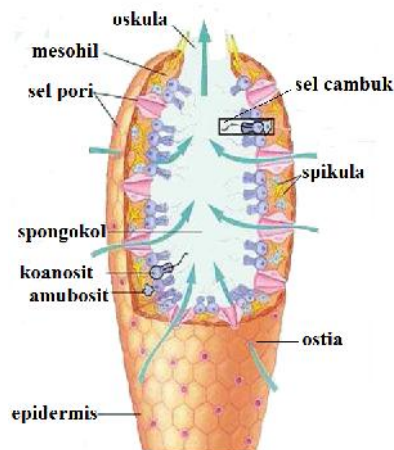


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sponga

Sponga merupakan invertebrata multiseluler paling sederhana yang tidak mempunyai organ maupun jaringan, hidup di air laut, dan beberapa di air tawar. Sponga bertubuh lunak, berpori, berlendir dan hidupnya menetap pada suatu tempat (Erickson *et al.*, 1997). Sebagai hewan *sessile*, sponga hidup menempel pada karang atau batuan dan berperan sebagai *filter feeder* untuk mempertahankan hidupnya.



Gambar 1. Salah satu struktur sel sponga yang paling sederhana.

Sponga terdiri dari sistem pori, *ostia*, kanal, dan ruangan yang digunakan untuk mengalirkan air yang dipompa ke seluruh bagian (Gambar 1). Air mengalir melewati sponga dengan suatu alat sel khusus, suatu cambuk yang

melingkar seperti filamen (Peraud, 2006). Air dipompa melalui *ostia*, kemudian disaring melalui suatu jaringan yang berbentuk kanal-kanal dan ruangan, lalu dikeluarkan melalui lubang pada bagian atas sponga (oskula). Sistem pori dan kanal ini memungkinkan bagi air untuk masuk dan bersirkulasi di mana mikroorganisme dan partikel organik disaring dan dimakan (Lee *et al.*, 2001).

Sponga tergolong ke dalam filum Porifera. Menurut Van Soest *et al.* (2010), filum Porifera dibagi menjadi empat kelas besar, yaitu *Calcarea*, *Demospongiae*, *Hexactinellida*, dan *Sclerospongia*. Kelas *Calcarea* (terdiri dari 5 ordo dan 24 famili) adalah kelas sponga yang semuanya hidup di laut. Sponga ini mempunyai struktur paling sederhana dengan spikula yang terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk kalsit. Kelas *Demospongiae* (terdiri dari 15 ordo dan 92 famili) adalah kelompok sponga yang terdominan di antara Porifera masa kini, tersebar luas di alam, serta jumlah dan jenis organismenya sangat bervariasi. Kelompok *Demospongia* berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, memiliki spikula yang terdiri dari silikat, namun ada beberapa (*Dictyoceratida*, *Dendroceratida*, dan *Verongida*) yang hanya terdiri dari serat spongin dan serat kolagen. Kelas *Hexactinellida* (terdiri dari 6 ordo dan 20 famili) merupakan sponga gelas yang kebanyakan hidup di laut dalam, memiliki spikula terdiri dari silikat, dan tidak mengandung spongin. Kelas *Sclerospongia* merupakan sponga yang kebanyakan hidup pada perairan dalam di terumbu karang, celah-celah batuan bawah laut, gua, atau terowongan di terumbu karang. Sponga kelas

ini memiliki spikula silikat dan serat spongin (Amir dan Budiyanto, 1996; Peraud, 2006; Ackers *and* Moss, 2007).

Telah dilaporkan bahwa sponga merupakan inang bagi banyak mikroorganisme (Lee *et al.*, 2001; Sjogren, 2006). Sponga berasosiasi dengan banyak mikroorganisme termasuk *archaea*, bakteri heterotropik, sianobakteria, alga hijau, alga merah, kriptopita, dinoflagellata, dan *actinomycetes* (Lee *et al.*, 2001; Mahyudin, 2008). Diperkirakan hubungan simbiotik antara sponga dan mikroorganisme ini saling memberikan keuntungan satu sama lain. Permukaan internal sponga kaya akan bahan makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme (Lee *et al.*, 2001). Di sisi lain, mikroorganisme membantu sponga dalam proses nutrisinya, seperti dalam digesti intraseluler dan translokasi metabolit termasuk fiksasi nitrogen, nitrifikasi, dan fotosintesis (Wilkinson *and* Garrone, 1980). Selain itu mikroorganisme juga membantu menstabilkan kerangka sponga serta berpartisipasi dalam sistem pertahanan sponga terhadap predator dengan menghasilkan senyawa tertentu (Proksch, 1994).

Berbagai senyawa bioaktif telah berhasil diisolasi dari sponga. Namun, beberapa hasil penelitian lain menunjukkan bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan sponga juga menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama. Sebagai contoh, senyawa manzamine yang mempunyai aktivitas sebagai antitumor, antimikroba, dan antiparasit yang telah diisolasi dari sponga *Acanthostrongylophora* sp., terdapat pula pada mikroorganisme

Micromonospora sp. yang berasosiasi dengan sponga *Acanthostrongylophora* sp. (Peraud, 2006).

B. Actinomycetes

Actinomycetes merupakan mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi karena memiliki sifat-sifat seperti bakteri dan fungi (Alexander, 1997).

Meskipun demikian, *actinomycetes* adalah bakteri sejati yang memiliki sel prokariotik dan peka terhadap antibiotik (Gupte, 1990). *Actinomycetes* merupakan kelompok bakteri gram positif, berbentuk batang, dan memiliki miselium yang sangat halus dan bercabang-cabang. Miselium pada *actinomycetes* dapat berupa miselium udara dan miselium substrat yang mempunyai konidia berisi spora (Atlas, 1995). *Actinomycetes* dapat berkembang biak dengan spora, khlamidospora, tunas, secara fragmentasi, dan segmentasi. *Actinomycetes* umumnya mempunyai habitat pada rentang suhu 28-37°C dan rentang pH 6,5-8. Cara hidupnya ada yang bersifat saprofit, simbiosis, dan beberapa sebagai parasit. Pada media agar, koloni *actinomycetes* dapat dibedakan dari koloni bakteri yang biasanya tumbuh cepat dan berlendir. Koloni *actinomycetes* tumbuh lambat, berbubuk (melekat pada permukaan agar), dan penampakannya berbeda dari jamur yang berserabut seperti kapas. Pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan adanya miselium panjang yang bercabang dengan diameter hifa kurang dari 1µm (Subbarao, 1994).

Berdasarkan morfologinya, *actinomycetes* dibagi menjadi beberapa kelas, yaitu *Nocardioform*, *Multilocular*, *Actinoplanes*, *Streptomycetes*,

Maduromycetes, *Thermomonospora*, dan *Thermoactinomycetes*.

Nocardioform terdiri dari 11 genus dengan ciri-ciri filamen mengalami fragmentasi, diameter filamen 0,5 – 1,2 μm , rantai konidia terdapat pada miselium substrat dan udara, dan bersifat mesofilik. *Multilocular* terdiri dari 3 genus dengan ciri-ciri diameter hifa 0,5 – 2,0 μm , tidak memiliki miselium udara, sporangiospora nonmotil, membentuk bintil akar pada tanaman yang bukan kacang-kacangan. *Actinoplanes* terdiri dari 5 genus dengan ciri-ciri diameter miselium 0,5 μm , tanpa miselium udara, dan spora dibentuk pada miselium substrat. *Streptomyces* terdiri dari 4 genus dengan ciri-ciri diameter hifa 0,5 – 2,0 μm , rantai terdiri dari tiga hingga beberapa spora, memiliki miselium udara, dan dapat memproduksi antibiotik.

Maduromycetes terdiri dari 7 genus dengan ciri-ciri memiliki hifa udara, bentuk sporangiospora gelondong, hifa tidak bercabang dan hidrolisat berisi madurose (metil galaktosa). *Thermomonospora* terdiri dari 4 genus dengan ciri-ciri bercabang tanpa fragmentasi, filamen berbentuk koloni tipis, spora dibentuk pada sekelompok cabang sporangiospora. *Thermoactinomycetes* (hanya 1 genus) memiliki ciri-ciri miselium substrat bercabang, berseptata, memiliki diameter hifa 0,4 – 0,8 μm , dan membentuk endospora. Beberapa jenis *actinomycetes* yang telah berhasil diisolasi dari sponsa adalah *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Bradybacterium*, dan *Salinispora* (Peraud, 2006).

Actinomycetes merupakan sumber penting penghasil senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif (Gorajana, 2005). Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dari *actinomycetes* laut disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Senyawa metabolit sekunder bioaktif yang telah diisolasi dari *actinomycetes* (Jensen *et.al.*, 2006).

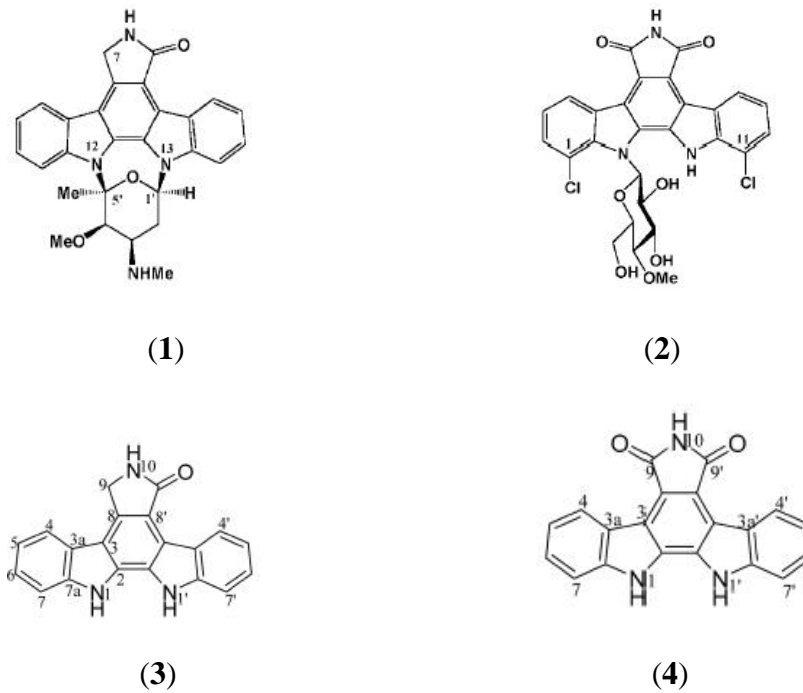
No	Senyawa	Sumber	Aktivitas biologi	Molekul target
1.	Salinosporamid A	<i>S. tropica</i>	Antikanker	Proteasome
2.	Sporolid A	<i>S. tropica</i>	-	-
3.	Rifamycin	<i>S. arenicola</i>	Antibiotik	RNA polimerase
4.	Staurosporine	<i>S. arenicola</i>	Antikanker	Protein kinase
5.	Arenicolide A	<i>S. arenicola</i>	-	-
6.	Cyclomarin A	<i>S. arenicola</i>	Antiinflamasi Antivirus	- -
7.	Cyanosporaside A	<i>S. pacifica</i>	-	-
8.	Salinispyrone A	<i>S. pacifica</i>	-	-

C. Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu organisme yang tidak terlibat langsung dalam proses pertumbuhan, perkembangan, atau reproduksi organisme (Faulkner, 2000) dan dihasilkan sebagai bentuk adaptasi organisme terhadap lingkungannya. Fungsi senyawa ini pada suatu organisme diantaranya untuk bertahan hidup terhadap predator, kompetitor, dan untuk mendukung proses reproduksi. Tanpa senyawa ini organisme akan menderita kerusakan atau menurunnya kemampuan bertahan hidup. Beberapa metabolit yang dihasilkan oleh organisme tampaknya merupakan ciri khas dari tempat organisme itu berada. Pencarian senyawa metabolit sekunder baru seringkali difokuskan pada organisme-organisme yang hidup di tempat yang sifatnya unik (Putri dan Atmosukarto, 2006).

Senyawa metabolit sekunder umumnya memiliki keragaman struktur yang tinggi serta arsitektur atau susunan struktur yang relatif lebih kompleks dari molekul sintetik. Mayoritas senyawa ini tergolong dalam satu kelompok kelas, di mana masing-masing memiliki karakteristik struktur khusus tergantung dari cara terbentuknya di alam (proses biosintesis). Kelas senyawa metabolit sekunder meliputi poliketida dan asam lemak, terpenoid dan steroid, fenilpropanoid, alkaloid, asam amino dan peptida khusus, serta karbohidrat tertentu.

Metabolit sekunder *actinomycetes* mempunyai keragaman struktur dan bioaktivitas (Berdy, 2005). Golongan senyawa metabolit sekunder dari *actinomycetes* antara lain adalah alkaloid, steroid, polifenol, dan terpenoid (Jensen *et al.*, 1991, Gorajana *et al.*, 2005; Onaka, 2006) dengan aktivitas antara lain sebagai antimikroba (antibakteri, antijamur, antiprotozoa), antitumor dan antivirus. Sebagai contoh, senyawa bioaktif *staurosporine* (**1**) dan *rebeccamycin* (**2**) yang diisolasi dari *Streptomyces* sp. dan *Lechevalieria aerocolonigenes* merupakan senyawa turunan indolkarbazol yang memiliki aktivitas sebagai antitumor (Onaka, 2006). Liu *et al.* (2007) juga berhasil mengisolasi dua senyawa alkaloid turunan indolkarbazol yaitu K252c (**3**) dan *arcyriaflavin A* (**4**) dari *actinomycetes* Z2039-2 yang memiliki aktivitas sebagai antikanker. Struktur dari senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** disajikan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Struktur dari *staurosporine* (1), *rebeccamycin* (2), K252c (3) dan *arcyriaflavin A* (4)

D. Antioksidan

Proses oksidasi adalah peristiwa alami yang terjadi di alam dan dapat terjadi di mana saja tak terkecuali di dalam tubuh kita. Metabolisme oksidatif penting untuk pertahanan sel. Efek samping dari metabolisme ini adalah dihasilkannya radikal bebas dan spesies oksigen reaktif lainnya yang dapat menyebabkan perubahan oksidatif. Jumlah radikal bebas yang berlebih menyebabkan kerusakan sel oleh oksidasi membran lipid, sel protein, DNA, dan enzim, sehingga terjadi mutasi atau bahkan kematian sel. Peristiwa tersebut menjadi salah satu penyebab berbagai penyakit degeneratif, seperti kanker dan penuaan dini (Percival, 1998).

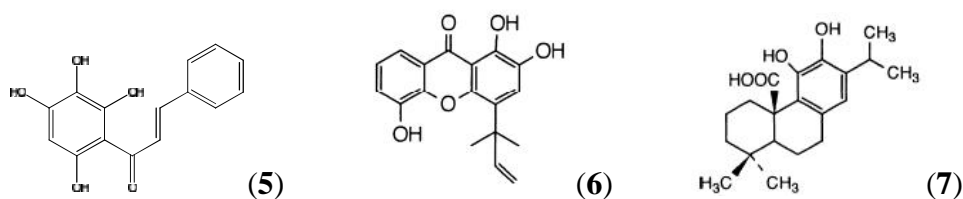
Secara umum, antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu zat yang dapat menghambat atau memperlambat proses oksidasi. Karakteristik utama antioksidan adalah kemampuannya menangkap dan meredam radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu molekul, ion, atau spesies yang tidak stabil, liar, dan radikal karena memiliki elektron tidak berpasangan. Akibatnya, radikal bebas selalu berusaha mencari pasangan elektron dengan cara merebut elektron dari molekul lain yang selanjutnya akan menghasilkan senyawa radikal baru. Akan tetapi antioksidan bereaksi dengan radikal bebas membentuk radikal tak reaktif yang relatif stabil, sehingga dapat menghentikan reaksi berantai tersebut (Antholovich, 2002).

Berdasarkan fungsinya, antioksidan dikelompokkan menjadi tiga golongan, yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer ini bekerja untuk mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru. Contoh antioksidan ini adalah enzim superoksida dismutase (SOD) yang berfungsi sebagai pelindung hancurnya sel-sel dalam tubuh serta mencegah proses peradangan karena radikal bebas. Antioksidan sekunder berfungsi menangkap senyawa serta mencegah terjadinya reaksi berantai. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E, vitamin C, dan β -karoten.

Antioksidan tersier berfungsi memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas. Contoh antioksidan ini adalah metionin sulfoksidan reduktase, enzim yang memperbaiki DNA pada inti sel. Adanya enzim yang dapat memperbaiki DNA ini berguna untuk mencegah penyakit kanker (Antholovich, 2002).

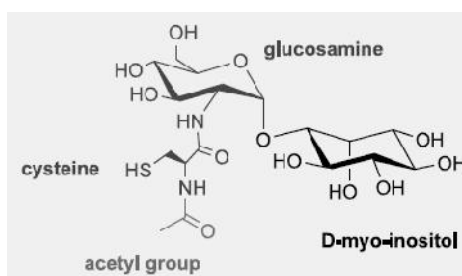
Sebenarnya, sistem antioksidan secara alami telah ada dalam tubuh manusia untuk mekanisme pertahanan tubuh dari radikal bebas. Antioksidan yang diproduksi dari dalam tubuh (endogen) berupa tiga enzim, yaitu superoksida dismutase, glutathion peroksidase, katalase, serta non enzim, yaitu senyawa protein kecil glutathion. Meskipun sistem antioksidan secara alami telah ada dalam tubuh, namun tidak bisa dipungkiri bahwa jumlah radikal bebas dalam tubuh akan meningkat karena pengaruh dari lingkungan, seperti polusi kendaraan, asap rokok, radiasi, stres, pengaruh zat kimia, dan obat (Percival, 1998). Akibatnya, kemampuan antioksidan untuk meredam radikal bebas menjadi berkurang. Oleh karena itu diperlukan antioksidan dari luar tubuh (eksogen) yang berasal dari alam ataupun sintetik.

Berbagai senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan telah berhasil diisolasi dari bahan alam. Beberapa golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan antara lain golongan fenolat, flavonoid, terpenoid, dan alkaloid yang merupakan senyawa-senyawa polar (Rahman and choudhary, 2001; Haraguchi, 2001). Beberapa contoh senyawa antioksidan yang berhasil diisolasi dari tanaman adalah 2',3',4',6'-tetrahidroksi calkon (**5**) (Mohamad *et al.*, 2004), *globuxanthone* (**6**), dan asam karnosat (**7**) (Haraguchi, 2001) disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Contoh senyawa antioksidan dari tanaman

Informasi mengenai senyawa antioksidan dari *actinomycetes* masih terbatas. Salah satu contoh senyawa antioksidan dari *actinomycetes* adalah senyawa mycothiol. *Mycothiol* merupakan senyawa thiol yang dominan pada kebanyakan *actinomycetes* (Rawat and Av-Gay, 2007). Struktur *mycothiol* disajikan pada Gambar 4.

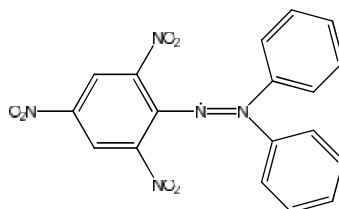


Gambar 4. Struktur mycothiol

Penapisan Senyawa Antioksidan

Saat pencarian senyawa metabolit aktif atau senyawa target baru, prosedur yang umum dilakukan melibatkan tahapan penapisan senyawa bioaktif yang dijadikan petunjuk tahapan isolasi (*bioassay-guided isolation*) (Ghisalberti, 2008). Penapisan merupakan suatu uji atau *biological assay* yang digunakan untuk menentukan keberadaan dan level aktivitas senyawa target dalam sampel tertentu. Metode uji bioaktivitas dalam penapisan juga haruslah cepat, sederhana, relevan, biaya efektif, dan dapat dilakukan secara otomatis (Spainhour, 2005). Teknologi yang tepat juga harus digunakan untuk mendapatkan batas deteksi terendah karena konsentrasi senyawa yang diinginkan dalam tiap sampel belum diketahui.

Ada beberapa metode untuk penapisan senyawa antioksidan. Metode seperti TBARS (*Thiobarbituric Acid - reactive – substances*), ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] *radical cation*, dan ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) *assay* telah banyak digunakan (Antolovich *et al.*, 2001). Tetapi metode-metode tersebut memerlukan peralatan khusus dan kemampuan teknik yang tinggi. Secara umum, metode pendahuluan yang sering digunakan untuk penapisan senyawa antioksidan adalah menggunakan radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Mohamad *et al.*, 2004., Marxen *et al.*, 2007). Metode ini sangat sederhana, mudah, cepat, dan tidak spesifik terhadap antioksidan tertentu (Prakash *et al.*, 2001). DPPH merupakan radikal bebas yang cukup stabil dalam larutan metanol. DPPH memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm (Molyneux, 2004). Struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur DPPH

Salah satu alat yang efisien untuk digunakan dalam penapisan adalah *microplate reader*. Dengan menggunakan *plate-96 well*, sampel yang diperlukan relatif sedikit. Selain efisien, metode penapisan menggunakan alat ini juga ekonomis dan dapat dilakukan secara simultan dalam jumlah banyak secara bersamaan, sehingga cukup menghemat waktu (Amouretti, 2006). Selain itu, ruang sampel analisis tertutup, sehingga mengurangi

kontaminasi dengan udara. Kelemahan dari alat ini adalah pengukuran sampel terbatas hanya pada panjang gelombang tertentu sesuai dengan filter yang dimiliki oleh alat (Ahmadi, 2010).

E. Metode Isolasi Senyawa Bahan Alam

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau 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 (Harborne, 1984).

Salah satu langkah penting yang menentukan keberhasilan ekstraksi adalah pemilihan pelarut. Parameter yang menentukan dalam pemilihan pelarut adalah koefisien distribusi dan selektivitas. Koefisien distribusi atau koefisien partisi merupakan konstanta kesetimbangan yang dihubungkan dengan kelarutan relatif suatu zat terlarut dalam dua pelarut. Selektivitas diartikan sebagai kemampuan suatu pelarut untuk mengekstrak suatu zat terlarut. Sifat yang diharapkan untuk suatu pelarut adalah koefisien distribusi tinggi dan selektivitas yang baik. Selain itu, pelarut yang digunakan hendaknya mudah dipisahkan. Faktor lain yang mempengaruhi pemilihan pelarut adalah titik didih, densitas, viskositas, titik nyala, dan toksisitas (Svehla, 1985).

2. Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan dua atau lebih senyawa yang terdistribusi antara dua fasa yang saling tidak melarut, yaitu fasa diam dan fasa gerak. Kromatografi dapat dibedakan berdasarkan kedua fasa tersebut, yaitu kromatografi padat-cair, kromatografi cair-cair, dan kromatografi gas-cair (Hostettman dkk., 1995).

a. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu kromatografi padat-cair dengan fasa diam dilekatkan pada lempeng tipis alumunium atau kaca. Teknik ini bermanfaat untuk identifikasi komponen serta pemilihan fasa gerak untuk kromatografi kolom dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sampel yang akan dipisah (berupa larutan) ditotolkan pada plat KLT, kemudian plat dimasukkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang (fasa gerak). Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (Hostettman dkk., 1995). Pada kromatografi lapis tipis, fasa diam (adsorben) yang sering digunakan adalah serbuk silika gel, alumina, dan selulosa yang mempunyai ukuran butir 0,063-0,125 mm. Fasa diam silika gel digunakan untuk memisahkan campuran senyawa lipofilik, sebaliknya fasa diam C₁₈ untuk memisahkan campuran senyawa hidrofilik (Hostettman dkk., 1995).

Komponen-komponen senyawa yang dianalisis dapat dipisahkan dan dibedakan berdasar harga Faktor retensi/*Retention Factor* (Rf). Faktor retensi didefinisikan sebagai perbandingan jarak perjalanan suatu senyawa

dengan jarak perjalanan suatu pelarut (eluen). Harga R_f ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, kandungan air, ketebalan), dan sebagainya (Khopkar, 2002).

$$R_f = \frac{\text{Jarak perjalanan suatu senyawa}}{\text{Jarak perjalanan suatu eluen}}$$

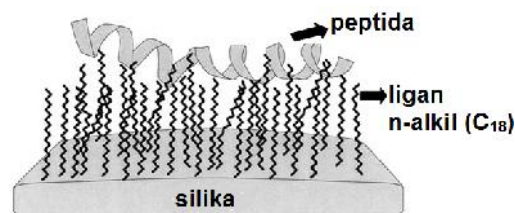
Keuntungan KLT adalah dapat memisahkan komponen dari sampel dalam waktu singkat dengan peralatan yang relatif tidak terlalu mahal. Metode ini memiliki kepekaan cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram. Namun, KLT tidak dapat digunakan untuk pemisahan sampel dalam jumlah besar (Hostettman dkk., 1995).

b. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu teknik kromatografi untuk pemisahan komponen dari suatu campuran senyawa. Proses pemisahan komponen-komponen suatu zat terjadi karena adanya perbedaan daya adsorpsi terhadap fasa diam dari masing-masing komponen tersebut. Fasa diam diisikan ke dalam kolom gelas, sedangkan fasa gerak disesuaikan dengan sampel yang akan dipisahkan. Metode elusi dapat dilakukan dengan elusi isokratik atau elusi landaian. Metode elusi isokratik menggunakan komposisi eluen yang tidak berubah selama proses pemisahan berlangsung. Elusi landaian adalah kebalikan dari elusi isokratik, di mana terjadi perubahan komposisi eluen saat proses pemisahan berlangsung (Johnson dan Stevenson, 1991).

c. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan hasil pengembangan teknik kromatografi konvensional. Saat ini KCKT telah umum digunakan dalam isolasi senyawa bahan alam dan uji kemurnian senyawa hasil isolasi (Hostettmann *et al.*, 1998). Secara khusus, KCKT juga memainkan peran penting dalam kajian tingkat lanjut bidang biologi dan biomedik. Metode analisis sampel yang paling umum digunakan adalah KCKT fasa terbalik (fasa gerak lebih polar dari fasa diam), meskipun mekanisme pemisahan KCKT fasa normal (fasa diam lebih polar dari fasa gerak) juga bisa digunakan (Aguilar, 2008). KCKT fasa terbalik melibatkan pemisahan molekul berdasarkan hidrofobisitas seperti terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema interaksi peptida dengan ligan hidrofobik amobil

Hasil pemisahan pada KCKT fasa terbalik bergantung pada sifat ikatan hidrofobik molekul terlarut dalam fasa gerak terhadap ligan hidrofobik amobil yang terikat pada fasa diam. Secara teknis, campuran zat terlarut mula-mula diaplikasikan pada kolom menggunakan alat suntik (*injector*) dan dielusi dengan pelarut organik sebagai fasa gerak. Seperti pada kromatografi kolom, proses elusi dapat berupa isokratik atau dengan elusi landaian. Komponen campuran zat terlarut dielusi berdasarkan peningkatan

hidrofobisitas. Komponen yang bersifat hidrofil akan cenderung lebih mudah terelusi dibandingkan komponen hidrofobik (Aguilar, 2008).

KCKT merupakan suatu teknik yang sangat berperan untuk analisis senyawa bahan alam karena beberapa faktor (Aguilar *and* Hearn, 1996; Mant *and* Hodges, 1996). Pertama, KCKT memiliki daya resolusi terbaik untuk molekul-molekul yang memiliki kemiripan struktur. Kedua, kemudahan pengerjaan untuk mendapatkan selektivitas kromatografi yang tinggi karena dapat dimanipulasi melalui perubahan sifat fasa gerak. Ketiga, umumnya sampel dapat diperoleh kembali (*high recovery*). Keempat, reproduksibilitas tinggi dari pemisahan berulang yang dilakukan dalam jangka waktu lama karena bahan fasa diam memiliki stabilitas terhadap rentang kondisi yang luas, misalnya pH, tekanan, dan temperatur.

Berbagai sistem deteksi pada KCKT telah banyak dikembangkan, seperti UV (*ultra-violet*), fluoresen, MS (*mass spectroscopy*), dan ELS (*evaporative light scattered*) (McCalley, 2002). Akan tetapi, analisis KCKT dengan deteksi UV merupakan analisis yang banyak digunakan dalam analisis senyawa alkaloid, peptida, dan protein. Sistem deteksi UV dapat dikembangkan menggunakan instrumen *photodiode array* (PDA), yang dapat menghasilkan spektra analit lengkap sebaik puncak spektra KCKT konvensional. Detektor ini memiliki sensitivitas rendah dibandingkan dengan detektor panjang gelombang konvensional, namun permasalahan tersebut sebagian besar telah diatasi oleh produsen alat. Permasalahan umum pada spektra UV adalah pelebaran pita serapan yang dapat menyebabkan masalah dalam identifikasi kualitatif.

Kesulitan lainnya adalah perubahan dalam spektra yang dapat terjadi untuk senyawa ionik dengan perubahan pH.

F. Spektroskopi

Spektroskopi merupakan ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara energi cahaya dan materi. Beberapa keuntungan dari penggunaan metode spektroskopi adalah jumlah zat yang diperlukan untuk analisis relatif kecil dan waktu pengerjaannya relatif cepat (Silverstein *et al.*, 2005). Pada penelitian ini alat spektroskopi yang digunakan adalah *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

1. *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa. Gugus fungsi ini dapat ditentukan berdasarkan energi vibrasi ikatan antar atom dalam molekul. Senyawa organik memiliki energi ikatan kovalen yang berbeda-beda, sehingga menghasilkan jenis vibrasi dan serapan yang berbeda-beda pada suatu spektrum infra merah. Spektrum infra merah/*infra red* (IR) merupakan grafik antara panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) dan persen transmisi (%T) atau absorbansi (A) (Silverstein *et al.*, 2005).

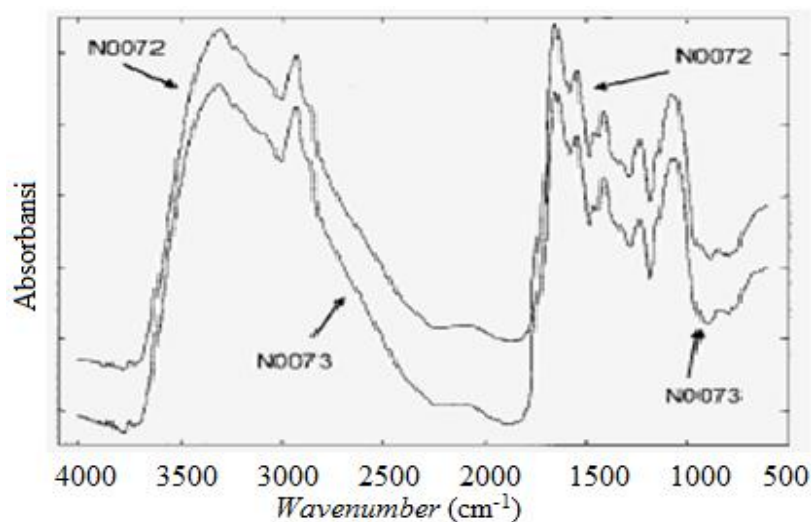
Radiasi infra merah antara $10.000 - 100 \text{ cm}^{-1}$ diserap dan dirubah oleh molekul organik menjadi energi molekular vibrasi. Penyerapan ini juga terkuantisasi, tetapi spektrum vibrasi menunjukkan ikatan-ikatan sebagai garis-

garis dikarenakan perubahan suatu energi vibrasi tunggal diikuti dengan perubahan energi rotasi. Sebagian besar hal ini terjadi antara 4000 sampai 400 cm^{-1} , di sinilah yang perlu menjadi pusat perhatian. Frekuensi atau panjang gelombang absorpsi tergantung pada masa relatif atom-atom, tetapan gaya dari ikatan-ikatan, dan geometri atom-atom. Daerah antara 1400-4000 cm^{-1} merupakan daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus fungsional penting seperti gugus C=O, O-H, dan N-H. Daerah ini menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh vibrasi uluran. Daerah antara 1400-900 cm^{-1} (daerah sidik jari) sering sangat rumit karena menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh vibrasi uluran dan tekukan. Tiap molekul memberikan serapan yang unik pada daerah sidik jari. Daerah antara 900-650 cm^{-1} menunjukkan klasifikasi umum dari molekul. Adanya absorbansi pada daerah bilangan gelombang rendah dapat memberikan data yang baik akan adanya senyawa aromatik, dimer karboksilat, amina, atau amida (Silverstein *et al.*, 2005).

2. Dereplikasi Menggunakan Spektroskopi FTIR

Saat ini aplikasi FTIR telah dikembangkan untuk analisis dereplikasi. Metode analisis dereplikasi dengan FTIR relatif lebih cepat dan menghemat biaya. Zhao *et al.* (2004) telah membuktikan bahwa isolat *actinomyces* N0072 dan N0073 dapat dibedakan dengan metode FTIR seperti terlihat pada Gambar 7. Gambar tersebut memberikan informasi mengenai gugus-gugus asam lemak (daerah 3500-2800 cm^{-1}), protein dan peptida (daerah 1700-1500 cm^{-1}), dan polisakarida (1200-900 cm^{-1}). Serapan yang perlu diperhatikan adalah daerah

sidik jari (900-700 cm^{-1}) yang memberikan karakteristik serapan pada tingkat spesies isolat N0072 dan N0073, walaupun hanya beberapa puncak yang dapat menandakan vibrasi spesifik.



Gambar 7. Pola spektra FTIR isolat *actinomycetes* N0072 dan N0073.

Berdasarkan uraian di atas metode analisis ini dapat digunakan untuk mencegah adanya dereplikasi isolat *actinomycetes*. Hasil kajian lebih lanjut juga membuktikan bahwa identifikasi daerah sidik jari spektrum FTIR pada *actinomycetes* juga memberikan hasil yang identik dengan hasil identifikasi menggunakan analisis sekuensing 16S rRNA pada tingkat spesies (Zhao *et al.*, 2004).