

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Spongia

1. Jenis-jenis Spongia

Menurut Ruppert dan Barnes (1991), spongia dikelompokkan dalam empat kelas, yaitu Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida, dan Sclerospongia. Kelas Calcarea adalah kelas spongia yang semuanya hidup di laut. Spongia ini mempunyai struktur sederhana dibandingkan spongia yang lainnya. Spikulanya terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk *calcite*. Kelas Demospongiae adalah kelompok spongia yang mendominasi Porifera. Spongia tersebar luas di alam, serta memiliki jenis yang beragam. Salah satu karakteristik spongia adalah berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran rumit yang dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Spikula spongia ada yang terdiri dari silikat dan beberapa diantaranya hanya terdiri serat spongin (Dictyoceratida, Dendroceratida dan Verongida), serat kolagen atau tanpa spikula. Kelas Hexactinellida merupakan spongia gelas. Jenis ini kebanyakan hidup di laut dalam dan tersebar luas. Spikulanya terdiri dari silikat dan tidak mengandung spongin (Romimohtarto dan Juwana, 1999).

Kelas Sclerospongia merupakan sponsa yang kebanyakan hidup pada perairan dalam di terumbu karang atau pada gua-gua, celah-celah batuan bawah laut atau terowongan di terumbu karang. Semua jenis ini bertipe *leuconoid* yang kompleks yang mempunyai spikula silikat dan serat spongin. Elemen-elemen ini di kelilingi oleh jaringan hidup yang terdapat pada rangka basal kalsium karbonat yang kokoh atau pada rongga yang ditutupi oleh kalsium karbonat (Harrison dan De Vos, 1991). Morfologi luar sponsa laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam sponsa cenderung memiliki tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama yang hidup pada perairan dangkal.

Sponsa dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis atau masif dan agak tidak teratur. Secara umum sponsa terdiri dari segumpal jaringan yang tak tentu bentuknya, menempel dan membuat kerak pada batu, cangkang, tonggak, atau tumbuh-tumbuhan. Kelompok sponsa lain mempunyai bentuk lebih teratur dan melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk yang dimiliki sponsa dapat beragam. Beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, seperti cawan atau seperti kubah. Ukuran sponsa juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum

pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5 cm. Jenis-jenis sponsa tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya.

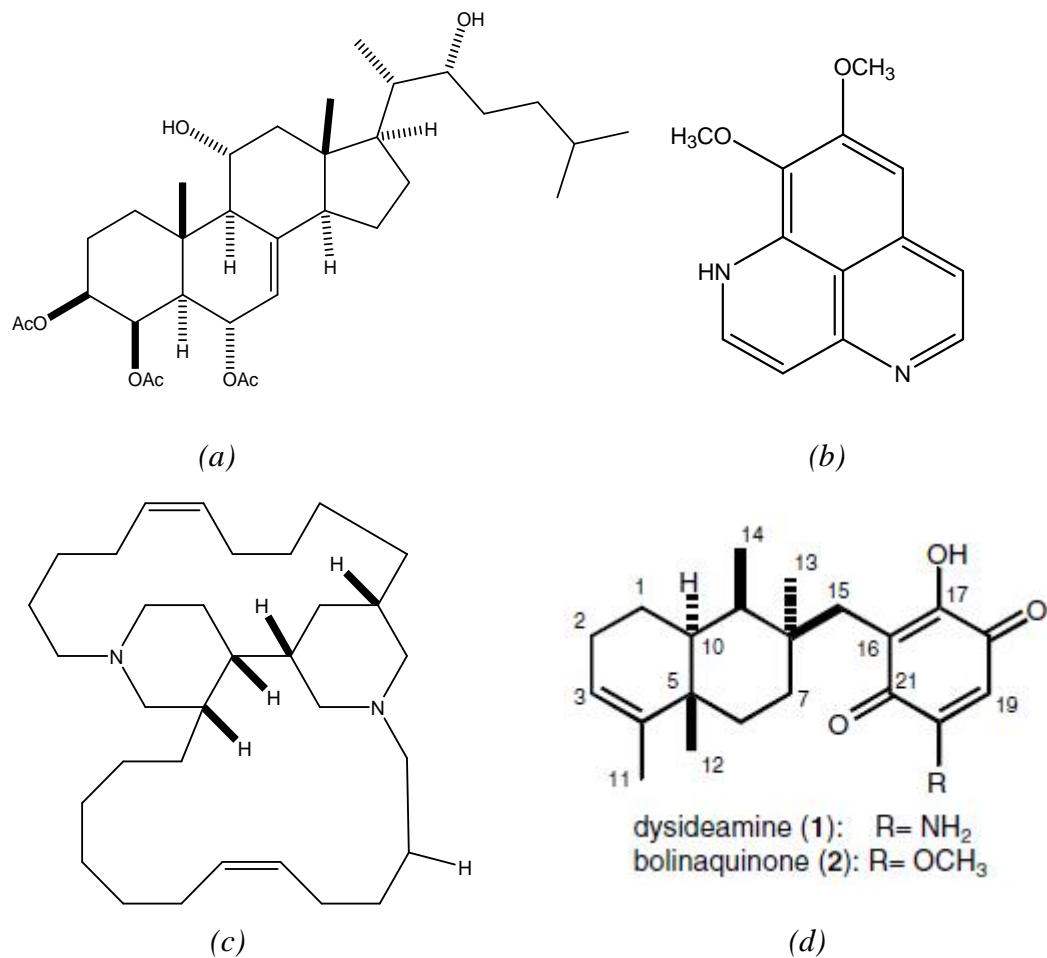
2. Senyawa Bioaktif dari Sponga

Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh sponsa laut telah banyak diketahui manfaatnya. Manfaat tersebut antara lain adalah sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antivirus, antifouling dan menghambat aktivitas enzim. Senyawa antibakteri telah diisolasi dari sponsa laut jenis *Discodea kiiensis*, *Cliona celata*, *Lanthella basta*, *Lanthella ardis*, *Psammaphysilla purpurea*, *Agelas sceptrum*, *Phakelia flabellata*. Senyawa antijamur telah diisolasi dari sponsa laut jenis: *Jaspis sp*, *Jaspis johnstoni*, *Geodia sp*. Senyawa anti tumor/anti kanker telah diisolasi dari sponsa laut jenis *Aplysina fistularis*, *Aplysina aerophoba*. Senyawa antivirus telah diisolasi dari sponsa laut jenis *Cryptotethya crypta*, *Ircinia variabilis*. Senyawa sitotoksik diisolasi dari sponsa laut jenis *Axinella cannabina*, *Epipolasis kushimotoensis*, *Spongia officinalis*, *Igernella notabilis*, *Tedania ignis*, *Axinella verrucosa*, *Ircinia sp*. Senyawa antienzim tertentu telah diisolasi dari sponsa laut jenis *Psammaphysilla purea* (Ireland *et al.*, 1989).

Kimura *et al.* (1998) mengisolasi garam 1-Methyherbipoline sebagai inhibitor protease serin dari sponsa jenis *Coscinoderma mathewsi*. Komponen bioaktif alami yang merupakan peptida makrosiklik berhasil diisolasi dari sponsa jenis *Theonella swinhoei* yang berasal dari perairan Jepang. Komponen ini

menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap serin protease seperti thrombin dan mempunyai dua bentuk utama, yaitu cyclotheonamida A (C₃₆H₄₅N₉O₈) serta cyclotheonamida B (C₃₄H₄₇N₉O₈) yang mengandung vinylogous tyrosine (V-Tyr) dan residu α -ketoarginin yang merupakan jenis asam amino yang belum diketahui secara pasti di alam. O'Keefe *et al.* (1998) berhasil mengisolasi adociavirin dari sponga *adocia* sp., senyawa ini potensial sebagai antisitopatik dalam sel CEM-SS yang terinfeksi oleh HIV-1.

Aoki *et al.*, (1998) telah berhasil mengisolasi agosterol dari *spongia* sp. Agosterol memperlihatkan sifat sebagai *reversal agent* dengan menghambat fungsi membran transporter P-gp (*phospho glycoprotein*) pada sel karsinoma KB-C2 yang resistan terhadap colchicine dan MRP1 (*multidrug resistanst associated protein*) pada sel karsinoma KB-CV60 yang resistan terhadap colchicine dan vincristine. Begitu juga dengan aaptamine yang diisolasi dari sponga *aaptos* sp., mampu mengaktifkan transkripsi gen p21 (Aoki *et al.*, 2006). Senyawa dysideamine dan bolinaquinone menunjukkan efek perlindungan melawan kematian sel akibat asam iodoasetat (Suna *et al.*, 2009). Alkaloid halyclonacylamine A dan halyclonacylamine B yang diisolasi dari sponga, *haliclona* sp, menunjukkan aktivitas antimikrobakterial terhadap *Mycobacterium smegmatis* dan *M. bovis Bacille de Calmette et Guerin* (BCG) (Arai *et al.*, 2009).



Gambar 1. Senyawa-senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dari sponsa (a). Agosterol, (b). Aaptamin, (c). Halyclonacyclamine, (d). Dysideamine dan Bolinaquinone

B. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan molekul yang relatif tidak stabil, memiliki elektron yang tidak berpasangan di orbital luarnya sehingga bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektron. Radikal bebas dapat terbentuk melalui mekanisme metabolisme normal dalam tubuh (Desmarchelier *et al.*, 1997) dan dapat juga bersumber dari luar tubuh. Di dalam tubuh, radikal bebas dihasilkan secara terus menerus oleh netrofil, makrofag dan sistem xantin oksidase (Khelifi *et al.*, 2005).

Radikal bebas juga terbentuk karena peradangan, kekurangan gizi dan akibat respon terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi udara, sinar ultraviolet, asap kendaraan bermotor, dan asap rokok (Karyadi, 1997). Makanan tertentu seperti makanan cepat saji (*fast food*), makanan kemasan, makanan kalengan juga berpotensi sebagai sumber radikal bebas karena kandungan lemak dan pengawetnya (Sibuea, 2004).

Adanya radikal bebas dalam tubuh diimbangi dengan mekanisme pertahanan endogen, dengan memproduksi zat yang mempunyai pengaruh sebagai anti radikal bebas yang disebut antioksidan (Suryohudoyo, 2000). Akan tetapi, pada saat level radikal bebas meningkat melebihi dari sistem pertahanan antioksidan tubuh, terjadilah stress oksidatif (Moller *et al.*, 1996; Sharma dan Agarwal, 1996; Saleh *et al.*, 2003). Stress oksidatif merupakan kondisi terjadinya peningkatan radikal bebas yang akan menyebabkan kerusakan sel, jaringan atau organ (Moller *et al.*, 1996; Sharma dan Agarwal, 1996; Saleh *et al.*, 2003).

Kondisi stres oksidatif dapat menyebabkan berbagai penyakit degeneratif seperti diabetes, kanker, inflamasi jaringan, kelainan imunitas, infark miokard dan penuaan dini (Middleton *et al.*, 2000). Kelebihan produksi radikal bebas dapat juga menyebabkan infertilitas. Radikal bebas menyebabkan infertilitas melalui efek negatifnya ke spermatozoa seperti peningkatan hilangnya motilitas, peningkatan kerusakan membran, penurunan morfologi, viabilitas, dan kemampuan spermatozoa (Twig *et al.*, 1998).

C. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat radikal bebas dalam tubuh. Tubuh memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam dampak negatif senyawa ini.

Senyawa antioksidan akan menyerahkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga menjadi bentuk molekul yang normal kembali dan menghentikan berbagai kerusakan yang ditimbulkan (Dalimartha dan Soedibyo, 1999).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu:

- a. Antioksidan primer (antioksidan endogen atau antioksidan enzimatis), contohnya enzim peroksidase dismutase, katalase dan glutathion peroksidase. Enzim-enzim ini mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk stabil. Reaksi ini disebut sebagai *chain-breaking-antioxidant*.
- b. Antioksidan sekunder (antioksidan eksogen atau antioksidan non enzimatis). Contoh antioksidan sekunder ialah vitamin E, vitamin C, β -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin dan albumin. Senyawa-senyawa ini dikenal sebagai penangkap radikal bebas (*scavenger free radical*), kemudian mencegah amplifikasi radikal.

c. Antioksidan tersier, misalnya enzim DNA-repair, metionin sulfoksida reduktase, yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).

D. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Ada beberapa teknik ekstraksi yang umum digunakan seperti maserasi, perkolasi, dan sokletasi. Ekstraksi didasarkan pada kelarutan komponen terhadap pelarut. Dalam ekstraksi, pelarut polar akan melarutkan solut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan solut yang non polar. Dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut, pemilihan pelarut yang tepat akan memberikan efektivitas yang tinggi (Djarwis, 2004). Berikut ini adalah metode ekstraksi yang umum digunakan dalam isolasi senyawa bahan alam :

1. Maserasi

Maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan. Pada maserasi, akan terjadi kontak sampel dan pelarut yang cukup lama. Terdistribusinya pelarut organik yang terus menerus ke dalam sel sponga mengakibatkan perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel sponga sehingga terjadi pemecahan dinding dan membran sel. Pemecahan dinding sel, mengakibatkan senyawa metabolit sekunder yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Metode maserasi ini sangat

menguntungkan karena pengaruh suhu dapat dihindari. Suhu yang tinggi dapat mengakibatkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder. Namun demikian, pada maserasi diperlukan waktu ekstraksi yang relatif lebih lama.

2. Perkolasi

Istilah perkolasi berasal dari bahasa latin *per* yang artinya melalui dan *colare* yang artinya merembes. Jadi, perkolasi adalah penyarian dengan mengalirkan cairan pengeksrak melalui sampel yang telah dibasahi. Alat yang digunakan untuk mengekstraksi disebut perkolator, dengan ekstrak yang telah dikumpulkan disebut perkolat (Ansel, 1989). Pada perkolasi, aliran cairan pengeksrak menyebabkan pergantian cairan dalam larutan dengan cairan yang konsentrasinya lebih rendah. Aliran tersebut menyebabkan meningkatnya derajat perbedaan konsentrasi sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung dengan lebih cepat, akan tetapi memerlukan pelarut yang relatif lebih banyak.

3. Sokletasi

Sokletasi adalah suatu metode/proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyarian berulang-ulang dengan menggunakan pelarut yang sesuai, sehingga semua komponen yang diinginkan terekstraksi. Adapun prinsip sokletasi ini adalah penyarian yang berulang ulang dengan menggunakan pelarut yang mudah menguap, pelarut yang menguap kemudian diembunkan kembali. Proses ini berulang terus sehingga hasil yang didapat

sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Bila penyarian ini telah selesai, maka pelarutnya diuapkan kembali dan sisanya adalah zat yang terekstrak. Pada umumnya, metode sokletasi menggunakan pelarut yang mudah menguap dan dapat melarutkan senyawa organik yang terdapat pada bahan tersebut, tapi tidak melarutkan zat padat yang tidak diinginkan. Metode ini menguntungkan karena relatif lebih cepat dan pelarut yang digunakan relatif lebih sedikit, akan tetapi tidak baik digunakan untuk ekstraksi senyawa yang tidak tahan panas.

E. Kromatografi

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode pemisahan yang sederhana (Hortettmann, 1986). KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, ataupun preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai pada kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi/KCKT (Gritter, 1991). Analisis dari KLT dapat membantu menentukan pelarut terbaik apa yang akan dipakai dan berapa perbandingan antar pelarut yang akan digunakan sebagai fasa gerak pada kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis sangat berhubungan dengan kromatografi kolom, hal ini karena fasa-fasa senyawa yang digunakan dalam teknik keduanya sama. Alumina dan silika gel adalah fasa diam yang biasa digunakan pada KLT dan kromatografi

kolom. Walaupun demikian, tetap terdapat perbedaan antara KLT dan kromatografi kolom. Fasa gerak (cair) di dalam kromatografi kolom bergerak turun, sedangkan dalam KLT bergerak naik. Untuk tujuan preparatif teknik KLT dapat menggantikan kolom kromatografi dengan cara memilih ketebalan fasa diam KLT.

Pada KLT bahan-bahan dari gelas atau lembaran-lembaran alumunium dapat digunakan sebagai bahan pendukung fasa diam. Bahan pendukung alumunium lebih sering dipakai karena dapat dipotong dengan gunting menjadi lembaran-lembaran yang lebih kecil dengan berbagai ukuran. Biasanya lembaran kecil itu berukuran 1×3 inci tetapi untuk lembaran yang lebih kecil juga dapat disesuaikan. KLT mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya: waktu yang dibutuhkan tidak lama (2 - 5 menit) dan sampel yang dipakai relatif sedikit (2 - 20 µg). Akan tetapi, KLT tidak efektif digunakan untuk teknik preparatif. Walaupun lembaran KLT yang digunakan lebih lebar dan tebal, pemisahannya sering dibatasi hanya sampai beberapa miligram sampel saja (Mayo, 2000).

Teknik pengerjaan KLT dilakukan dengan menotolkan larutan cuplikan pada plat dengan pipet mikro atau injektor. Setelah proses pengeringan, plat siap untuk dikembangkan dengan fasa gerak sampai pada batas tertentu. Proses pengembangan dikerjakan dalam wadah tertutup yang diisi eluen dan telah dijenuhi uap eluen agar dihasilkan pemisahan yang baik (Anwar, 1994). Langkah selanjutnya yaitu mengeringkan sisa eluen dalam plat, kemudian melakukan identifikasi yang dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: pengamatan

langsung (untuk noda/bercak yang tampak), dengan lampu ultraviolet, atau dengan pereaksi semprot penimbul warna (Anwar, 1994).

2. Kromatografi Kolom

Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fasa yaitu fasa diam (*stationary*) dan fasa bergerak (*mobile*). Pemisahan pada kromatografi dapat terjadi karena adanya perbedaan interaksi antara komponen sampel dengan kedua fasa tersebut. Kromatografi dapat digolongkan berdasarkan sifat-sifat dari fasa diamnya, yaitu berupa zat padat atau zat cair. Jika fasa diam berupa zat padat maka cara tersebut dikenal kromatografi serapan (*absorption chromatography*); jika fasa diam berupa zat cair, dikenal sebagai kromatografi partisi (*partition chromatography*). Kromatografi kolom termasuk ke dalam kromatografi serapan (Sastrohamidjojo, 2002).

Dalam pengerjaan kromatografi kolom, dibutuhkan tabung pemisah yang diisi dengan bahan sorpsi dan juga pelarut pengembang yang berbeda. Tabung pemisah yang diisi dengan bahan sorpsi disebut kolom pemisah. Tergantung dari masalah pemisahan, kromatografi kolom dapat menggunakan tabung filter dengan gelas berpori yang pada ujung bawah menyempit atau tabung gelas yang pada ujung bawah menyempit dan dilengkapi dengan keran.

Pengisian tabung pemisah dengan adsorben, yang juga disebut kemasan kolom, harus dilakukan secara hati-hati. Alumunium oksida atau silika gel dapat diisikan

kering ke dalam tabung pemisah. Agar pengisian rata, tabung setelah diisi kemudian divibrasi, diketok-ketok atau dijatuhkan lemah pada pelat kayu. Adsorben lainnya harus diisikan sebagai suspensi, terutama jika zat ini menggelembung dengan pelarut pengembang. Yang umum dilakukan adalah, adsorben dibuat seperti bubur dengan pelarut elusi, kemudian dimasukan ke dalam tabung pemisah. Sebagai bahan sorpsi digunakan bahan yang sama dengan kromatografi lapis tipis yaitu silika gel, aluminium oksida, poliamida, selulosa, arang aktif, dan gula tepung.

Pada kromatografi kolom, zat yang berinteraksi lemah dengan fasa diam akan keluar dari kolom dengan lebih cepat. Zat yang keluar dari kolom disebut sebagai eluat. Eluat yang keluar kemudian ditampung dengan menggunakan sejumlah tabung reaksi sehingga menghasilkan beberapa fraksi.

F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas dalam isolasi senyawa bahan alam.

1. Kelebihan KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi mempunyai banyak keuntungan jika dibandingkan dengan kromatografi konvensional, yaitu :

a. Kecepatan

Dengan KCKT waktu analisis dapat dilakukan hanya dalam 15-30 menit.

Bahkan untuk analisis yang tidak rumit, dapat dicapai waktu analisis kurang dari 15 menit.

b. Daya Pisah

Jika dibandingkan dengan kromatografi konvensional, KCKT memiliki daya pisah yang lebih baik. Dalam KCKT dapat dilakukan elusi dengan metode gradien yang dapat meningkatkan daya pisah komponen-komponen senyawa dalam sampel.

c. Kepekaan

Detektor serapan UV yang biasa dipakai dalam KCKT dapat mendeteksi berbagai jenis senyawa dalam jumlah nanogram (10^{-9} g). Detektor fluoresensi dan elektrokimia dapat mendeteksi dalam jumlah pikogram (10^{-12} g).

d. Kolom yang dapat dipakai kembali

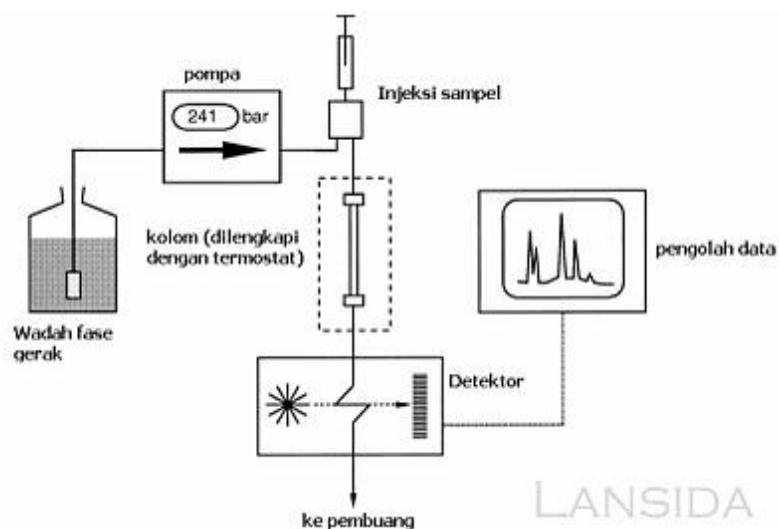
Berbeda dengan Kromatografi konvensional, kolom KCKT dapat dipakai kembali. Banyak analisis dapat dilakukan pada kolom yang sama sebelum kolom itu harus diganti. Akan tetapi, kolom tersebut turun mutunya, laju penurunan mutu itu bergantung pada jenis cuplikan yang disuntikkan, kemurnian pelarut dan jenis pelarut yang dipakai.

e. Mudah memperoleh kembali cuplikan

Sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak sehingga komponen cuplikan dapat dikumpulkan dengan mudah ketika mereka melewati detektor.

2. Sistem Peralatan KCKT

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas: wadah fasa gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fasa gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam. Diagram skematik sistem kromatografi cair seperti ini :



Gambar 2. Sistem peralatan KCKT

1. Wadah Fasa gerak dan Fasa gerak

Wadah fasa gerak harus bersih dan lembam (inert). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fasa gerak. Wadah ini

biasanya dapat menampung fasa gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fasa gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fasa diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fasa normal (fasa diam lebih polar dari pada fasa gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fasa terbalik (fasa diam kurang polar dari pada fasa gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut.

Fasa gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari adanya partikel-partikel kecil. Selain itu, adanya gas dalam fasa gerak juga harus dihilangkan, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis.

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fasa gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fasa gerak berubah-ubah selama elusi) yang analog dengan pemrograman suhu pada kromatografi gas. Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas. Fasa gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fasa terbalik adalah campuran larutan bufer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fasa normal, fasa gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau

menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fasa normal ini kurang umum dibanding dengan fasa terbalik.

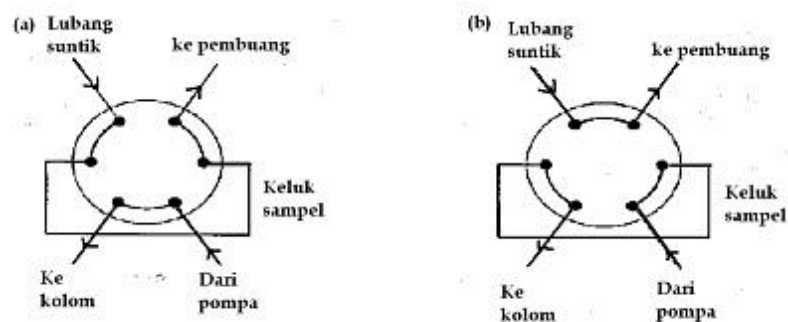
2. Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni: pompa harus inert terhadap fasa gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, Teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fasa gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fasa gerak dengan kecepatan 20 mL/menit.

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fasa gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fasa gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fasa gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fasa gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan.

3. Tempat penyuntikan sampel

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fasa gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal.



Posisi pada saat memuat sampel

Posisi pada saat menyuntikkan sampel

Gambar 3. Posisi injektor pada saat penyuntikkan sampel

4. Kolom dan Fasa diam

Ada 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor.

Kolom merupakan bagian KCKT yang mana terdapat fasa diam untuk berlangsungnya proses pemisahan solut/analit.

Kolom mikrobor mempunyai tiga keuntungan yang utama dibanding dengan kolom konvensional, yakni:

1. Konsumsi fasa gerak kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fasa gerak lebih lambat (10 -100 $\mu\text{L}/\text{menit}$).
2. Adanya aliran fasa gerak yang lebih lambat membuat kolom mikrobor lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.
3. Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat, karenanya jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

Meskipun demikian, dalam prakteknya, kolom mikrobor ini tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin. Maka dari itu, kolom konvensional lebih banyak digunakan dalam analisis KCKT karena dapat digunakan secara berulang.

Kebanyakan fasa diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Permukaan silika adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan. Reagen-reagen ini akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional yang lain.

Oktadesil silika (ODS atau C₁₈) merupakan fasa diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Silika-silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan.

5. Detektor KCKT

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu, detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan

tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut:

1. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel
2. Mempunyai sensitifitas yang tinggi.
3. Stabil dalam pengoperasiannya.
4. Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.
5. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier).
6. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fasa gerak.

G. Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

Pendeteksian senyawa secara ELSD masih relatif baru bila dibandingkan dengan teknik indeks bias. Konsep dasar pendeteksian detektor ini pada dasarnya melibatkan tiga tahapan proses. Tahap pertama adalah proses nebulasi pelarut dan sampel memanfaatkan aliran gas inert seperti nitrogen sehingga diperoleh tetesan halus yang homogen. Tahap kedua adalah penguapan dari fasa gerak sehingga di dapat tetesan patikel zat terlarut yang tidak mudah menguap. Tahap ke tiga selanjutnya adalah pendeteksian secara optik dalam hal ini intensitas hamburan

cahaya sebanding dengan massa zat terlarut yang melewati ruang pendeteksian optik.

Proses Nebulasi

Efisiensi proses nebulasi atau pengkabutan fasa gerak sangat bergantung kemampuan/rancangan alat untuk mengatur proses pengkabutan dengan aliran gas inert serendah mungkin. Pengaturan temperatur secara independen dan pencatatan aliran gas secara digital memungkinkan untuk mendapatkan kestabilan pengukuran serta kepadatan ulang. Untuk mengatasi *noise* dari *baseline* maka pengkabutan yang tidak sempurna dibuang melalui aliran pembuangan.

Evaporasi

Aliran pengkabutan dilewatkan melalui tabung penguap yang temperaturnya diatur secara independen yang kemudian pelarut di hilangkan pada pemanasan temperatur tinggi, dan meninggalkan partikel zat terlarut. Melalui perkembangan teknologi saat ini sangat dimungkinkan untuk melakukan proses penguapan dengan cepat sehingga pendeteksian hasil pemisahan tidak terganggu.

Pendeteksian

Setelah proses evaporasi, senyawa dalam sampel yang telah memisah dari pelarut ditembak dengan LED. Dalam proses ini, terdapat cahaya yang dipantulkan dan cahaya yang diteruskan. Banyaknya cahaya yang dipantulkan berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa dalam sampel.

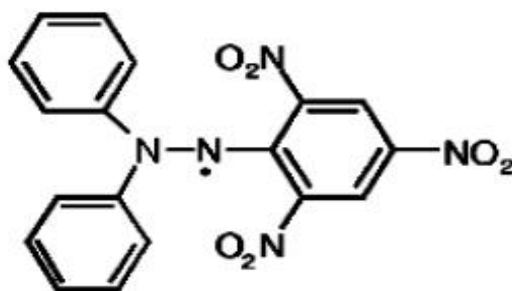
Secara sederhana diagram alat ELSD dapat terlihat pada gambar berikut:



Gambar 4. Diagram alat ELSD

H. DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Uji DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) adalah suatu metode yang cepat dan efektif untuk memperkirakan aktivitas antiradikal. Uji kimia ini telah digunakan secara luas pada penelitian fitokimia untuk menguji aktivitas penangkap radikal dari ekstrak atau senyawa murni. DPPH adalah suatu radikal stabil yang mengandung nitrogen organik, berwarna ungu gelap dengan absorbansi yang kuat pada λ_{maks} 517 nm. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan warna larutan akan berkurang dan berubah menjadi kuning. Senyawa antioksidan menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan perubahan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005). Perubahan warna ini dapat diukur secara spektrofotometri (Reynertson, 2007).



Gambar 5. Struktur DPPH (Ionita, 2005).

Kapasitas antiradikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH pada panjang gelombang 492 nm. Perhitungan kapasitas antiradikal bebas sebagai persen inhibisi dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada puncak 492 nm menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = [(C-S)/C] \times 100 \%$$

dengan C=absorbansi blanko
 S=absorbansi sampel

Nilai persen inhibisi dapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier untuk menentukan nilai IC_{50} dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi larutan yang dapat meredam 50% radikal bebas. Suatu senyawa dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan apabila memiliki nilai IC_{50} lebih kecil atau sama dengan $200 \mu\text{g/mL}$ (Blois, 1958).

I. Spektrofotometer *Infra Red* (IR)

Bila sinar IR dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi yang lain akan diteruskan. Karena atom-atom dalam suatu molekul tidak diam melainkan bervibrasi, maka penyerapan energi ini mengakibatkan terjadinya transisi diantara tingkat vibrasi dasar dan tingkat vibrasi tereksitasi. Metode ini juga digunakan dalam mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day and Underwood, 1989).

Secara praktik dalam kimia organik pemakaian panjang gelombang dibatasi antara 4000 sampai 400 cm^{-1} . Daerah antara $14.290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ disebut IR dekat dan

700 – 200 cm^{-1} IR jauh. Radiasi IR antara 10.000 – 100 cm^{-1} diserap dan dirubah oleh molekul organik menjadi energi molekular vibrasi. Penyerapan ini juga terkuantisasi, tetapi spektrum vibrasi menunjukkan ikatan-ikatan sebagai garis-garis dikarenakan perubahan suatu energi vibrasi tunggal diikuti dengan perubahan energi rotasi. Sebagian besar terjadi antara 4000 sampai 400 cm^{-1} , di sinilah yang perlu menjadi pusat perhatian. Frekuensi atau panjang gelombang absorpsi tergantung pada massa relatif atom-atom, tetapan gaya dari ikatan-ikatan, dan geometri atom-atom (Silverstein *et al.*, 1991).

Spektrum IR mempunyai karakteristik yang unik untuk setiap molekul maka dalam spektrum ini juga akan memberikan pita-pita serapan yang khas juga. Daerah yang mengandung sejumlah besar vibrasi tertentu yang tak dapat ditelaah yang berkisar dari 900 – 1400 cm^{-1} sering disebut juga daerah *finger print*. Untuk mengidentifikasi senyawa yang tak dikenal, seorang hanya perlu membandingkan spektrum IR dengan sederet spektrum standar yang dibuat pada kondisi yang sama. Dengan pengujian sejumlah besar senyawa-senyawa terhadap senyawa-senyawa yang sudah diketahui mengandung gugus fungsional yang dimilikinya, maka dapat diketahui serapan-serapan IR yang dikaitkan dengan gugus fungsional, dapat juga diperkirakan kisaran frekuensi dalam mana setiap serapan harus muncul. Sekarang bekerja dengan cara sebaliknya, jika mempunyai senyawa yang tidak diketahui yang memiliki gugus-gugus fungsional yang ingin diidentifikasi, maka dapat dilakukan dengan menguji struktur IR nya dan menggunakan data korelasi untuk mendeduksi gugus fungsional apa yang terdapat pada senyawa (Sastrohamidjojo, 1991).

Tabel 1. Data Korelasi Spektra IR

Tipe Vibrasi		Frekuensi (cm^{-1})	Panjang Gelombang (μ)	Intensitas
C-H	Alkana (Rentangan)	3000 – 2850	3,33 – 3,51	s
	-CH ₃ (Bengkokan)	1450 dan 1375	6,90 dan 7,27	m
	-CH ₂ (Bengkokan)	1465	683	m
Alkena	(Rentangan)	3100 – 3000	3,23 – 3,33	m
	(Serapan ke luar Bidang)	900 – 650	10,0 – 15,3	s
Aromatik	(Rentangan)	3159 – 3050	3,17 – 3,28	s
	(Serapan ke luar Bidang)	900 – 650	11,1 – 14,5	s
Alkuna	(Rentangan)	± 330	+3,03	s
Aldehid		2900 – 2800	3,45 – 3,57	w
		2800 – 2700	3,57 – 3,70	w
C=C	Alkena	1680 – 1600	5,95 – 6,25	m-w
	Aromatik	1600 – 1475	6,25 dan 6,78	m-w
C C	Alkuna	2250 – 2100	4,44 – 4,75	m-w
C=O	Aldehid	1740 – 1720	5,75 – 5,81	s
	Keton	1725 – 1705	5,80 5,87	s
	Asam Karboksilat	1725 – 1700	5,80 – 5,88	s
	Ester	1750 – 1730	5,71 – 5,78	s
	Amida	1670 – 1640	6,00 – 6,10	s
	Anhidrida	1810 dan 1760	5,52 dan 5,68	s
Asam Klorida		1800	5,56	s
C-O	Alkohol, Ester, Eter, Asam Karboksilat, Anhidrida	1300 – 1000	7,69 – 10,0	s
O-H	Alkohol, fenol			
	-bebas	3650 – 3600	2,74 – 2,78	m
	Ikatan –H	3500 – 3200	2,86 – 3,13	m
	Asam Karboksilat	3400 – 2400	2,94 – 4,17	m
N-H	Amida primer dan sekunder dan amina (Rentangan) (Bengkokan)	3500 – 3100 1640 – 1550	2,68 – 3,23 6,10 – 6,45	m m-s
C-N	Amina	1350 – 1000	7,4 – 10,0	m-s
C=N	Imin dan Oksim	1690 – 1640	5,92 – 6,10	m-s
C N	Nitril	2260 – 2240	4,42 – 4,46	m
X=C=Y	Allen, Keten, Isosianat, Isotiosianat	2270 – 1950	4,40 – 5,13	m-s
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 dan 1350	6,45 dan 7,40	s
S-H	Merkaptan	2550	3,92	w
S=O	Sulfoksida	1050	9,52	s
	Sulfon, Sulfonil Klorida	1375 – 1300	7,27 – 7,69	s
	Sulfat, Sulfonamida	1200 - 1140	8,33 – 8,77	s
C-X	Florida	1400 – 1000	7,14 – 10,0	s
	Klorida	800 – 600	12,5 – 16,7	s
	Bromida, Iodida	667	15,0	s

(Sastrohamidjojo, 1991)