

COORDINATION STATE AND AGGREGATION PROCESS OF BACTERIOCHLOROPHYLL A AND ITS DERIVATIVES : STUDY ON ACETONE-WATER AND METHANOL-WATER SOLVENTS

Keadaan Koordinasi dan Proses Agregasi Pada Bakterioklorofil a Serta Turunannya : Studi pada Pelarut Aseton-Air dan Metanol-Air

Heriyanto^{1,2}, Suryasatriya Trihandaru¹, and Leenawaty Limantara^{1,2,3*}

¹ Magister of Biology, Satya Wacana Christian University, Jl Diponegoro no.52-60, Salatiga

² Mochtar Riady Institute for Nanotechnology, Lippo Karawaci

³ Ma Chung Research Center, Universitas Ma Chung, Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151

Received October 28, 2008; Accepted February 10, 2009

ABSTRACT

Research on bacteriochlorophyll (BChl) a and its derivatives had been conducted to determine the coordination state and the aggregation process in acetone-water and methanol-water. The results showed that there were mainly two absorption peaks in BChl a and its derivatives, namely: Q_x and Q_y , that were very sensitive to coordination state and aggregation process. The coordination state of pigment could be determined based on Q_x absorption peak that was influenced by solvents. In addition, the donor number (DN) and taft parameters (β and π^*) from each solvents could also be used to determine the coordination state. One or two of axial coordination toward center metal of BChl a and its derivatives have to be filled by donor electron as a foreign nucleophile. Mg-BChl was exist as five-coordinate complexes in acetone but as six-coordinate complexes in methanol. Five-coordinate complexes of Zn-BChl was occurred either in acetone or methanol. Cu-BChl was exist as four-coordinate complexes in acetone but altered to five-coordinate complexes in methanol. The aggregation process was influenced by the existence of water added in pigment solution. The order of Mg-BChl a and its derivatives abilities to form new aggregate in acetone-water and methanol-water, in regard of water-addition percentage was as follow: Cu-BChl > Zn-BChl > Mg-BChl. Methanol was the solvent that could form aggregate of Mg-BChl and its derivatives at lower water-addition percentage compared to acetone.

Keywords: aggregation, bacteriochlorophyll & its derivatives, coordination state.

PENDAHULUAN

Bakterioklorofil (BChl) a merupakan golongan bakterioklorin yang terdistribusi paling luas, terdapat pada pusat reaksi dan bagian dalam antena di hampir semua bakteri anoksigenik serta pada bagian tepi antena bakteri ungu [1-3] ([1, 2, 3]). Seperti klorofil (Chl) pada umumnya, BChl memiliki fungsi utama dalam fotosintesis yaitu sebagai penyerap cahaya, mentransfer energi eksitasi ke pusat reaksi dan memisahkan muatan melintasi membran fotosintetik [3, 4].

Pada pelarut nukleofilik polar (misal: dietil ether (DE)), BChl a hadir sebagai kompleks monomer berkoordinasi penta. Atom magnesium (Mg) pusat berkoordinasi penta dengan empat atom nitrogen dari cincin makrosiklik BChl a dan sebuah molekul pelarut. Pada keadaan ini, posisi atom Mg pusat tetap berada di luar bidang cincin bakterioklorin. BChl a membentuk kompleks monomerik heksa koordinasi pada pelarut nukleofilik yang lebih kuat (tetrahidrofuran). Atom Mg

pusat dikoordinasi dengan dua molekul pelarut membentuk sebuah aksial ligan pada kedua sisi cincin makrosiklik dan memaksa logam pusat turun ke dalam bidang [5-10]. Perubahan kompleks BChl a dari penta koordinasi ke koordinasi heksa telah diamati pada temperatur rendah dalam pelarut DE [8], dan piridin dalam asetonitril [11] serta pada tekanan tinggi dalam pelarut DE [12]. Pada pelarut non-polar (karbon tetraklorida (CCl_4)), BChl a membentuk agregat yang berbeda atau agregat antar molekul karena interaksi antara atom Mg pusat dari satu molekul BChl a dari gugus keto C-O pada cincin V, serta gugus asetil C-O pada cincin I sebagai donor dari molekul BChl a yang lain.

Agregat (B)Chl sudah lama dipelajari sebagai model sistem agregat kromofor-kromofor dalam tumbuhan dan bakteri fotosintetik. Studi pada bakteri ungu menunjukkan agregat berada dalam suatu kompleks penangkap cahaya dan monomer-monomer BChl a diorganisasikan ke dalam struktur berbentuk

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-341-550171/550175
Email address : leenawaty.limantara@machung.ac.id

cincin dengan jumlah monomer yang khas pada setiap cincinnya [13]. Prinsip dasar agregasi *in vivo* pigmen fotosintetik adalah sifat molekulnya yang dapat berfungsi sebagai donor (pasangan elektron pada gugus keto C₉) dan akseptor (koordinasi tidak jenuh pada atom Mg pusat) elektron dalam transfer energi [14]. Jenis dimerisasi ini sangat bergantung pada nukleofilik asing (misal: air dan lain-lain) yang bersaing untuk berkoordinasi dengan Mg. Beberapa metode spektroskopik telah digunakan untuk mempelajari mekanisme agregasi (B)Chl baik secara *in vivo* maupun *in vitro* diantaranya adalah spektroskopi *Fourier-Transform-Infrared* [15], *Near-Infrared Fourier-Transform Raman* [16], *circular dichroism* [17], UV-Tampak [13], serta perhitungan struktur elektronik dengan mekanikal kuantum [18, 19] dan eksiton [20] telah diaplikasikan.

Secara *in vitro*, agregat banyak dipelajari sebagai bentuk konformasi (B)Chl dalam pelarut-pelarut non polar seperti CCl₄, piridin, dan CH₂Cl [5, 13, 21]. Konversi monomer ke konfigurasi agregat Chl telah dilakukan oleh Vladkova [22] dalam enam jenis pelarut polar. Penelitian terhadap agregat dan agregasi (B)Chl dilakukan dengan melarutkannya dalam dua jenis pelarut seperti formamida/air, metanol/air, aseton/air [22-25]. Sistem dua pelarut dimaksudkan untuk menghasilkan ikatan hidrogen agar menyerupai kondisi *in-vivo* ikatan hidrogen-gugus peptida dalam protein [26].

Proses agregasi dari porfirin dan klorofil dalam sebuah larutan mempengaruhi struktur elektronik dari makrosiklik [14, 27-29]. Pada bidang Biologi, agregasi dari klorofil nampak menjadi penentu sifat fotofisika dan fotokimia klorosom, kompleks penangkap cahaya pada bakteri fotosintesis [30-32], sedangkan dalam bidang kimia dan kesehatan, bentuk oligomer porfirin dan klorin (termasuk Chl), kemungkinan bersifat aktif terutama pada terapi fotodinamika tumor [33, 34]. Berdasarkan latar belakang di atas maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menentukan keadaan koordinasi Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a* serta Cu-BChl *a* dalam pelarut aseton dan metanol,
2. Menentukan pola agregasi Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a* serta Cu-BChl *a* dalam pelarut aseton-air dan metanol-air.

METODE PENELITIAN

Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah pigmen Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a* dan Cu-BChl *a* murni yang diperoleh dari Laboratorium Klorofil Universitas Ludwig-Maximilian, Munich, Jerman. Aseton dan metanol (PA, MERCK) serta akuades digunakan sebagai pelarut.

Prosedur Kerja

Larutan Induk pigmen

Masing-masing pigmen dilarutkan dalam pelarut aseton atau metanol dan disetarakan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum pita Q_y, setara dengan ~1.

Agregasi Pigmen

Pola agregasi pigmen dalam pelarut aseton dan metanol diamati dengan menambah berbagai variasi volume air (0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 mL ke dalam larutan induk pigmen sehingga total volume larutan menjadi 3 mL. Dengan kata lain, prosentase air yang ditambahkan ke dalam larutan pigmen yaitu sebesar 0,00; 8,33; 16,67; 25,00; 33,33; 41,67; 50,00; 58,33; 66,67 %.

Spektroskopi

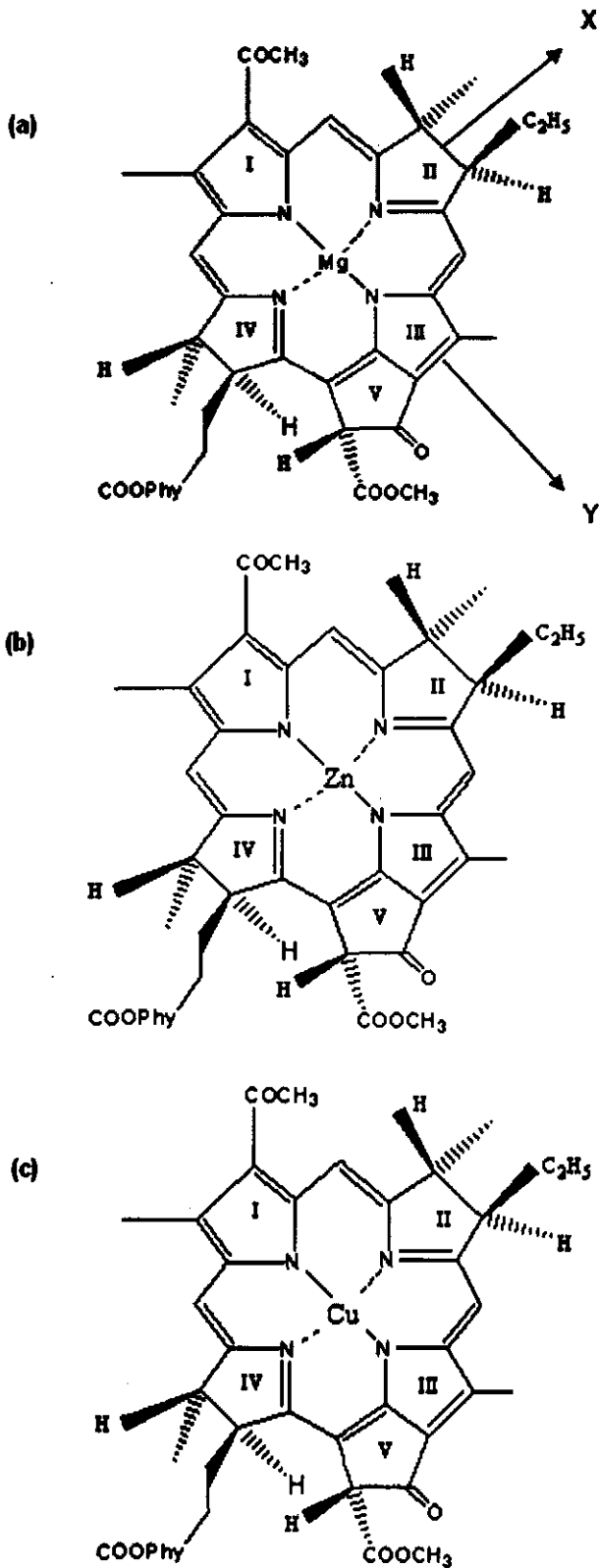
Pola spektra pigmen sebelum dan sesudah penambahan air dianalisis dengan spektrofotometer UV-Tampak Varian Cary 50 pada panjang gelombang 330-1100 nm.

Analisa Data

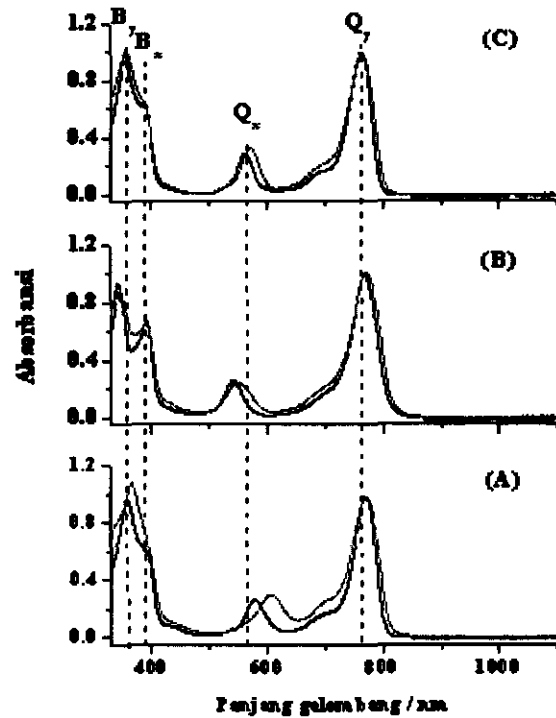
Posisi dan absorbansi pita serap Q_x serta Q_y dianalisa menggunakan program Spina 3×23 (dibuat oleh Katsumoto, Y., Hiroshima University-Japan). Pita serap Q_x digunakan untuk menganalisa keadaan koordinasi pigmen, sedangkan proses agregasi pigmen menggunakan pita serap Q_y sesuai dengan Limantara dkk. [35, 36]. Masing-masing pita serap akan dijelaskan lebih detail pada bagian hasil dan pembahasan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur kimia BChl *a* mengandung sebuah atom Mg pada pusat makrosiklik, dimana atom Mg berkoordinasi dengan empat buah cincin pirol. Struktur kimia Zn-BChl *a* dan Cu-BChl *a* serupa dengan BChl *a* dan hanya berbeda pada atom pusat penyusunnya. Struktur kimia Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a* dan Cu-BChl *a* disajikan pada Gambar 1. Pola spektrum serap Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a*, dan Cu-BChl *a* dalam pelarut aseton serta metanol ditunjukkan pada Gambar 2. Pola spektrum setiap pigmen memperlihatkan adanya empat buah pita serap yang berasal dari transisi elektronik antara dua orbital molekul tertinggi yang terisi dan dua orbital yang tidak ditempati secara normal [37-39]. Pita serap Q_y mempunyai transisi dipole yang berorientasi sepanjang aksis menghubungkan nitrogen dari cincin tidak jenuh I dan



Gambar 1. Struktur kimia (a) Mg-BChl a, (b) Zn-BChl a, (c) Cu-BChl a



Gambar 2. Pola spectrum (A) Mg-BChl a, (B) Zn-BChl a dan (C) Cu-BChl a dalam pelarut aseton (—) dan metanol (---).

III. Transisi yang lebih lemah yaitu Q_x terpolarisasi sepanjang aksis yang tegak lurus menghubungkan cincin II dan IV. Pita serap B (B_y dan B_x) atau soret merupakan dua pita yang saling tumpang tindih pada transisi energi yang lebih tinggi. Pita-pita ini menunjukkan pasangan ketergantungan ketika pusat logam diubah, dimana energi transisi B_x dan Q_y hanya sedikit dipengaruhi oleh pergantian logam pusat atau penambahan ligan aksial yang dapat menentukan keadaan koordinasi. Sebaliknya, pergeseran yang relatif besar dan jelas diamati untuk pita B_y dan Q_x [40]. Pergeseran yang nyata ini dapat dipahami secara kualitatif dengan model empat orbital [41-43]. Posisi serapan maksimum (nm) masing-masing pita serap Mg-BChl a, Zn-BChl a dan Cu-BChl a disajikan pada Tabel 1.

Keadaan Koordinasi

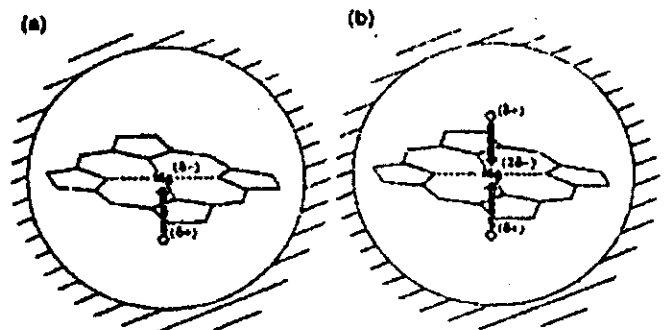
Posisi pita Q_x Mg-BChl a bergantung pada keadaan koordinasi dari atom logam pusat [4], hal ini terutama karena perpindahan populasi elektron antara ligan dan logam yang mengubah radius kovalen logam dan interaksi elektrostatik logam dengan populasi elektron pada atom π dalam perbatasan orbital molekul [40]. Atom Mg pada pusat bakterioklorofil atau klorofil memiliki koordinasi tidak jenuh dengan jumlah koordina

Tabel 1. Posisi serapan maksimum (nm) pita Q_y , Q_x , solet (B_x , B_y) pada Mg-BChl *a*, Zn-BChl *a*, dan Cu-BChl *a*.

Pita Serapan	Mg-BChl <i>a</i>		Zn-BChl <i>a</i>		Cu-BChl <i>a</i>	
	Aseton	Metanol	Aseton	Metanol	Aseton	Metanol
Q_y	772.78	775.19	764.69	766.61	771.40	773.85
Q_x	577.12	606.83	562.01	570.85	540.76	549.28
B_x	391.69	391.70	388.64	389.52	388.93	390.85
B_y	357.45	366.91	352.20	353.95	335.66	342.29

si 4 dan sebagai konsekuensinya satu atau kedua posisi aksial Mg harus diisi dengan sebuah elektron donor. Nukleofil asing, sebagai alternatif adalah basa lewis (aseton, piridin, metanol, dll.), dapat membentuk pusat atom Mg yang memiliki jumlah koordinasi 5 atau 6 [5, 7, 44, 45], sehingga dapat dikatakan bahwa Mg-BChl tanpa pelarut memiliki jumlah koordinasi 4 (tetra-koordinasi), sedangkan Mg-BChl dalam suatu lingkungan (misalnya: pelarut) akan memiliki jumlah koordinasi 5 (penta-koordinasi) dan 6 (heksa-koordinasi). Oleh karena itu, serapan pita Q_x dapat digunakan untuk membedakan keadaan koordinasi penta atau heksa dari Mg-BChl [5, 7, 40, 45-47]. Realita ini tidak dapat diterapkan pada bakteriofiofitingin *a* (BPheo *a*), yang tidak memiliki atom Mg, karena pita serap Q_x juga peka terhadap logam pusat selain peka pada keadaan koordinasi [11]. Callahan dan Cotton [7] menyatakan bahwa BPheo *a* tidak mempunyai ikatan koordinasi yang mungkin dengan berbagai macam pelarut.

Panjang gelombang serapan Q_x dari Mg-BChl dalam pelarut aseton adalah 577,12 nm sedangkan dalam pelarut metanol 606,83 nm (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa Mg-BChl yang dilarutkan dalam aseton memiliki koordinasi penta, dan berkoordinasi heksa jika Mg-BChl dilarutkan dalam metanol. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Nishizawa, dkk. [45] yang mengelompokkan keadaan koordinasi berdasarkan serapan Q_x yang muncul di atas (dibawah) 590 nm merupakan keadaan koordinasi heksa (penta). Jenis Mg yang memiliki koordinasi penta menyerap di dekat 580 nm, sedangkan jenis heksa-koordinat akan bergeser ke arah merah sampai 610 nm [5]. Hasil penelitian ini didukung oleh Callahan dan Cotton [7] yang menyimpulkan bahwa serapan Q_x sensitif tidak hanya untuk keadaan koordinasi tetapi juga untuk ligan aksial alami. Serapan Q_x muncul pada 570, 575-580 dan 582 nm untuk koordinasi penta dengan ligan oksigen, sulfur dan nitrogen secara berturut-turut, dan munculnya Q_x pada 590-595 dan 605-612 nm untuk koordinasi heksa dengan ligan oksigen dan nitrogen. Umemoto, dkk. dan Nishizawa dkk. [45] menyatakan bahwa serapan Q_x muncul pada daerah 575-588 nm pada keadaan koordinasi penta dan munculnya Q_x pada dae



Gambar 3. Ikatan koordinasi (a) penta dan (b) heksa antara Mg-BChl *a* dengan pelarut aseton dan metanol, secara berturut-turut (43).

rah 593-610 nm pada keadaan koordinasi heksa untuk ligan oksigen dan nitrogen.

Jenis koordinasi yang terbentuk antara Mg-BChl *a* dengan pelarut aseton dan metanol juga ditentukan oleh *donor number* (DN) dan *taft parameters* (β dan π^*) dari masing-masing pelarut. Skala DN telah digunakan sebagai ukuran kemampuan berkoordinasi dari pelarut pada Fe-Porfirin [48]. Callahan dan Cotton [7] memperlihatkan sebuah hubungan yang linear antara nilai DN dan posisi pita serapan Q_x dari Mg-BChl *a*. Keadaan penta koordinasi dibentuk pada pelarut dengan nilai $DN \leq 17$, sedangkan keadaan koordinasi heksa dibentuk dalam pelarut dengan $DN \geq 18$. Pelarut aseton dan metanol memiliki nilai DN 17,0 dan 25,7; secara berturut-turut. Kalmet dkk. [49] mengusulkan parameter Taft, (β) dan (π^*), yang mengukur kekuatan pendonasian elektron dari pelarut dan penstabilan dielektrik dari sebuah dipole oleh sistem pelarut. Pelarut yang mempunyai nilai taft (β) $< 0,5$ dan (π^*) $> 0,65$ akan menghasilkan formasi penta sedangkan pelarut dengan nilai (β) $> 0,5$ dan (π^*) $< 0,65$ akan membentuk heksa koordinasi [46, 50]. Aseton mempunyai parameter taft (β) = 0,48 dan (π^*) = 0,71; sedangkan metanol mempunyai nilai taft (β) = 0,62 dan (π^*) = 0,60 sehingga kedua pelarut tersebut akan membentuk ikatan koordinasi penta maupun heksa dengan Mg-BChl *a*. Ikatan koordinasi penta dan heksa yang dibentuk antara Mg-BChl *a* dalam pelarut aseton dan metanol diperlihatkan pada Gambar 3.

Pita serap Q_x dari Zn-BChl *a* dalam pelarut metanol adalah 570,85 nm sedangkan dalam pelarut aseton 562,01 nm. Chen, dkk. [51] melaporkan bahwa hasil pengukuran EXAFS mengindikasikan bahwa Zn-BChl dalam DE berada pada koordinasi tetra. DE dan aseton merupakan pelarut semi polar yang memiliki nilai DN yang hampir sama yaitu 19,2 dan 17,0; secara berturut-turut [7], sehingga dapat disimpulkan bahwa Zn-BChl dalam pelarut aseton hanya memiliki empat koordinasi. Realita ini diperkuat oleh pernyataan Noy dkk. [52] bahwa transisi Q_x dari Zn-BChl mengalami pergeseran dari 558 nm dalam DE menjadi 564 nm dalam asetonitril/dimetilformamid (AN/DMF). Pergeseran ini menunjukkan bahwa terbentuk campuran keadaan koordinasi antara tetra atau penta dalam AN/DMF.

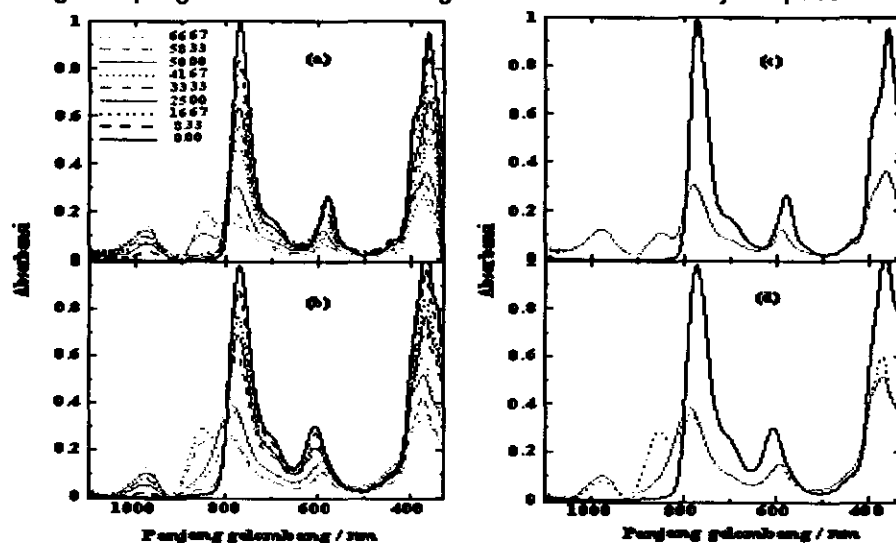
Zn-porfirin akan membentuk penta koordinasi jika dilarutkan pada pelarut yang memiliki sifat nukleofilik kuat, seperti piridin [53]. Penandaan koordinasi penta dari Zn-BChl dalam piridin dikuatkan dengan penemuan bahwa pigmen ini juga membentuk koordinasi penta dalam pusat reaksi bakteri [51]. Posisi pita serapan Q_x nya terletak pada 595 nm yang mengalami pergeseran ke arah merah sebesar 17 nm ($Q_x = 578$ nm) dalam piridin. Hal ini sesuai dengan pergeseran ke arah merah pada Mg-BChl yang dipengaruhi oleh lingkungan (23 ± 7 nm), ketika energi transisi Q_x nya berada pada penta koordinasi di pusat reaksi dan jika dibandingkan dengan dalam pelarut DE [54]. Pernyataan di atas dapat disimpulkan bahwa Zn-BChl dalam piridin membentuk koordinasi penta. Geskes dkk. [55] menyatakan bahwa pita Q_x dari Zn-BChl (558 nm) dan Cu-BChl (538 nm) dalam DE mengalami pergeseran jika pigmen ini dilarutkan dalam tetrahidrofuran (THF) (Zn-BChl = 567 nm; Cu-BChl = 533 nm), hal ini terjadi karena perubahan dalam kesetimbangan peligasi aksial dengan

mengubah pelarut. Nilai DN pelarut metanol berada diantara pelarut piridin dan THF, sehingga dimungkinkan bahwa Zn-BChl dalam pelarut metanol akan membentuk koordinasi penta.

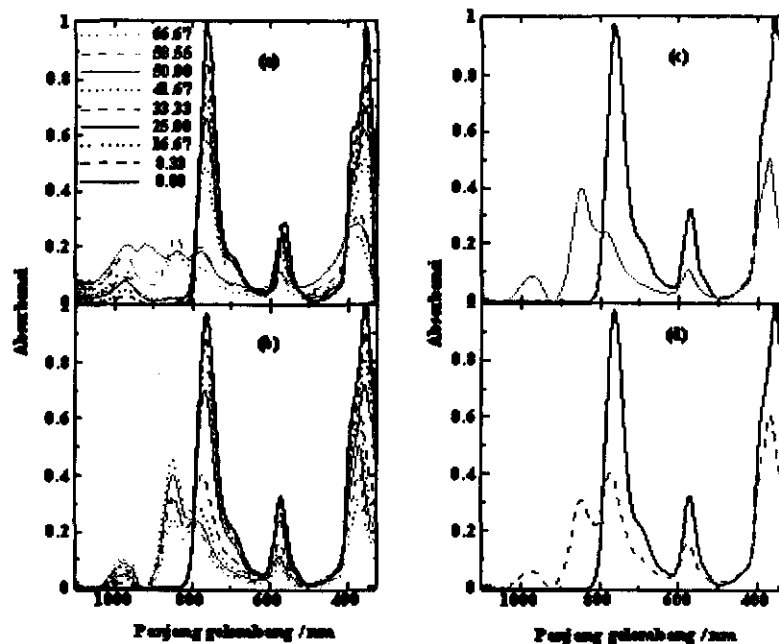
Koordinasi tetra juga diamati pada Cu-BChl dalam DE [53, 56], sedangkan Cu-porfirin ketika dilarutkan dalam piridin akan membentuk koordinasi penta [53]. Noy dkk. [52] menyatakan bahwa posisi pita Q_x pigmen ini dalam AN/DMF dan DE (528-540 nm) juga mengindikasikan koordinasi 4. Pada penelitian ini, pita serap Q_x dari Cu-BChl *a* dalam pelarut aseton adalah 540,76 nm, sedangkan 549,28 nm pada pelarut metanol. Berdasarkan Nilai DN pada masing-masing pelarut dengan dibandingkan dengan pernyataan di atas, maka dapat dikatakan bahwa Cu-BChl *a* dalam pelarut aseton hanya membentuk empat koordinasi, sedangkan koordinasi penta terbentuk dalam pelarut metanol.

Agregasi Pigmen

Proses agregasi pigmen memiliki peran penting di dalam pemahaman proses dasar organisme hidup dan penyelidikan metode yang terbaik untuk terapi fotodinamika kanker. Kunci agregasi *in vivo* pigmen fotosintesis kelihatan pada sifatnya sebagai donor (pasangan elektron gugus keto C-9) dan akseptor (koordinasi tidak jenuh pusat logam). Jenis dimerisasi ini tergantung pada keberadaan air yang berkompetisi untuk berkoordinasi dengan logam pusat [24]. Agregasi BChl *a* dan turunannya diamati dalam pelarut aseton dan metanol dengan penambahan berbagai prosentase air. Pola spektra agregasi Mg-BChl, Zn-BChl, dan Cu-BChl dalam pelarut aseton-air maupun metanol-air disajikan pada Gambar 4, 5, 6.



Gambar 4. Pola spektra agregasi Mg-BChl *a* dalam pelarut aseton-air (a dan c) dan metanol-air (b dan d) pada berbagai prosentase.



Gambar 5. Pola spektra agregasi Zn-BChl a dalam pelarut aseton-air (a dan c) dan metanol-air (b dan d) pada berbagai prosentase.

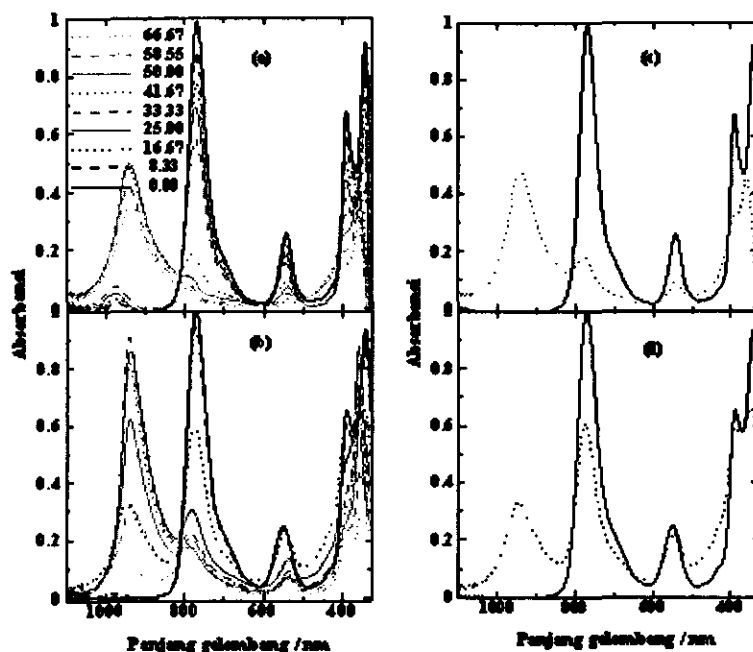
Pola spektra agregasi BChl a dan turunannya menunjukkan bahwa terdapat pita yang mengalami peningkatan absorbansi (hiperkromik) pada panjang gelombang ± 967 nm sejalan dengan meningkatnya prosentase air, sehingga dapat dikatakan bahwa pita ini merupakan pita serap air. Peron dkk. [57] menyatakan bahwa air memiliki serapan di daerah dekat infra merah yaitu 976 nm dan 965 nm yang merupakan daerah *second overtone* dari air. Bentuk pita yang tidak simetris dari air menunjukkan bahwa pita tersebut mengandung berbagai jenis spesies antara lain: OH dalam keadaan bebas dan membentuk polimer atau spesies yang mengikat hidrogen.

Gambar 4a dan 4b; 5a dan 5b; 6a dan 6b menunjukkan pola agregasi Mg-BChl; Zn-BChl; Cu-BChl dalam pelarut aseton-air dan metanol-air, secara berturut-turut. Proses agregasi menyebabkan pita Q_y mengalami pergeseran ke arah merah (Batokromik), diikuti dengan penurunan absorbansi (Hipokromik) dan pada akhirnya terbentuk pita baru yang merupakan agregat dari Mg-BChl dan turunannya. Proses agregasi Mg-BChl dapat dilihat dengan jelas pada Gambar 4c dan 4d, dimana terjadi pergeseran batokromik dari Q_y sebesar 8,45 nm (aseton-air) dan 7,79 nm (aseton-air), hipokromik pita Q_y sebesar 69% (aseton-air) dan 64%, serta terbentuk pita baru pada 850 nm (aseton-air) dan 858 nm (metanol-air) pada prosentase penambahan air sebesar 50% (aseton-air) dan 42% (metanol-air). Mg-BChl dalam pelarut metanol-air lebih mudah mengalami proses agregasi jika dibandingkan dengan dalam aseton-air, hal ini ditunjukkan dengan lebih rendahnya

prosentase air yang diperlukan dan lebih kecilnya penurunan pita Q_y untuk membentuk agregat Mg-BChl baru.

Ozaki dan Iriyama [58] menyatakan bahwa konsentrasi air yang meningkat dan diikuti dengan penurunan pita Q_y menunjukkan molekul air memutuskan ikatan koordinasi antara atom Mg dari satu klorofil dan gugus 9-keto dari klorofil yang lain maupun koordinasi ke atom Mg sehingga terbentuk agregat klorofil dengan air sebagai ligan. Model agregat klorofil dan air sebagai ikatan $C=O \cdots H_2O \cdots Mg$, dimana gugus $C=O$ pada cincin ke V suatu molekul klorofil membentuk ikatan koordinasi dengan Mg pada klorofil tetangganya dengan adanya ligan H_2O diusulkan oleh Evans dan Katz [5]. Katz dkk. [59] menyatakan bahwa air adalah nukleofil yang sangat unik bagi klorofil karena tidak hanya dapat berfungsi sebagai donor elektron, tapi juga menghasilkan ikatan hidrogen. Molekul H_2O bersifat polar dan merupakan pelarut yang sangat baik untuk molekul polar. Kenyataan tersebut dapat terjadi karena H_2O memiliki kemampuan untuk menurunkan gaya elektrostatis dan melemahkan ikatan hidrogen antara molekul-molekul polar. Dalam kondisi ini air berperan sebagai donor hidrogen dan molekul lain sebagai akseptor [60].

Gambar 5c dan 5d menunjukkan proses agregasi Zn-BChl dalam pelarut aseton-air dan metanol-air, secara berturut-turut. Pada penambahan air dengan prosentase sebesar 50% dalam pelarut aseton pita Q_y mengalami penurunan absorbansi sebesar 81,74% dan bergeser ke arah merah sekitar



Gambar 6. Pola spektra agregasi Cu-BChl a dalam pelarut aseton-air (a dan c) dan metanol-air (b dan d) pada berbagai prosentase.

10,61 nm. Proses agregasi Zn-BChl yang terjadi dalam pelarut aseton-air, diindikasikan dengan terbentuknya agregat baru dengan munculnya dua puncak serapan pada 836 nm dan 920. Agregat pertama mengalami pergeseran sebesar 4,95 nm ke arah merah setelah prosentase air mencapai 66,67%. Kondisi ini dapat disimpulkan bahwa, agregat kedua strukturnya lebih kompleks dibandingkan dengan agregat pertama.

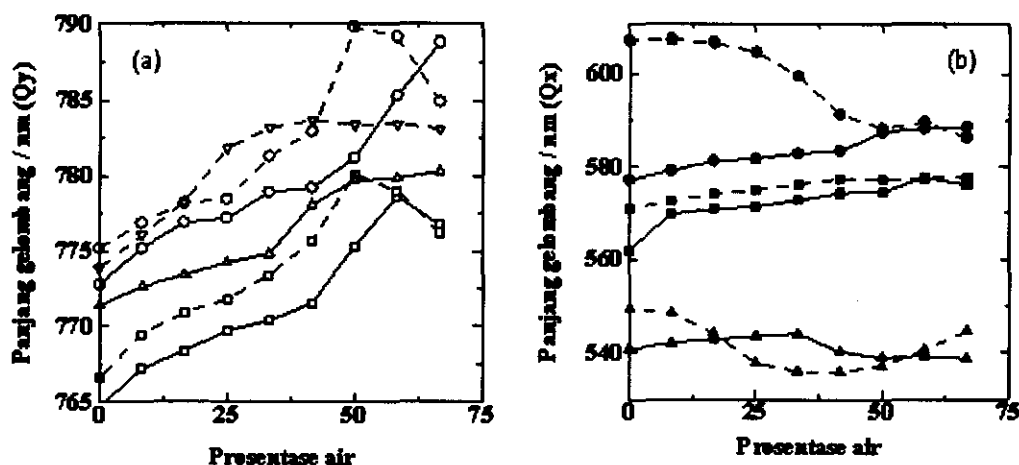
Proses agregasi Zn-BChl dalam pelarut metanol-air terjadi pada prosentase penambahan air sebesar 33%. Pita Q_y mengalami pergeseran batokromik sebesar 6,77 nm dan hipokromik pita Q_y sebesar 58,64%. Meskipun penurunan absorbansi pita Q_y dari Zn-BChl dalam pelarut metanol-air yang lebih rendah jika dibandingkan dengan dalam pelarut aseton-air, namun absorbansi agregat yang terbentuk dalam pelarut metanol-air pada 851 nm memiliki absorbansi yang kuat. Hal tersebut mengindikasikan bahwa proses agregasi pada Zn-BChl mudah terbentuk dalam pelarut metanol-air serta prosentase air yang ditambahkan lebih rendah.

Gambar 6c dan 6d menunjukkan proses agregasi Cu-BChl dalam pelarut aseton-air dan metanol-air, secara berturut-turut. Agregat Cu-BChl dalam pelarut aseton-air terbentuk pada prosentase penambahan air sebesar 41,67% dan memiliki serapan puncak pada 948,34 nm. Pada proses agregasi ini, pita serap air menghilang pada saat terbentuknya agregat baru, dimana pita air mengalami pergeseran ke arah biru sebesar 18,58 nm. Sedangkan pita Q_y mengalami pergeseran ke arah merah sebesar 6,70 nm dan mengalami penurunan

absorbansi sebesar 41,67%. Agregat Cu-BChl dalam pelarut aseton-air kembali mengalami pergeseran ke arah biru sebesar 15,65 nm sampai pada penambahan prosentase air 66,67%.

Proses agregasi Cu-BChl dalam pelarut metanol-air terjadi pada prosentase penambahan air sebesar 16,67%, ditandai dengan terbentuknya agregat baru. Agregat yang terbentuk pada pita serap 950,59 nm; berasal dari pita air yang tidak muncul dan pita air tersebut bergeser ke arah biru sebesar 12,74 nm. Selain itu terjadi pergeseran batokromik dari Q_y sebesar 2,00 nm dan terjadi penurunan absorbansi 21,92%. Pita agregat mengalami pergeseran ke arah merah sebesar 35 nm setelah prosentase penambahan air sebesar 66,67%. Agregat yang terbentuk pada Cu-BChl dalam pelarut aseton-air mengalami pergeseran ke arah biru, sedangkan dalam pelarut metanol-air mengalami pergeseran ke arah merah setelah prosentase penambahan air sebesar 66,67%.

Proses agregasi tergantung pada nukleofil asing yakni pelarut. Metanol merupakan pelarut yang lebih polar jika dibandingkan dengan aseton, sehingga dengan penambahan air yang lebih sedikit akan terbentuk agregat dari Mg-BChl dan turunannya. Berikut ini urutan pigmen yang mudah membentuk agregat yang ditinjau dari sedikitnya prosentase penambahan air: Cu-BChl > Zn-BChl > Mg-BChl. Seperti yang telah dibahas dalam keadaan koordinasi Mg-BChl dan turunannya baik dalam pelarut aseton atau metanol, Cu-BChl memiliki koordinasi yang paling



Gambar 7. Plot pita serap Q_y (a) dan Q_x (b) dari (\circ atau \bullet) Mg-BChl, (\square atau \blacksquare) Zn-BChl serta (Δ atau \blacktriangle) Cu-BChl dalam pelarut aseton-air (—) dan methanol-air (---) pada berbagai prosentase air.

tidak jenuh jika dibandingkan dengan Zn-BChl dan Mg-BChl, sehingga memudahkan air dan aseton atau air dan metanol untuk berkoordinasi dengan logam pusatnya.

Plot pita serap Q_y dan Q_x dari Mg-BChl, Zn-BChl dan Cu-BChl dalam pelarut aseton-air dan metanol-air pada berbagai prosentase air disajikan pada Gambar 7. Pita Q_y dari Mg-BChl dan turunannya dalam kedua sistem pelarut tersebut mengalami pergeseran ke arah merah dengan bertambahnya prosentase air (Gambar 7a). Kondisi ini menandakan telah terjadi proses agregasi. Linnanto, dkk. [13] menyatakan bahwa bakterioklorofil *a* mengalami agregasi dalam larutan nonpolar yang dihubungkan melalui air dan dioksan ditunjukkan dengan pita Q_y bergeser ke arah merah. Posisi pita Q_y dari Mg-BChl dan turunannya dalam pelarut metanol-air memiliki serapan pada panjang gelombang yang lebih panjang jika dibandingkan dalam pelarut aseton-air, hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen yang terbentuk antara pigmen dan pelarut metanol-air lebih kuat.

Pita Q_x Mg-BChl dan turunannya pada berbagai prosentase air disajikan pada Gambar 7b. Pita Q_x merupakan pita serap yang peka terhadap keadaan koordinasi dari logam pusat pigmen yang dipengaruhi oleh pelarutnya. Penambahan air dengan prosentase 66,67% menyebabkan pita Q_x Mg-BChl dalam pelarut aseton-air mengalami pergeseran ke arah merah sampai pada panjang gelombang 588,51 nm; sedangkan dalam pelarut metanol-air pita Q_x bergeser ke arah biru pada panjang gelombang 586,25 nm. Nishizawa, dkk. [45] serta Callahan dan Cotton [7] mengelompokkan keadaan koordinasi berdasarkan serapan Q_x yang muncul di bawah 590 nm merupakan keadaan koordinasi penta. Pada prosentase penambahan air sebesar 66,67%, keadaan koordinasi heksa Mg-BChl dalam pelarut metanol berubah menjadi penta koordinat,

hal ini dimungkinkan karena terjadi persaingan antara air dan metanol untuk berikatan dengan koordinasi logam pusat Mg yang tidak jenuh sehingga salah satu dari dua aksial Mg ditempati oleh air maupun metanol. Pita Q_x dari Zn-BChl dan Cu-BChl dalam pelarut aseton-air serta metanol-air tidak mengalami perubahan yang berarti setelah penambahan air pada prosentase maksimum.

KESIMPULAN

Keadaan koordinasi pigmen Mg-BChl dalam pelarut aseton berada dalam penta koordinasi sedangkan dalam pelarut metanol adalah heksa koordinasi. Zn-BChl dalam pelarut aseton maupun metanol berada dalam penta koordinasi. Cu-BChl dalam pelarut aseton tetap dalam keadaan koordinasi tetra, sedangkan dalam pelarut metanol berubah menjadi penta koordinasi.

Urutan kemampuan Mg-BChl *a* dan turunannya dalam pelarut aseton-air dan metanol-air untuk membentuk agregat baru, ditinjau dari prosentase penambahan air adalah sebagai berikut: Cu-BChl > Zn-BChl > Mg-BChl. Metanol merupakan pelarut yang dapat membentuk agregat Mg-BChl dan turunannya dengan prosentase penambahan air yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan pelarut aseton.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian yang diperoleh Heriyanto dari Program Beasiswa Unggulan Insan Indonesia Cerdas Departemen Pendidikan Nasional (Depdiknas) dan dana penelitian yang diperoleh Leenawaty Limantara dari International Foundation of Sciences (IFS), Stockholm, Swedia, No: F/3559-1, Program Insentif Dasar Kementerian Negara

Riset dan Teknologi No: 27/RD/Insentif/PPK/II/2008 dan Alexander van Humboldt, Jerman.

DAFTAR PUSTAKA

- Oelze, J., 1985, *Meth Microbiol.* 18, 257.
- Permentier, H.P., Neerken, S., Overmann, J., and Arnesz, J., 2001, *Biochemistry*, 40, 5573.
- Scheer, H., 2006, In *Chlorophylls and BacterioChlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. Eds. Grimm, B., Porra, J., Rudiger, W., and Scheer, H., *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 25, 1-26.
- Eichwurz, I., Stiel, H., Teuchner, K., Leupold, D., Scheer, H., Salomon, Y., and Scherz, A., 2000, *Photochemistry and Photobiology*, 72 (2), 204.
- Evans, T.A. and Katz, J.J., 1975, *Biochim. Biophys. Acta*, 396, 414.
- Rebane, K. and Avarmaa, R., 1982, *Chem. Phys.*, 68, 191.
- Callahan, P.M. and Cotton, T.M., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7001.
- Krawczyk, S., 1989, *Biochim. Biophys. Acta*, 976, 140.
- Naveke, A., Lapouge, K., Sturgis, J.N., Hartwich, G., Simonin, I., Scheer, H., and Robert, B., 1997, *J. Raman Spectrosc.*, 28, 599.
- Umetsu, M., Wang, Z-Y., Kobayashi, M., and Nozawa, T., 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1410, 19.
- Kania, A. and Fiedor, L., 2006, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2), 454.
- Ellervee, A. and Freiberg, A., 2008, *Chemical Physics Letters*, 450, 386.
- Linnanto, J., Oksanen, J.A.I., and Korppi-Tommola, J.E.I., 2002, *Chem. Phys.*, 4, 3061.
- Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M., and Janson, T.R., 1978, *Porphyrins*, 5(Part C), 401.
- Sato, H., Uehara, K., Ishii, T., and Ozaki, Y., 1995, *Biochemistry*, 34 (24), 7854.
- Uehara, K., Ozaki, Y., Okada, K., and Olson, J.M., 1991, *Chem. Lett.*, 6, 909.
- Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V., and Fisher, J.R.E., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5430.
- Cory, M.G., Zerner, M.C., Hu, X., and Schulten, K., 1998, *J. Phys. Chem. B*, 102, 7640.
- Linnanto, J. and Korppi-Tommola, J.E.I., 2000, *Phys. Chem.*, 2, 4962.
- Shipman, L.L. and Katz, J.J., 1977, *J. Phys. Chem.*, 81 (6), 577.
- Cotton, T.M. and Van Duyne, R.P., 1979, *American Chemical Society*, 101 (25), 7605.
- Vladkova, R., 2000, *Photochemistry and Photobiology*, 71(1), 71.
- de Paula, J.C., Robblee, J.H., and Fasternack, R.F., 1995, *Biophysical Journal*, 68, 335.
- Fisher, J.R.E., Rosenbach-Belkin, V., and Scherz, A., 1990, *Biophys. J. Biophysical Society*, 58, 461.
- Oba, T., Watanabe, T., Mimuro, M., Kobayashi, M., and Yoshida, S., 1995, *Photochemistry and photobiology*, 63 (5), 639.
- Hinton, J.F. and Harpool, R.D., 1977, *Journal of the American Chemical Society*, 99 (2), 349.
- Katz, J.J., Bowman, M.K., Michalski, T.J., and Worcester, D. L., 1991, *Chlorophylls*, 211.
- Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V., and Fisher, J.R.E., 1991, *Chlorophylls*, 237.
- White, W.I., 1978, *Porphyrins*, 5(Part C), 303.
- Blankenship, R.E., Trost, J.T., and Mancino, L.J., 1988, *NATO ASI Series, Series A: Life Sciences*, 149 (Photosynth. Bact. React. Cent.), 119.
- Hawthornthwaite, A.M. and Cogdell, R.J., 1991, *Chlorophylls*, 493.
- Alden, R.G., Lin, S.H., and Blankenship, R.E., 1992, *Journal of Luminescence*, 51(1-3), 51.
- Dougherty, T.J., 1992, *Advances in Photochemistry*, 17, 275.
- Spikes, J.D. and Bommer, J.C., 1991, *Chlorophylls*, 1181.
- Limantara, L., Kurimoto, Y., Furukawa, K., Shimamura, T., Utsumi, H., Katheder, I., Scheer, H., and Koyama, Y., 1995, *Chemical Physics Letters*, 236 (1,2), 71.
- Limantara, L., Sakamoto, S., Koyama, Y., and Nagae, H., 1997, *Photochemistry and Photobiology*, 65 (2), 330.
- Gouterman, M., 1961, *Journal of Molecular Spectroscopy*, 6, 138.
- Weiss, C., 1972, *J. Mol. Spectrosc.*, 44, 37.
- Petke, J.D., Maggiora, J.M., Shipman, L.L., and Christoffersen, R.E., 1980, *Photochem. Photobiol.*, 32, 399.
- Hartwich, G., Fiedor, L., Simonin, I., Cmiel, E., Schafer, W., Noy, D., Scherz, A., and Scheer, H., 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 3675.
- Gouterman, M., Wagniere, G.H., and Snyder, L.C., 1963, *J. Mol. Spectrosc.*, 11, 108.
- Warshel, A. and Parson, W.W., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6143.
- Thompson, M.A., Zerner, M.C., and Fajer, J., 1991, *J. Phys. Chem.*, 95, 5693.
- Katz, J.J., in *Bioinorganic Chemistry*. Eds. Eichhorn, G.L., Elsevier, Amsterdam, 1973, Vol. II, Chap. 29, 1022.
- Nishizawa, E.-I., Limantara, L., Nanjou, N., Nagae, H., Kakuno, T., and Koyama, Y., 1994, *Photochemistry and Photobiology*, 59 (2), 229.
- Koyama, Y., Limantara, L., Nishizawa, E., Misono, Y., and Itoh, K., 1995, *Proc. Conference Santa Fe, Mexico*.

47. Bellacchio, E. and Sauer, K., 1999, *Journal of Phys. Chem. B*, **103** (12), 2279.
48. Bottomley, L.A. and Kadish, K.M., 1981, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (23), 1212.
49. Kalmet, M.J., Abbound, J.L.M., and Taft, R.W., 1983, *J. Org. Chem.*, **48**, 2877.
50. Misono, Y., Limantara, L., Koyama, Y., and Itoh, K., 1996, *J. Phys. Chem.*, **100** (6), 2422.
51. Chen, L., Wang, Z., Hartwich, G., Katheder, I., Scheer, H., Tiede, D.M., Scherz, A., Montano, P.A., and Norris, J.R., 1995, *Chem. Phys. Lett.*, **234**, 437.
52. Noy, D., Fiedor, L., Hartwich, G., Scheer, H., and Scherz, A., 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3684.
53. Scheidt, W.R., in *The Porphyrins*. Eds. Dolphin, D., Academic: New York, 1979, Vol. III, 463-512.
54. Scheer, H. and Hartwich G. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Eds. Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E., Kluwer, Dordrecht, 1995, 649-664.
55. Geskes, C., Hartwich, G., Scheer, H., Mintele, W., and Heinze, J., 1995, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7776.
56. Buchler, J.W., in *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Eds. Smith, K.M., Elsevier, New York, 1975.157-232.
57. Peron, J.-J., Bourderon, B., and Sandorfy, C., 1971, *Canadian Journal of Chemistry*, **49**, 3901.
58. Ozaki, Y. and Iriyama, K., 1995, *Encyclopedia of Analytical Science* ISBN (set) 0-12-226700-1, 3988.
59. Katz, J.J., Ballschmiter, K., Garcia-Morin, T.M., Strain, H.H., and Uphaus R.A., 1968, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **60**(1), 100.
60. Stryer, L., 1988, *Biochemistry*. 3rd ed. W.H. Freeman and Company. New York.