antara kedua pelarut (Khopkar 2002). Dalam hal ini, pemisahan zat yang polar dan nonpolar dapat dilakukan dengan ekstraksi cair-cair

(partisi) dalam corong pisah. Pengocokan bertujuan memperluas area permukaan kontak di antara kedua pelarut sehingga pendistribusian zat terlarut di antara keduanya dapat berlangsung dengan baik. Syarat pelarut untuk ekstraksi cair-cair adalah memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang diekstraksi dan harus terpisah setelah pengocokan (Harvey, 2000).

2.4. Kromatografi

Berdasarkan IUPAC (1993) kromatografi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari campuran berdasarkan perbedaan distribusi suatu komponen di dalam dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Secara umum ada tiga jenis kromatografi berdasarkan dari perbedaan kedua fasa tersebut, yaitu kromatografi padat-cair (kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas, kromatografi kolom), kromatografi cair-cair dan kromatografi gas-cair (Hostettman *et al.*, 1995).

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis

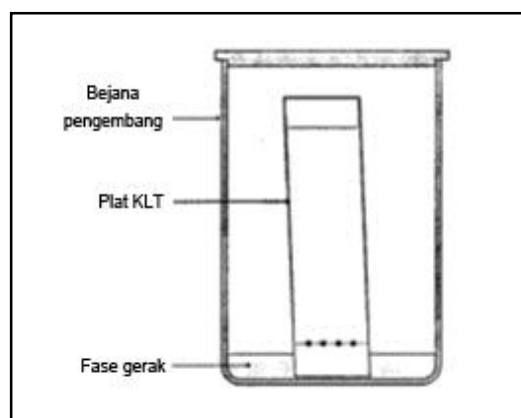
Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode konvensional yang masih digunakan dalam analisis modern. Kromatografi ini bertujuan untuk menentukan jumlah komponen campuran, mengidentifikasi komponen dan mendapatkan kondisi yang tepat pada saat pemisahan dengan kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) seperti pemilihan fasa gerak yang akan digunakan (Johnson dan Stevenson, 1991).

Pada kromatografi lapis tipis, fasa diam yang sering digunakan adalah serbuk silika gel ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$), alumina, tanah diatom, selulosa dan lain-lain yang mempunyai ukuran butir sangat kecil berkisar 0,063-0,125 mm. Sedangkan

fasa gerak digunakan pelarut – pelarut organik yang sesuai bahkan beberapa campuran pelarut untuk mendapatkan pemisahan yang paling baik (Hostettman *et al.*, 1995).

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen dalam campuran senyawa yang diketahui maupun yang tidak diketahui dan salah satu langkah awal dalam teknik pemurnian suatu senyawa dari *crude* ekstrak kasar (Hajnos *et al.*, 2008).

Pada pelaksanaan kromatografi lapis tipis, larutan cuplikan atau sampel ditotolkan pada plat dengan pipet mikro atau injektor pada jarak 1 – 2 cm dari batas plat. Setelah kering, plat siap untuk dikembangkan dengan fasa gerak sampai pada batas tertentu. Proses pengembangan dikerjakan dalam wadah tertutup yang diisi dengan fasa gerak yang tepat dan telah dijenuhi uap pelarut agar dihasilkan pemisahan yang baik. Untuk mengidentifikasi senyawa dalam plat KLT dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: pengamatan langsung (untuk noda/bercak yang tampak), dengan lampu ultraviolet, atau dengan pereaksi semprot penimbul warna (Anwar, 1994).



Gambar 10. Penampang Kromatografi Lapis Tipis.

Hasil yang didapat kemudian diamati dengan menghitung harga perbandingan jarak pergerakan komponen-komponen yang dipisahkan dengan jarak pergerakan pelarut yang dikenal dengan Rf (*Retention Factor*/Faktor Retensi).

Hubungan persamaan nilai Rf dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak perjalanan suatu senyawa}}{\text{Jarak perjalanan suatu fasa gerak}}$$

Harga Rf ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, kandungan air, ketebalan), jumlah bahan yang ditotolkan pada plat dan suhu (Khopkar, 2002).

KLT mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya: waktu yang dibutuhkan tidak lama (2 – 5 menit) dan sampel yang dipakai hanya sedikit sekali (2 – 20 µg). Kerugiannya dengan menggunakan KLT adalah tidak efektif untuk skala industri. Walaupun lembaran KLT yang digunakan lebih lebar dan tebal, pemisahannya sering dibatasi hanya sampai beberapa miligram sampel saja (Mayo, 2000). Metode ini kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram (Hostettman *et al.*, 1995). Hasil dari metode KLT akan mengarahkan dilakukannya fraksinasi lebih lanjut untuk pemisahan suatu komponen dari sampel.

2.4.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu teknik pemisahan lebih lanjut setelah metoda KLT dimana pemisahan suatu komponen dari campuran senyawa dilakukan dengan mengalirkan fasa gerak yang sesuai terhadap

sampel dalam suatu kolom kaca vertikal yang berisi adsorben (fasa diam) hingga cairan pelarut mengalir melalui kolom akibat gaya gravitasi. Di dalam kolom akan terjadi kesetimbangan antara zat terlarut yang di adsorpsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom, sehingga terjadi pola pemisahan dari masing – masing komponen senyawa yang kemudian dapat ditampung menurut pola pemisahannya. Ukuran partikel fasa diam akan mempengaruhi aliran pelarut melewati kolom. Fasa diam dengan ukuran partikel lebih kecil digunakan dalam kromatografi *flash*, sedangkan yang berukuran partikel besar digunakan dalam kromatografi kolom gravitasi. Fasa diam yang sering digunakan adalah silika gel ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$). Silika gel berukuran partikel 70-230 mesh sering digunakan untuk kolom *flash* dan yang berukuran 230-430 untuk kolom gravitasi (Heftmann, 1983).

Kromatografi kolom biasanya digunakan untuk teknik pemurnian, yaitu mengisolasi suatu senyawa dari campurannya (Jhonson dan Stevenson, 1991).

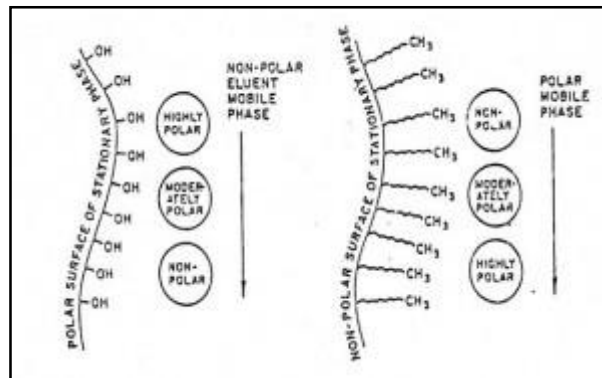
Menurut Heftmann (1983), kepolaran relatif fasa diam dan fasa gerak kromatografi kolom dapat dibedakan menjadi 2 tipe, yaitu:

(1). Kromatografi kolom fasa normal

Pada kromatografi ini, fasa diam bersifat polar dan fasa gerak relatif bersifat nonpolar, sehingga komponen yang kepolarannya paling rendah terelusi lebih dulu. Selain itu ikatan hidrogen yang terbentuk antara komponen senyawa terhadap fasa diam silika akan mempengaruhi pergerakan komponen tersebut di dalam kolom.

(2). Kromatografi kolom fasa terbalik

Pada kromatografi ini, fasa diam bersifat nonpolar dan fasa gerak relatif bersifat polar sehingga komponen yang kepolarannya tinggi akan terelusi lebih dulu.



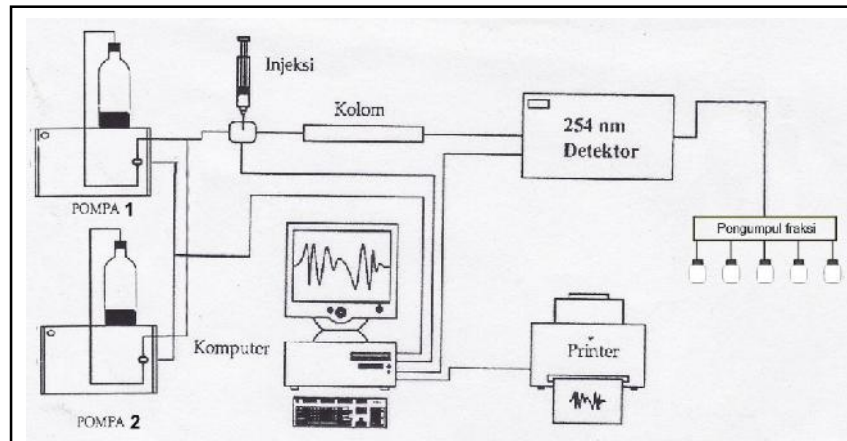
Gambar 11. Ilustrasi kromatografi cair fasa normal dan fasa terbalik (<http://www.chem-is-try.org>).

Menurut Sastrohamidjojo (2001) bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom, maka pelarut tersebut akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen dari campuran. Kecepatan bergerak suatu komponen bergantung pada berapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penjerap di dalam kolom. Hal ini dipengaruhi oleh adanya interaksi antara komponen dalam sampel terhadap fasa diamnya. Jika perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna.

2.4.3. *Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)*

Medium pressure Liquid Chromatography atau dikenal sebagai kromatografi preparatif telah dikembangkan sejak 20 tahun yang lalu untuk mempermudah dalam proses pemisahan komponen dari campuran senyawa organik bahan alam. Kromatografi preparatif banyak digunakan untuk pemisahan komponen

dari sampel dalam jumlah besar. Akan tetapi tingkat ketelitian alat ini masih kurang baik dibanding dengan kromatografi analitik (HPLC). Sistem elusi pada kromatografi preparatif menggunakan tekanan sedang berkisar 10 – 50 bar.



Gambar 12. Skema kromatografi preparatif (Budiarti dkk., 2010).

Pada dasarnya prinsip kerja kromatografi preparatif sama dengan kromatografi kolom gravitasi, dimana pemisahan suatu komponen dari campurannya berdasarkan perbedaan distribusi suatu komponen dalam fasa diam dan fasa geraknya. Beberapa hal yang membedakan kromatografi preparatif dengan kromatografi kolom gravitasi :

- Tekanan, pada kromatografi preparatif menggunakan tekanan sedang/menengah sedangkan kromatografi kolom gravitasi masih menggunakan gaya gravitasi bumi dalam proses elusinya.
- Sensitivitas, kromatografi preparatif telah menggunakan sistem perangkat detektor yang dapat diatur pemilihan panjang gelombangnya sehingga dengan penggunaan detektor ini akan mempercepat proses pemisahan dan

mempunyai tingkat ketelitian yang tinggi dibanding kromatografi kolom gravitasi.

- Kolom yang digunakan dalam kromatografi preparatif dapat dipakai berulang kali. Kebersihan dan pemilihan sistem pelarut yang sesuai sangat penting untuk menjaga kualitas dan keawetan dari kolom yang digunakan.

2.5. Antibakteri

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Antimikroba terdiri dari antibiotika, antiseptik dan desinfektan. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteristatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid (Brooks *et al.*, 1996).

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniseluler dan tidak mengandung struktur yang dibatasi membran di dalam sitoplasmanya, termasuk kelas Schizomycetes, berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Sel-sel secara khas, berbentuk bola seperti batang atau spiral. Bakteri yang khas berdiameter sekitar 0,5 sampai 1,0 μm dan panjangnya 1,5 sampai 2,5 μm . Beberapa bakteri dapat tumbuh pada suhu 0°C dan ada yang tumbuh dengan baik pada sumber air panas yang suhunya 90°C atau lebih (Pelezar *and* Chan, 1988). Biasanya untuk menguji sifat antibakteri suatu senyawa digunakan bakteri yang bersifat patogen. Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus berasal dari famili Micrococcaceae dan merupakan bakteri gram positif, tidak berspora, dan bersifat katalase positif. Bakteri ini umumnya ditemukan dalam bentuk kelompok kecil bergerombol. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan lebih banyak peptidoglikan, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida (asam teikoat). Asam teikoat merupakan polimer yang larut dalam air, yang berfungsi sebagai transport keluar-masuk ion positif dalam sel. Diameter bakteri ini antara 0,8-1,0 μm . Jenis-jenis *Staphylococcus* di laboratorium tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37⁰C. Batas-batas suhu untuk pertumbuhannya ialah 15⁰C dan 40⁰ C, sedangkan suhu pertumbuhan optimum ialah 35⁰C. Diantara semua bakteri yang tidak membentuk spora, maka *Staphylococcus aureus* termasuk jenis bakteri yang paling kuat daya tahannya. Pada agar miring dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain dan dalam nanah dapat tetap hidup selama 6-14 minggu (Volk dan Wheeler, 1993).

2.6. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

HPLC merupakan alat yang berfungsi mendorong analit melalui sebuah kolom dari fase diam (yaitu sebuah tube dengan partikel bulat kecil dengan permukaan kimia tertentu) dengan memompa cairan (fase bergerak) pada tekanan tinggi melalui kolom. HPLC secara mendasar merupakan perkembangan tingkat tinggi dari kromatografi kolom. Selain dari pelarut yang menetes melalui kolom dibawah grafitasi, didukung melalui tekanan tinggi sampai dengan 400 atm. Hal ini akan mempercepat dalam proses pemisahan.

Menurut Putra (2004), pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) efisiensi waktu dan tingkat kemurnian senyawa yang akan diisolasi dapat dilakukan dengan cepat dan maksimal. Hal ini terkait dari beberapa kelebihan dari teknik KCKT yang digunakan dibanding dengan kromatografi cair klasik, yaitu diantaranya :

- Cepat: Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit (*uncomplicated*), waktu analisis kurang dari 5 menit bisa dicapai.
- Resolusi : Berbeda dengan KG, Kromatografi Cair mempunyai dua fasa dimana interaksi selektif dapat terjadi. Pada KG, gas yang mengalir sedikit berinteraksi dengan zat padat; pemisahan terutama dicapai hanya dengan fasa diam. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fasa diam dan fasa gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.
- Sensitivitas detektor : Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam- macam zat. Detektor-detektor Fluoresensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi jumlah sampai picogram (10^{-12} gram). Detektor-detektor seperti Spektrofotometer Massa, Indeks Refraksi, Radiometri, dll dapat juga digunakan dalam KCKT
- Kolom yang dapat digunakan kembali : Berbeda dengan kolom kromatografi klasik, kolom KCKT dapat digunakan kembali (*reusable*) . Banyak analisis yang bisa dilakukan dengan kolom yang sama sebelum dari jenis sampel yang diinjeksi, kebersihan dari solven dan jenis solven yang digunakan ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik : zat – zat

yang tidak bisa dianalisis dengan KG karena volatilitas rendah, biasanya diderivatisasi untuk menganalisis spesies ionik. KCKT dengan tipe eksklusi dan penukar ion ideal sekali untuk menganalisis zat – zat tersebut.

- Mudah rekoveri sampel : Umumnya detektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa, oleh karena itu komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Pelarutnya dapat dihilangkan dengan menguapkan kecuali untuk kromatografi penukar ion memerlukan prosedur khusus.

Secara umum metoda kromatografi cair kinerja tinggi mempunyai prinsip kerja yang sama seperti pada metode kromatografi kolom, dimana proses pemisahan senyawa terjadi akibat adanya keseimbangan distribusi antara zat terlarut (sampel) yang di adsorpsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom. Akan tetapi yang membedakan dalam sistem kromatografi ini adalah proses pemisahan komponen sampel di dalam kolom dilakukan pada sistem tekanan tinggi dengan tingkat ukuran partikel adsorben fasa diam yang diperkecil dan tingkat sensitifitas pemisahan dapat digunakan beberapa macam detektor yang dapat diganti.

Berdasarkan prinsip kerjanya, HPLC dibedakan menjadi:

1. HPLC *Isocratic*

HPLC *isocratic* digunakan pada analisis senyawa kimia yang tidak memerlukan perubahan komposisi fasa gerak, suhu, tekanan (*pressure*) dan daya alir (*flow rate*) selama sampel diinjeksikan dan terelusi di dalam kolom.

2. HPLC *Gradient*

HPLC *gradient* digunakan pada analisis senyawa kimia yang biasanya memerlukan perubahan komposisi fasa gerak, suhu, tekanan dan daya alir selama sampel terelusi di dalam kolom agar senyawa kimia tersebut dapat dipisahkan dari campurannya secara sempurna.

Metode kromatografi kinerja tinggi sangat efisien untuk memisahkan berbagai senyawa walaupun tidak langsung memisahkan seluruh senyawa yang tercampur hingga saat ini.

2.7. Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Untuk menentukan karakteristik suatu senyawa dapat dilakukan analisis dengan teknik spektroskopi. Spektroskopi merupakan ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara energi cahaya dan materi (Silverstein dkk., 1986). Pada dasarnya prinsip dari Spektrofotometer FTIR adalah sama dengan Spektrofotometer Infra Red dispersi, perbedaannya adalah pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra merah yang melewati contoh. Dasar pemikirannya berasal dari persamaan gelombang yang dirumuskan oleh Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) seorang ahli matematika dari Perancis. Dari deret Fourier tersebut intensitas gelombang dapat digambarkan sebagai daerah waktu atau daerah frekuensi dimana :

$$v = c/\lambda$$

v = frekuensi (Hz)

λ = Panjang gelombang (cm).

c = Kecepatan cahaya, $\sim 2.998 \times 10^{10}$ cm/sec.

Sedangkan energi radiasi elektromagnetik (E) berkaitan dengan frekuensi :

$$E = h\nu$$

ν = Frekuensi (Hz),

h = Konstanta Planck's, $\sim 6.626 \times 10^{-34}$ J/Hz

Perubahan gambaran intensitas gelombang energi radiasi elektromagnetik dari daerah waktu ke daerah frekuensi atau sebaliknya disebut Transformasi Fourier (*Fourier Transform*). Selanjutnya pada sistim optik peralatan instrumen Fourier Transform Infra Red dipakai dasar daerah waktu yang non dispersif (Silverstein and Webster, 1998).

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, gugus fungsi ini dapat ditentukan berdasarkan energi ikatan dari tiap atom. Sampel menyerap radiasi elektromagnetik di daerah infra merah yang menyebabkan terjadinya vibrasi ikatan kovalen. Hampir semua senyawa organik memiliki ikatan kovalen yang berbeda-beda, sehingga menghasilkan jenis vibrasi dan serapan yang berbeda-beda pula pada suatu spektrum IR (Silverstein dkk., 1986).

Pada umumnya spektrum IR dibedakan menjadi tiga daerah. Daerah bilangan gelombang tinggi antara $4000-1300 \text{ cm}^{-1}$ ($2-7,7 \mu\text{m}$) yang disebut daerah gugus fungsi karakteristik frekuensi tarik untuk gugus fungsi penting seperti C=O, OH, dan NH termasuk dalam daerah ini. Daerah frekuensi menengah, yakni antara $1300-900 \text{ cm}^{-1}$ ($7-11 \mu\text{m}$) yang diketahui sebagai daerah *fingerprint*, yang mengabsorpsi secara lengkap dan umumnya kombinasi dari interaksi vibrasi, setiap molekul memberikan *fingerprint* yang unik.

Spektrum pada daerah ini menunjukkan nilai khusus dan merupakan referensi untuk daerah lain. Daerah antara $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ($11\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$) menunjukkan klasifikasi umum dari molekul yang terbentuk dari absorbansi seperti cincin benzen tersubstitusi. Adanya absorbansi pada daerah bilangan gelombang rendah dapat memberikan data yang baik akan adanya senyawa aromatik. Selain itu adanya intensitas absorbansi di daerah frekuensi rendah juga menunjukkan adanya karakteristik senyawa dimer karboksilat, amina, atau amida (Coates, 2000).