

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Malaria

##### 2.1.1 Etiologi

Di Indonesia, ditemukan 4 spesies parasit malaria yang menginfeksi manusia yaitu *P. falcifarum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale*. Spesies yang paling banyak ditemukan ialah *P. falcifarum* dan *P. vivax* (Ahmadi, 2008). Dari empat spesies malaria, spesies yang dianggap paling berbahaya adalah *P. falcifarum* karena paling mematikan dibanding ketiga jenis lainnya yang umumnya kurang berbahaya dan tidak mengancam hidup. *Plasmodium falcifarum* menyebabkan malaria tertian maligna atau malaria tropika (Hasibuan, 2010). Saat ini telah ditemukan spesies baru Plasmodium yang dapat menyerang manusia, yaitu *Plasmodium knowlesi*, suatu spesies Plasmodium alami kera di Asia Tenggara. Spesies kelima *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*), ditemukan pertama kali pada kera berekor panjang dan ternyata juga bisa menjadi patogen untuk manusia dan telah ditemukan di Indonesia. (McCutchan *et al*, 2008; Sulistyaningsih *et al*, 201).

Malaria ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung *Plasmodium*. Genus *Anopheles* terdiri dari 400 spesies, 80 spesies diantaranya terbukti sebagai vektor malaria, dan 22 diantaranya ditemukan di Indonesia (Ahmadi, 2008). Di Indonesia, insiden dan prevalensi malaria yang tinggi mayoritas disebabkan infeksi *P. falciparum* dan *P. vivax* (Karyana *et al*, 2008).

### 2.1.2 Siklus Hidup *Plasmodium*

Siklus hidup *Plasmodium* spp. dapat dibagi menjadi dua, aseksual dan seksual. Fase aseksual terjadi di dalam tubuh manusia dan fase seksual terjadi di dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Fase aseksual dibagi menjadi dua, fase pre-eritrosit dan fase eritrosit (Brooks, *et al.*, 2004).

Semua *Plasmodium* spp. ditransmisikan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Pada saat nyamuk menggigit manusia, sporozoit yang berada di dalam kelenjar ludah masuk melalui pembuluh darah. Sporozoit beredar dalam darah dalam waktu yang singkat kemudian menginvasi hepatosit. Parasit berkembang menjadi skizon exoeritrositik di dalam hepar antara 7-10 hari. Setelah hepatosit ruptur maka skizon akan lepas ke peredaran darah dan ribuan merozoit akan menginvasi eritrosit. Pada *P. vivax* dan *P. ovale*, beberapa parasit akan dorman di dalam hepar membentuk hipnozoit dan akan keluar sewaktu-waktu menyebabkan terjadinya relaps. Sedangkan, *P. falciparum* dan *P. malariae* tidak memiliki fase hipnozoit atau fase dorman (Gillespie & Richard, 2001).

Fase eritrosit dimulai ketika merozoit mulai menginvasi eritrosit. Sebuah skizon exoeritrositik mengandung 10000 – 30000 merozoit yang dapat dilepaskan dan menginvasi eritrosit. Ketika fase ini, merozoit berkembang di dalam eritrosit dan berkembang menjadi *ring form* sampai menjadi tropozoit matur yang diikuti dengan skizogoni untuk membentuk skizon. Tiap-tiap eritrosit yang terinfeksi mengandung 24-32 merozoit. Apabila eritrosit tersebut ruptur, maka merozoit akan lepas dan menginvasi eritrosit lainnya (Gillespie & Richard, 2001).



Gambar 2.1. Siklus hidup *Plasmodium* (Brooks, et al., 2004).

Subpopulasi dari parasit akan berkembang menjadi gametosit yang akan menginfeksi nyamuk yang menggigit dan memulai fase seksual di dalam tubuhnya. Setelah masuk, gametosit akan berkembang menjadi bentuk jantan dan betina (mikrogamet dan makrogamet). Kedua gamet tersebut bersatu dan membentuk zigot. Zigot yang membesar akan masuk ke dalam *midgut* dan berubah menjadi *oocyst*. Perkembangan parasit akan terus terjadi sampai *oocyst* mengandung ribuan sporozoit. Pecahnya *oocyst* akan melepaskan sporozoit tersebut ke kelenjar ludah dan akan masuk ke dalam tubuh manusia lagi apabila terkena gigitan nyamuk (Gillespie & Richard, 2001).

**2.1.3 Penggolongan Obat Anti Malaria Berdasarkan Tempat Kerja Obat Anti Malaria Pada Organel Subseluler Plasmodium.**

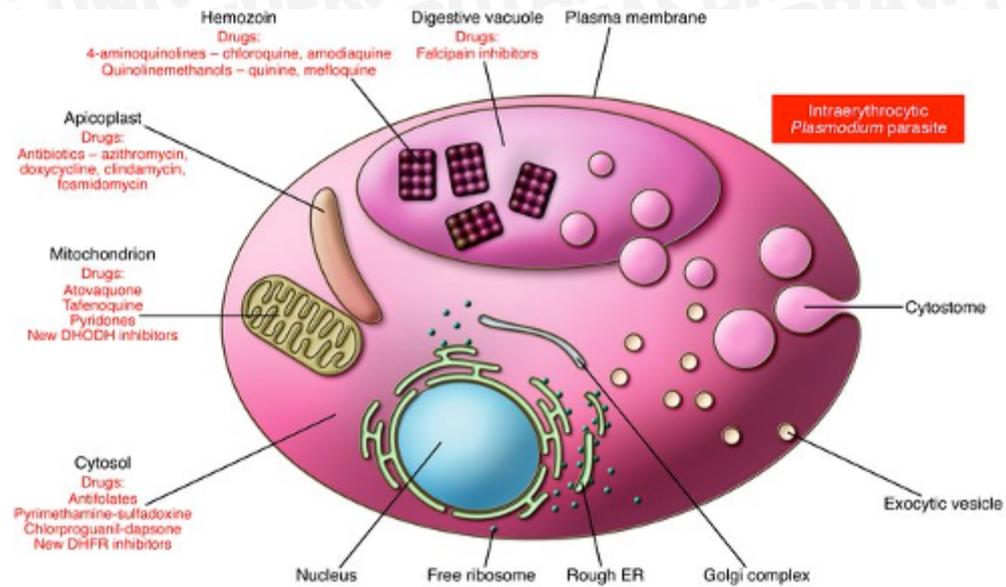
Obat antimalaria memberikan pengaruh pada organel subseluler Plasmodium dengan mengganggu proses atau metabolisme pada organel



subseluler yang berbeda. Beberapa mekanisme kerja dan target dari obat anti-malaria seperti pada tabel 1 ini.

**Tabel 2.1.** Target dari Senyawa Antimalaria (Sumber : Rosenthal, 2003)

Lokasi target	Jalur Mekanisme	Molekul Target	Terapi yang ada	Komponen Baru	Referensi
Sitosol	metabolisme folat	Dihidrofolat reduktase	Pyrimetamine, proguanil	Klorproguanil	Nzila <i>et al.</i> , 2000 Mutabingwa <i>et al.</i> , 2001
		Dihidropteroat sintase	sulfadoxine, dapsone	Turunan 5-flouorocotate Gossypol	Rahod <i>et al.</i> , 1992 Razakantoanina <i>et al.</i> , 2000
membranparasite	Sintesis fosfolipid Membran transport	Transporter kholin		G25	Wengelnic <i>et al.</i> , 2002
		Jalur unik		Dimer dinukleosida	Gero <i>et al.</i> , 2000
vakuola makanan	Polimerisasi heme Hidrolisis hemoglobin	Hemozoin	quinolin	quinolin baru	De <i>et al.</i> , 1998
		Plasmepsin		Inhibitor Protease	Stock <i>et al.</i> , 2002 Francis <i>et al.</i> , 1994 Haque <i>et al.</i> , 1999
	Pembentukan radikal bebas	Falcipains		Inhibitor Protease	Rosenthal, 2001b; Shenai <i>et al.</i> , 2003
		Tidak diketahui	artemisin	Peroksida baru	Vennesstrom <i>et al.</i> , 2000; Borsnik <i>et al.</i> , 2002
Mitokondria	transport elektron	Cyt. C Oksidoreduktase	atovaquon		
Apikoplas	Sintesis protein	Apikoplast ribosom	antibiotik qinolon		
	Sintesis DNA	DNA girase	Rifampin		
	Transkripsi	RNA polimerase			
	Biosintesis asam lemak Tipe Tipe II	FabH		Thiolaktomicin	Waller <i>et al.</i> , 1998 Suroliia and Suroliia, 2001
	Sintesis Isoprenoid	FabI	DOXP reduktoisomerase		Triklosan
Farmesilasi				Fosmidomicin	Jomaa <i>et al.</i> , 1999
Protein		Farmesil transferase		Peptidomimetik	Onkanda <i>et al.</i> , 2001 Chacrabarti <i>et al.</i> , 2002



**Gambar 2.2.** Target aksi obat antimalaria pada organel subseluler parasit Plasmodium intraeritrositik (Sumber : Greenwood *et al*, 2008)

Obat antimalaria bekerja dengan cara mengganggu proses atau jalur metabolisme di dalam organel subseluler yang berbeda (Tabel 2.1). Obat golongan 4-aminokuinolin ( klorokuin, amodiakuin) dan kuinolin metanol ( kuinin dan meflokuin) berkonsentrasi dalam vakoula makanan yang bersifat asam. Obat golongan ini sangat esensial dalam mengganggu proses pencernaan hemoglobin oleh parasit dengan jalan mengadakan interaksi dengan  $\beta$ -hematin atau menghambat pembentukan hemozoin. *Falcipain inhibitor* bekerja dengan cara menghambat enzim plasmepsin dan enzim falcipain yang berperan dalam pemecahan globin menjadi asam amino. *Falcipain* berperan merupakan *cysteine protease* dari *Plasmodium falciparum* yang berperan dalam siklus eritrositik parasit yang menyebabkan terjadinya hidrolisis hemoglobin hostnya, invasi pada eritrosit dan menyebabkan terjadinya rupture eritrosit. Disamping itu, protease ini bertanggung jawab terjadinya peningkatan kejadian resistensi pengobatan malaria ( Marco & Coteron, 2012).

Antibiotik seperti azitromisin, doksisisiklin, dan klindamisin bekerja di dalam organel plastid seperti kloroplas yang disebut apikoplas. Obat ini menghambat translasi protein sehingga progeni parasit yang diberi obat mengalami kematian. Atovakuon dan senyawa lain tertentu menghambat transport elektron dalam mitokondria dan melalui penghambatan oksidoreduktase sitokrom C. Antifolat mengganggu biosintesis folat *de novo* dalam sitosol. Obat anti-malaria Sulfadoksin-Pyrimetamin (SP) dan kombinasi baru Klorproguanil-Dapson (Lapdap) merupakan inhibitor kompetitif yang berperan dalam jalur folat. Generasi obat dari Artemisin menghasilkan radikal bebas yang berfungsi untuk mengalkilasi membran parasit (Greenwood *et al*, 2008). *Ubiquitin – Proteasome System* merupakan target baru pengobatan malaria yang cukup potensial untuk dikembangkan. Selama ini inhibitor *proteasome*, seperti *eponemycin*, *epoxomycin*, PS-341, dan *lactacystin*, merupakan obat yang dikembangkan sebagai terapi kanker. Pengembangan inhibitor *proteasome* merupakan jalur terapi malaria baru yang potensial untuk dikembangkan.

#### 2.1.4 Resistensi Pengobatan Malaria

Resistensi obat adalah salah satu hambatan terbesar dalam usaha menurunkan jumlah kasus malaria. Sampai saat ini, tiga dari lima spesies penyebab malaria yaitu, *P. falciparum*, *P. vivax* dan *P. malariae* diketahui sudah mengalami resistensi terhadap obat. Resistensi obat dipersulit dengan adanya resisten silang yang terjadi diantara obat dengan mekanisme kerja yang sama (WHO, 2010a).

Pada Januari 2006, *WHO Guidelines for The Treatment of Malaria* menyatakan bahwa monoterapi artemisinin sudah tidak lagi

direkomendasikan. Hal ini dikarenakan penemuan kasus resistensi monoterapi artemisinin di perbatasan antara Kamboja dan Thailand, Kamboja bagian barat, Myanmar selatan, perbatasan Cina-Myanmar, dan di Vietnam selatan. Saat ini tercatat bahwa kasus resistensi tidak terbatas hanya pada monoterapi artemisinin tetapi juga terjadi pada ACT. Kegagalan pengobatan menggunakan kombinasi artesunate-amodiaquine ditemukan dalam 4 studi di Indonesia (WHO, 2010a).

Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen, mutasi ini terjadi karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif. Menurut Clyde & Cowman dalam Tarigan (2003) klorokuin bekerja dengan mengikat cincin feriprotoporfirin IX suatu hematin yang merupakan hasil metabolisme hemoglobin didalam parasit. Ikatan feriprotoporfirin IX-klorokuin ini bersifat melisiskan membran parasit sehingga parasit mati, Resistensi parasit terhadap klorokuin terjadi karena (1) Tempat ikatan klorokuin pada eritrosit berkurang sehingga parasit dalam eritrosit tidak dapat dibunuh. (2) Mutasi terjadi multigen sehingga resisten cepat terjadi.

Klorokuin adalah obat antimalaria pada pertengahan kedua abad 20an, tetapi peningkatan kecepatan resistensinya menimbulkan perubahan pengobatan lini pertama di Tanzania dengan obat kombinasi sulfadoxin-pirimetamin pada 2001, tetapi resistensi pada sulfadoxin-pirimetamin juga cepat terjadi dan kegagalan terapi terjadi di Muheza, Tanzania, sehingga pada tahun 2006 di Tanzania artemisinin kombinasi digunakan sebagai obat lini pertama (Khatib *et al*, 2013).

Pirimetamin bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga parasit tidak mampu membuat asam tetrahidrofolat akibatnya parasit tidak mampu melanjutkan siklus hidupnya yang akhirnya akan difagosit. Sulfadoksin bekerja dengan mengadakan kompetisi dengan PABA (*para amino benzoic acid*) dalam memperebutkan enzim dihidrofolat sintase sehingga pembentukan asam dihidrofolate terganggu dan asam folat yang diperlukan parasit tidak terbentuk. Resistensi pada obat pirimetamin dan sulfadoksin disebabkan karena mutasi gen sehingga parasit mampu menggunakan jalur metabolisme lain yang dapat terhindar dari pengaruh obat. Pada umumnya bila terjadi resistensi terhadap suatu obat malaria akan diikuti dengan resistensi obat malaria lainnya (Alker *et al*, 2005)

Resistensi Sulfadoksin –Pirimetamin dihubungkan dengan mutasi pada gen dihidrofolate reduktase (*pf dhfr*) dan dihidropterone sintase (*pf dhps*). Pirimetamin selektif inhibitor kompetitif pada enzim dihidrofolate reduktase, Sedangkan obat Sulfadoksin menghambat pembentukan dihidropterone sintase pada awal pembentukan folate. Beberapa mutasi titik yang berhubungan dengan kejadian resistensi obat antifolate terjadi mutasi yang berlipat (*triple pf dhfr* 151,R59,N108, dan *double pf dhps* G437,E540) Hal ini diyakini sebagai penyebab kegagalan terapi obat Sulfadoksin –Pirimetamin (Kublin *et al*, 2002).

Atovaquone-proguanil adalah obat antimalaria yang relatif baru yang bekerja dengan menghambat transport elektron mitokondria. Mutasi titik pada gen *pf cytb* dikodon 268 sebagai penyebab resistensi pada kombinasi obat ini. Kegagalan pengobatan dengan obat kombinasi Atovaquone-proguanil pada *traveller* dihubungkan dengan mutasi pada gen *pf cytb* dikodon 268 yang disebut sebagai T802A dan A803C. Adanya mutasi gen *pf cytb* ini di Luanda, Angola m

aka obat ini direkomendasikan sebagai profilaksis pada *traveller* (Wichman *et al*, 2004).

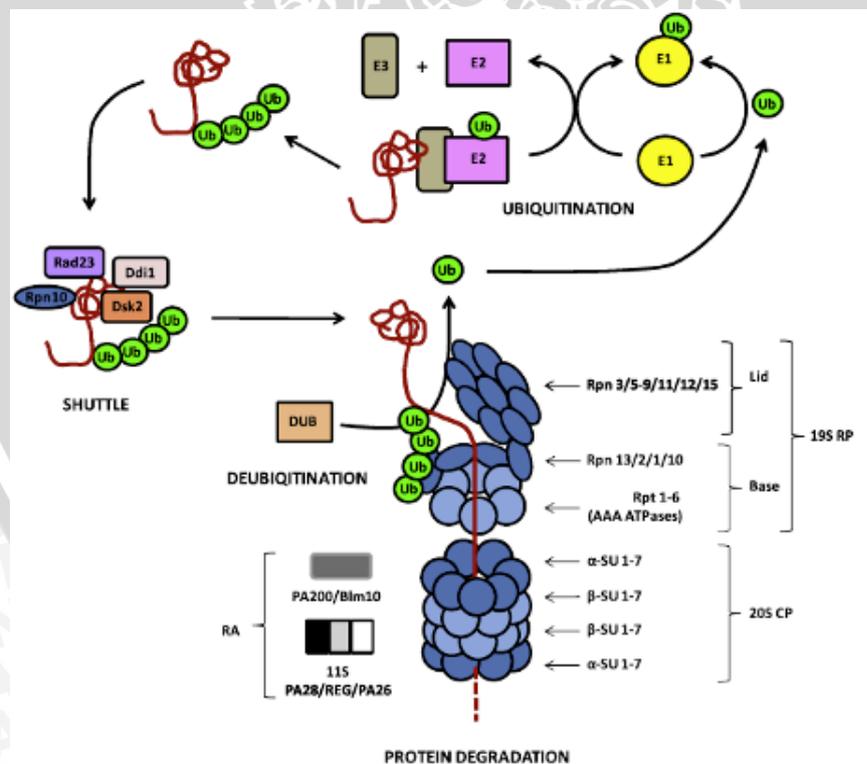
Obat antimalaria artemisinin berinteraksi dan selektif menghambat *PfATPase6*. Hasil studi secara *in vivo* menunjukkan bahwa *Plasmodium falciparum* hambatannya meningkat (IC<sub>50</sub>) pada artemisinin dan menunjukkan mutasi titik yang spesifik pada kodon S769N pada lokus ATPase, dan dijelaskan juga bahwa mutasi ATPase6 A623E dan E431K dihubungkan juga dengan penurunan kepekaan *Plasmodium falciparum* pada artemisinin. Hasil ini merupakan keadaan yang membahayakan akan terjadinya resistensi artemisinin yang meluas (Mugittu *et al*, 2006).

## 2.2 Ubiquitin dan Jalur Proteolitik Proteasome

*Ubiquitin – Proteasome System* (UPS) merupakan sistem yang meregulasi kebanyakan protein pada sel eukariot. UPS bertanggung jawab terhadap kualitas protein, proliferasi sel, kematian sel, dan signal transduksi. Kontrol protein ada *P. falciparum* sangat penting oleh karena : (1) fase eritrosit *Plasmodium* memiliki kecepatan replikasi yang tinggi, (2) ukuran protein *Plasmodium* cukup besar, (3) *low complexity region* cukup banyak di antara dan di dalam *globular domain*, dan (4) protein *Plasmodium* tertekan oleh adanya panas akibat demam pada penderita. Hal tersebut merupakan tantangan bagi proses *foldin* protein dan mesin pendegradasi protein untuk mencegah adanya akumulasi lethal dari protein nonfungsional dan *misfolded*. UPS pada *Plasmodium* merupakan 20S *proteasome* yang aktif secara enzimatik dan diekspresikan sepanjang siklus hidup *Plasmodium* (Kreidenweiss *et al*, 2008).

*Proteasome* merupakan salah satu tipe jalur proteolisis makromolekul yang terdapat mulai dari archaebakteri sampai yeast dan manusia. Struktur

*proteasome* ditentukan dengan menggunakan mikroskop elektron. *Proteasome* 26S terdiri dari dua subunit (SU) yang berbeda : 20S *core protein* (CP) dengan berat molekul 700 kD yang diapit oleh dua 19S *regulatory particles* (RP). Bentuk *proteasome* yang lain adalah terdiri dari 20S unit diapit oleh dua 11S subunit yang dikenal sebagai *immunoproteasome* yang berperan pada proses antigen kelas I. CP tersusun atas empat cincin heptamer yang terdiri dari dua cincin luar dengan tujuh  $\alpha$ -SUs di setiap cincinnya dan dua cincin dalam dengan tujuh  $\beta$ -SUs di setiap cincinnya. Empat cincin tersebut tersusun bertumpuk. Sedangkan, pertikel 19S terdiri dari 18 subunit yang mengontrol pengenalan, *deubiquitinilasi*, dan *unfolding* dari substrat protein sebelum masuk ke dalam inti katalitik *proteasome* 20S (Delcros *et al*, 2003 ; Aminake *et al*, 2012).



Gambar 2.3. Ubiquitin – Proteasome System (Aminake *et al*, 2012)

Proses degradasi protein *proteasome* dimulai dengan *ubiquitinasi* atau konjugasi *ubiquitin* (Ub). Proses ini melibatkan tiga kelompok enzim yang saling berhubungan, yaitu: *Ub-activating enzyme* E1, *Ub-conjugating enzyme* E2, dan *Ub ligase* E3. Seperti dapat dilihat pada gambar 4, awalnya E1 berikatan dengan Ub membentuk Ub-E1 *thioester* dan residunya ditransfer ke E2. Selanjutnya, E3 berinteraksi dengan E2 dan protein target sehingga terjadi transfer Ub dari E2 ke residu substrat lysine. Pada *P. falciparum* terdapat delapan *putative E1-like enzymes*, 14 *putative E2-like enzymes*, dan 54 *putative E3-like enzymes*. E3 merupakan enzim yang spesifik terhadap substrat protein yang dibagi menjadi empat kelas utama, yaitu: HECT, the RING, the PHD, dan U-box E3. Substrat yang terubiquitinasi akan ditranspor ke *proteasome* yang dimediasi oleh protein *shuttle*. Protein *ekstraproteasome* pengikat Ub yang berfungsi sebagai protein *shuttle* diantaranya: Rad23, Dsk2, Ddi1, dan Rpn10. Ortholog protein tersebut yang terdapat di dalam *P. falciparum* adalah PF10\_0114 (Rad23), PF11\_0142 (Dsk2), dan PF14\_0090 (Ddi1). Protein tersebut memiliki *Ub-like domain* (UbL) yang dapat berikatan dengan reseptor Ub di *proteasome* dan *Ub-binding domain* (UbA) (Aminake *et al*, 2012).

Sebelum degradasi *proteasome*, Ub terlepas dari substrat dan mengalami siklus *ubiquitinasi* lainnya. Pelepasan Ub dimediasi oleh *de-ubiquitinated enzymes* (DUB). Pada manusia DUB terdiri dari lima *family* yaitu: JAMM, UCH, USP, OTU, dan MJD. Semua DUB merupakan protease sistein, kecuali JAMM yang merupakan zinc metalloprotease. RP berfungsi mengenal protein terubiquitinasi, membantu proses *deubiquitinasi*, dan membuka lipatan substrat. RP terdiri dari dua subkompleks, *basedanlid*. RP *base* tersusun atas 6 AAA-type ATPase SU (Rpt1-6) dan 4 non-ATPase SU yaitu: Rpn1, Rpn2, Rpn10, dan

Rpn13. Rpn 10 dan Rpn13 berfungsi sebagai reseptor *ubiquitin*, sedangkan Rpn1 dan Rpn2 berfungsi sebagai *scaffold*. Rpn10 juga berfungsi sebagai protein penghubung antara *basedanlid*. *Lid* terdiri dari 9 Rpn-type SU: Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12, dan Rpn15. Rpn11 berfungsi menimbulkan aktivitas *deubiquitinasi*. Uch2/Uch37 berinteraksi dengan reseptor *proteasome* Ub Rpn13. Ubp6/USP14 dan Uch2/Uch37 dapat berfungsi sebagai enzim "proof-reading" untuk melepaskan rantai Ub dari protein salah terkonjugasi Ub oleh UPS. Substrat ikatan peptida akan terhidrolisis oleh residu aktif threonin N-terminal yang terdapat pada inti  $\beta$ -SUs. Terdapat tiga bagian aktif secara proteolitik dari tujuh  $\beta$ -SUs, yaitu :  $\beta$ 1 yang menyerupai aktivitas caspase,  $\beta$ 2 yang menyerupai aktivitas tripsin, dan  $\beta$ 3 yang menyerupai aktivitas kemotripsin. Oleh karena sisi aktif *proteasome* terletak di dalam barel tertutup, diperlukan aktivator untuk memfasilitasi akses protein ke dalam CP dalam bentuk tidak terlipat (*unfolded*) (Aminake *et al*, 2012).

### 2.3 *Streptomyces*

Genus *Streptomyces* oleh Walksman dan Henrici dideskripsikan sebagai *Actinomycetes* yang aerobik dan mampu membentuk spora (William *et al*, 1989 dalam Ceylan *et al*, 2008). Selain itu, genus ini juga memiliki karakteristik sebagai mikroba uniseluler, memiliki filamen, siklus hidup yang kompleks serta membentuk hifa dan metabolit sekunder. Estimasi saat ini mengindikasikan bahwa hampir 50% dari 20.000 metabolit bioaktif sekunder yang dideskripsikan sejak 1990 berasal dari filamen *Aktinomycetes* yang diinokulasikan dari tanah (Marinelli, 2009).

Berdasarkan taksonomi, *Streptomyces* juga dikategorikan sebagai bakteri

gram positif, memiliki sebuah DNA dengan kadar sitosin dan guanin yang tinggi (69 hingga 73 mol%) dan membentuk substrat yang memiliki banyak cabang ekstensif (Ceylan *et al*, 2008). Setiap spesies *Streptomyces* yang berbeda memproduksi sekitar 75% antibiotik untuk dunia kesehatan. *Streptomyces* mampu memproduksi lebih dari setengah antibiotik yang kandungan senyawanya bisa dimanfaatkan (Miyadoh, 1993). Untuk menemukan antibiotik baru, beberapa studi telah dilakukan untuk mengisolasi *Streptomyces* dari habitat yang berbeda. Hal ini disebabkan karena identifikasi lingkungan ekologi yang baru merupakan faktor krusial dalam penemuan jenis baru dari *Aktinomycetes* yang juga memiliki senyawa metabolit yang baru pula (Saadoun & Gharaibeth, 2008 dalam Nurkanto *et al*, 2010).

### **2.3.1 *Streptomyces hygroscopicus***

Genus *Streptomyces* adalah salah satu genus yang mendominasi di antara *Streptomyces* lainnya. Diketahui bahwa *Streptomyces* merupakan genus yang paling banyak memproduksi antibiotik dan molekul bioaktif dibandingkan dengan genus lain dari *Actinomycetes* (Goodfellow & Simpson 1987; Khamma *et al*, 2008; Solanki *et al*, 2008), bahkan juga lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba lain seperti jamur dan yeast. *Streptomyces hygroscopicus* merupakan salah satu spesies *Streptomyces* sp. yang yang berpotensi menghasilkan antibiotik dari metabolit sekundernya. Pembentukan produk metabolit yang dihasilkan dari proses fermentasi mikroba filamen ini sangat bergantung pada level biomassa, profil morfologis dari kultur, serta lingkungan ekologi yang baru seperti hutan hujan tropis, dasar lautan, gurun pasir, dan daerah es (Nurkanto *et al*, 2010).

### **2.4 Kandungan Metabolit *Streptomyces hygroscopicus***

#### 2.4.1 Pterocidin

Pterocidin merupakan komponen sitotoksik baru yang diisolasi dari *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. Pterocidin memiliki nama sistematis (5R,6R)-6-[(1E,3E,5S,7R,8S,9Z,11E)-8-Hydroxy-5,9-dimethoxy-7-methyl-1,3,9,11-tetradecatetraen-1-yl]-5-methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. Zat ini menunjukkan aktivitas sitotoksik melawan galur sel kanker manusia dengan IC50 2,9 – 7,1  $\mu$ M (Igarashi *et al*, 2006).

#### 2.4.2 Eponemycin

*Eponemycin* adalah peptida linear a',b' epoxyketone anti-angiogenik yang diisolasi dari *S.hygroscopicus* P247-271. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas terhadap B16 Melanoma. *Eponemycin* juga ternyata berpengaruh terhadap aktivitas *proteasome* 20S (Won *et al*, 2006).

#### 2.4.3 Geldanamycin

Senyawa ini sedang dalam evaluasi penelitian karena menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap protein chaperone dari heat shock protein (hsp) 90 (Won *et al*, 2006).

#### 2.4.4 Trichostatin

Metabolit ini menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel-sel kanker dan mampu menghambat histon deasetilase (HDAC), sehingga menyebabkan growth arrest, diferensiasi dan apoptosis dari sel tumor (Won *et al*, 2006).

#### 2.4.5 Rapamycin

Metabolit ini dikenal juga dengan nama sirolimus, senyawa ini digunakan sebagai antifungal. Senyawa ini memiliki aktifitas inhibisi terhadap *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) yang berfungsi meregulasi pertumbuhan sel dan proliferasi melalui jalur sinyal transduksi (Loris, 2008).

## 2.5 *Streptomyces hygroscopicus* dan *Eponemycin*

*Eponemycin* merupakan salah satu kandungan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri *Streptomyces hygroscopicus*. *Eponemycin* terbukti memiliki potensi yang tinggi dan spesifik secara in vivo sebagai antibiotik dan anti tumor pada B16 Melanoma (Schmidt & Schmidt, 1992). Derivat dari natural product *eponemycin* diketahui memiliki efek yang sama seperti *eponemycin* sebagai *anti-angiogenic* yang saat ini telah di purifikasi. *Biotinylated dihydroeponemycin* merupakan senyawa derivat dari *eponemycin* yang telah berhasil di purifikasi, dan memberikan interaksi dengan reseptor *eponemycin*, yang menunjukkan bahwa derivat *eponemycin* yaitu *dihydroeponemycin* memiliki efek yang sama dalam penghambatan proteasom (Sin et al, 1998).

## 2.6 Prinsip kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu metode pemisahan komponen menggunakan fase diam berupa plat dengan lapisan bahan absorben inert. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu jenis kromatografi analitik yang sering digunakan untuk identifikasi awal. Kromatografi lapis tipis (KLT) mulai dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1953. Pada kromatografi lapis tipis (KLT) terdapat dua fase yaitu, fase diam dan fase gerak. Fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Fase gerak dalam Kromatografi lapis tipis (KLT) dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam yang digunakan karena pengaruh dari kapiler sehingga fase gerak akan naik menjalar pada bidang fase diam (*ascending*),

atau karena pengaruh graavitasi akan menurun (*descending*) (Rohman & Gandjar, 2007). Teknik kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan suatu adsorben yang disalutkan pada suatu lempeng kaca sebagai fase stasionernya dan pengembangan kromatogram terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (fase diam).

### 2.6.1 Fase Diam KLT

Lapisan dibuat dari salah satu adsorben khusus yang digunakan untuk KLT yang dibuat oleh berbagai perusahaan. Panjang lapisan 200 mm dengan lebar 200 atau 100 mm. Untuk analisis totalnya 0,1-0,3 mm, biasanya 0,2 mm. Sebelum digunakan, lapisan disimpan dalam lingkungan yang baik lembab dan bebas dari uap laboratorium (Stahl, 1985). Adsorben (fase diam) yang umum digunakan ialah silica gel, aluminium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, poliamida, dan lain-lain, namun Silica gel merupakan bentuk fase diam yang paling banyak digunakan dalam analisis Kromatografi lapis tipis. Silica gel ini menghasilkan perbedaan dalam efek pemisahan yang tergantung pada cara pembuatannya sehingga silica gel G Merck, menurut spesifikasi Stahl, yang diperkenalkan tahun 1958, telah diterima sebagai bahan standar. Selain itu harus diingat bahwa adsorben seperti aluminium oksida dan silica gel mempunyai kadar air yang berpengaruh nyata terhadap daya pemisahan senyawa yang diuji (Stahl, 1985).

### 2.6.2 Fase Gerak KLT

Menurut Rohman dan Gandjar (2007), fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur

sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

1. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif
2. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga *Retardation factor* ( $R_f$ ) terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan
3. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silica gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai  $R_f$ . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metal benzene akan meningkatkan harga  $R_f$  secara signifikan.
4. *Solute-solut ionic* dan *solute-solut* polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan methanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan *solute-solut* yang bersifat basa dan asam.

### 2.6.3 Aplikasi (Penotolan Sampel)

Larutan contoh yang akan diaplikasikan hendaknya berisi antara 0,1 dan 10 mg kation per  $\text{cm}^3$  dan dapat bersifat netral dan asam encer sekitar 1  $\mu\text{l}$  larutan ditotolkan dengan sebuah apuit mikro (*micro syringe*) atau mikropipet di dekat salah satu ujung lempeng kromatografi (*chromatoplate*) (sekitar 1,5-2,0 cm dari pinggir lempeng) dan kemudian dibiarkan kering diudara (Pudjaatmaka, 1994).

#### 2.6.4 Pengembangan

Pengembangan ialah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut pengembang merambat naik dalam lapisan. Jarak pengembangan normal, yaitu jarak antara garis awal dan garis depan, ialah 100 mm disamping pengembangan sederhana, yaitu perambatan satu kali sepanjang 10 cm ke atas, pengembangan ganda dapat juga digunakan untuk memperbaiki efek pemisahan yaitu dua kali merambat 10 cm ke atas beturut-turut pada pengembangan dua kali. Lapisan KLT harus dalam keadaan kering diantara kedua pengembangan tersebut, ini dilakukan dengan membiarkan pelat diudara selama 5-10 menit (Stahl, 1985).

#### 2.6.5 Deteksi Bercak

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penyerapnya akan diberi indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedang latar belakangnya akan kelihatan berfluoresensi (Rohman & Gandjar, 2007).

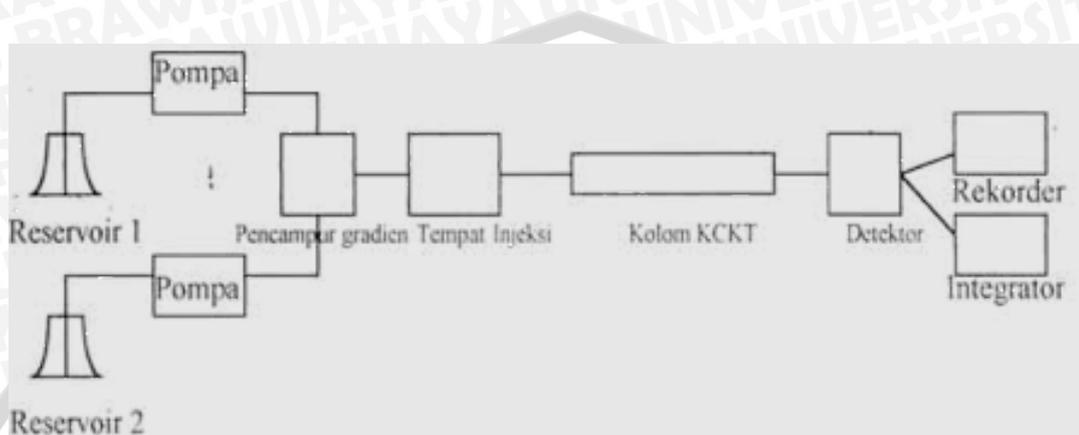
### 2.7 Prinsip Kerja High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisiokimia. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) termasuk metode analisis terbaru yang merupakan suatu teknik kromatografi dengan menggunakan fase diam berupa cairan atau padat dan fase gerak berupa cairan. Metode HPLC digunakan untuk menganalisis senyawa yang tidak mudah menguap (*nonvolatile*), menetapkan kadar senyawa tertentu seperti ; asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan menetapkan kadar-kadara senyawa aktif obat. Prinsip metode analisis ini adalah dengan bantuan pompa, fase gerak cair dialirkan melalui kolom detector, cuplikan sampel dimasukkan ke dalam fase gerak dengan disuntikan, sehingga didalam kolom terjadi pemisahan komponen senyawa dalam campuran yang akan direkam menjadi suatu kromatogram. Metode ini memiliki banyak kelebihan jika dibandingkan dengan metode kromatografi lain (Done *et al*, 1974;; Johnson & Stevenson, 1978; Snyder & Kirkland, 1979; Hamilton & an Sewell, 1982), berikut merupakan kelebihan metode HPLC antara lain :

1. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
2. Mudah dalam pelaksanaannya
3. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
4. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis
5. Memiliki resolusi yang baik dalam menganalisis
6. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
7. Kolom yang digunakan dalam analisis dapat digunakan kembali
8. Dapat mengukur secara kuantitatif suatu senyawa

Komponen – komponen dalam metode HPLC terdiri dari beberapa komponen yang penting dalam pelaksanaan analisis HPLC, antara lain : pompa, injector,

kolom HPLC, detector, tempat elusi gradient, dan recorder, dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Diagram Blok HPLC (Putra, 2004)

### 2.7.1 Pompa HPLC

Fase gerak dalam HPLC adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom HPLC. Dalam analisis HPLC ada dua tipe pompa yang sering digunakan, yaitu pompa kinerja konstan (*constant pressure*) dan pompa pemindahan konstan (*constant displacement*). Pompa pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu : pompa reciprocating dan pompa syringe. Pompa *reciprocating* akan menghasilkan suatu aliran yang memiliki sifat berdenyut dan teratur (*pulsating*) dan pompa syringe sebaliknya akan memberikan aliran yang tidak berdenyut (Putra, 2004).

### 2.7.2 Injektor

Sampel yang akan dimasukkan ke dalam sistem HPLC terutama di ujung kolom HPLC, harus dengan distorsi yang minimum dari material kolom agar sampel dapat dianalisis, oleh karena itu digunakan injektor untuk memasukkan sampel ke dalam ujung kolom HPLC (Putra, 2004)

### 2.7.3 Kolom HPLC

Kolom HPLC merupakan bagian terpenting dalam analisis kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom yang digunakan dalam analisis HPLC pada umumnya dibagi menjadi dua, yaitu kolom analitik dan kolom preparatif. Pada umumnya kolom dibuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperature kamar, tetapi bias juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukaran ion dan kromatografi eksklusi. Di dalam kolom saat analisis HPLC akan terjadi proses pemisahan senyawa pada sampel yang akan dianalisis (Putra,2004)

### 2.7.4 Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, dengan gangguan (noise) yang rendah, respon linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur. Detektor HPLC yang umum digunakan adalah detector UV 254 nm. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan range lebih luas (Putra, 2004).

### 2.7.5 Fase Gerak

Dalam analisis HPLC komposisi dari fase gerak merupakan salah satu dari variable yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada pelarut (fase gerak) yang digunakan dalam metode HPLC. Pemilihan fase

gerak menentukan keberhasilan dalam pemisahan senyawa yang akan diukur  
(Putra, 2004).

