

ISOLASI DAN PENENTUAN STRUKTUR MOLEKUL DARI TANAMAN OBAT TRADISIONAL *SMILAX CORDIFORIA*

Muhammad Hanafi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, 15310

KOMPUTER

ISN No.

INTISARI

Suatu penelitian telah dilakukan untuk mengisolasi kandungan senyawa kimia dari kulit batang tanaman *Smilax cordifolia*. Tanaman tersebut terkenal sebagai obat tradisional di Meksiko, yang bermanfaat untuk mengontrol berat badan. Metode isolasi dilakukan dengan cara merendam kulit batang tersebut dalam pelarut eter, dan metanol, kemudian kedua ekstrak tersebut dimurnikan dengan menggunakan kombinasi teknik kromatografi. Setelah pemurnian dan identifikasi terhadap ekstrak eter tersebut didapatkan dua senyawa steroid saponin sebagai 3- β -O- β -D-glukopiranosil sitosterol (1) dan campuran 6-O-palmitoil glukopiranosil sitosterol, 6-O-stearil glukopiranosil sitosterol dan 6-O-arakidoil glukopiranosil sitosterol (2), yang telah diisolasi dari tanaman obat lain. Ekstrak metanol menghasilkan empat senyawa yang telah diketahui, merupakan turunan fenolat yang diidentifikasi sebagai astilbin (3), isoastilbin (4), engelitin (5) dan asam klorogenat (6). Engelitin menunjukkan aktivitas sebagai anticendawan, astilbin dan asam klorogenat memperlihatkan aktivitas sebagai anticendawan, antibakteri, dan antivirus. Asam klorogenat juga memperlihatkan aktivitas sebagai antimutagenik, antitumor, dan antioksidan. Struktur molekul senyawa-senyawa tersebut ditentukan berdasarkan gabungan metode spektroskopi termasuk 2D NMR.

ABSTRACI

A research was carried out to isolate the constituents of *Smilax cordifolia* trunk bark. It is a famous medicinal plant in Mexico, used as weight control. The isolation methods were carried out by maceration in ether, and remaceration in methanol, and then both of crude extracts were purified by using combined chromatography technique. In the purification and identification of the ether extract two compounds as steroid saponins, 3- β -O - β -D-

glucopyranosyl sitosterol (1) and a mixture of 6-O-palmitoyl-glucopiranosil sitosterot, 6-O-stearylglucopyranosyl sitosterol and 6-O-arachidoyl-glucopyranosyl sitosterol (2) were obtained, which also have been isolated from other medicinal plants. Isolation from methanol extract resulted in four known substances of phenolic derivatives, identified as afilebin (3) isoastilbin (4), engelitin (5), and chlorogenic acid (C). Engelitin demonstrated antifungal activity, astilbin and chlorogenic acid showed antifungal, antibacterial, and antiviral activities. Chlorogenic acid also exhibited antimutagenic, antitumour and antioxidant activities. Their molecular structures were determined on the basis of combined spectroscopic methods including two dimensional NMR (2D NMR).

PENDAHULUAN

Dalam rangka pengembangan penggunaan obat tradisional, penelitian tentang kandungan senyawa kimia suatu tanaman obat dari beberapa negara dilakukan. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa bioaktif dan diharapkan adanya senyawa bioaktif baru, untuk digunakan pada pengobatan secara modern, dengan melakukan aneka uji aktivitas dan studi total sintesa. Tanaman obat *Smilax cordifolia* yang termasuk dalam keluarga Smilacacea dikenal dengan nama cocolmeca, mudah didapatkan karena banyak dijual dipasar sebagai jamu rebus di Meksiko. Kulit batang tanaman tersebut berkhasiat untuk mengurangi berat badan yang berlebih, dengan cara meminum air seduhannya.

Tanaman obat tersebut menarik, karena berdasarkan studi pustaka, kandungan senyawa bioaktifnya belum diketahui. Dari penelitian yang telah dilakukan terhadap tanaman sejenis lainnya, yaitu *Smilax glycyphylla* dilaporkan telah dapat diisolasi beberapa senyawa turunan fenolat, yaitu phloretin-2'- α -L-rhamnopyranoside, wanthone, dan mangiferin 171- Namun dari hasil penelitian pendahuluan kulit batang *S. cordifolia*, yang dilaporkan pada makalah ini didapatkan senyawa lain.

Penentuan struktur molekul senyawa-senyawa tersebut berdasarkan metoda spektroskopi dan dibandingkan dengan data spektra dari literatur.

PERCOBAAN

Prosedur Umum

Aktivitas optik senyawa terisolasi dalam pelarut kloroform (CHCl₃), air (H₂O) dan metanol (MeOH), ditentukan dengan menggunakan alat polarimeter Jasco DIP-370 Untuk menentukan titik leleh (tl) digunakan alat Yanagimoto micro melting point. Spektrum inframerah (IR) dari senyawa dalam pelarut parafin dan CHCl₃ diukur dengan memakai alat IR Spectrophotometer Jasco A100. Penentuan berat molekul menggunakan metoda imbasan elektron spektrum massa (Electron Impact Mass Spectrum) dengan menggunakan alat JEOL AX500 Spectrophotometer (30 eV), dimana sampel diinjeksikan secara langsung. Spektrum Resonansi Magnetik Nuklir (NMR) diukur dengan menggunakan alat JEOL GNM400 MHz untuk ¹H dan 100 MHz untuk ¹³C. Nilai pergeseran kimia (δ) suatu sinyal (puncak) diukur dalam satuan ppm, sedangkan bentuk pemisahan spin-spin (spin-spin splitting) dinyatakan dalam s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, ql = quaretlike, dd = double doublet, bs = broad singlet, m = multiplet. Pada pengukuran ¹H NMR, dalam pelarut CDCl₃, Tetramethylsilane (TMS) digunakan sebagai standar dalam pada δ 0.0 dan pelarut CD₃OD pada δ 3,3, sedangkan pengukuran spektrum dekopling-proton ¹³C NMR, atau INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer), CDCl₃ pada δ 77,03, dan CD₃OD pada δ 49,0 digunakan sebagai standar dalam Pengukuran spektrum INEPT dilakukan untuk membantu menentukan gugus metil (CH₃, q), metilen (CH₂, t), metin (CH, d) dan karbon kuartener (C, s).

Kromatografi lapisan tipis (TLC) dilakukan pada pelat TLC silika gel Merck GF254 dengan ketebalan 0.25 mm untuk analisa secara kualitatif dan Q5 mm digunakan untuk preparatif. Identifikasi spot mula-mula dimonitor dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, dan setelah itu dideteksi dengan menggunakan pereaksi pewarna larutan anisaldehyd-asam sulfat dalam pelarut etanol, dengan pemanasan pada suhu 106150°C- Kromatografi kolom dikerjakan dengan silika gel (Fuji Silysia BW820 MH),

HPLC preparatif menggunakan kolom fasa terbalik Capcel Pak C18, dengan ukuran 6 mm x 250 mm dan UV detektor S-310A Waters. Semua pelarut yang digunakan dalam analisa dengan TLC dan pemuraian dengan kolom silika gel adalah pelarut teknis, sedangkan pelarut yang digunakan pada kolom Sephadex LH-20 dan HPLC, dan dalam penentuan aktif optis adalah proanalisis. Penguapan pelarut dalam melakukan proses maserasi atau kromatografi menggunakan rotary evaporator, dengan pemanas air pada suhu sekitar 40°C.

Isolasi dan Pemurnian.

Contoh *Smilax cordifolia*, dibeli dipasar pada bulan Juli tahun 1992, di Meksiko. Sebanyak 160 g kulit batang tanaman tersebut, dihaluskan dan berturut-turut direndam dalam pelarut eter (2 x 500 ml) dan metanol (MeOH) (2 x 500 ml), masing-masing diperoleh 420 mg ekstrak eter dan 26 g ekstrak MeOH. Ekstrak eter tersebut difraksinasi pada kolom silika gel dengan menggunakan campuran eluen CH₂Cl₂ - MeOH secara gradien, didapatkan 6 fraksi. Fraksi ke4 sebanyak 33 mg dan fraksi ke-5 sebanyak 29 mg masing-masing dimurnikan lebih lanjut melalui kromatografi kolom, menghasilkan senyawa mumi 1 (14 mg), dan 2 (11 mg). Kedua senyawa tersebut diasetilasi dengan menggunakan pereaksi anhidrida asam asetat (AC₂O) secara berlebih dan sebagai katalis digunakan piridina dengan komposisi 1: 1 (AC₂O: piridina), pada suhu kamar selama sekitar 16 jam. Kedua reaksi tersebut kemudian dimurnikan melalui kolom silika gel, berturut-turut menghasilkan senyawa 18 dan 2a.

Untuk identifikasi ekstrak MeOH, pertama sebanyak 0,9 g, diisolasi melalui kromatografi kolom, Sephadex LH 20 sebagai fasa diam, dan MeOH sebagai fasa gerak. Fraksi ke-6, dimurnikan lebih lanjut dengan lobar kromatografi kolom RP18, dengan MeOH: H₂O = 2: 3 digunakan sebagai fasa gerak dan HPLC (MeOH: H₂O = 1: 1), didapatkan senyawa murni 3 (6 mg). Pada percobaan kedua, 5 g ekstrak MeOH dikromatografi kolom pada silika gel dengan eluen, campuran MeOH: CH₂Cl₂ dengan perbandingan 1: 19. kemudian polaritasnya dinaikkan secara bertahap, didapatkan 8 fraksi. Satu diantara fraksi tersebut, yaitu fraksi ke4 sebanyak 152 mg dimurnikan melalui kromatografi kolom (MeOH: CH₂Cl₂ = 1: 9) dan menghasilkan senyawa 4 (14 mg) dan 5 (4 mg) setelah

direkristalisasi dengan pelarut MeOH. Terakhir, 20 g ekstrak MeOH dilarutkan dalam air sebanyak 200 ml dan diekstraksi dengan pelarut etil asetat sebanyak 3 vc 250 ml EtOAc dan didapatkan fraksi EtOAc sebanyak 6 g. Fraksi tersebut diisolasi dengan menggunakan kromatografi kolom dan TLC preparatif, dan didapatkan senyawa 3 dan 6, masing-masing sebanyak 30 mg dan 31 mg.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Senyawa 1 tidak larut dalam pelarut CDCl₃ ataupun CD₃OD, maka untuk memudahkan pengukuran NMR, senyawa tersebut diasetilasi dengan menggunakan pereaksi Ac₂O-piridina didapatkan senyawa la, yang dapat larut dalam CDCl₃. Hasil pengukuran spektrum IR, senyawa la menyatakan adanya gugus ester pada pita serapan 1745, 1240 cm⁻¹.

Spektrum ¹H NMR dari senyawa la (Tabel 1) memperlihatkan adanya 2 metil singlet pada δ 0,67 (CH₃-18) dan 0,99 (CH₃-19), tiga metil doublet pada δ 0,93 (CH₃-21, d, J = 6,7 Hz), 0,84 dan 0,81 (masing-masing, CH₃-26, CH₃-27, d, I = 7.0 Hz), satu metil tnpet pada δ 0,85 (CH₃-29, t, J = 7,3 Hz), proton olefinik pada δ 5,35 (H-6, bd, J = 5,2 Hz), proton oksimetin pada δ 3,48 (H-3, tt, J = 6,5; 4,6 Hz). Dengan melihat bentuk pemisahan spin-spin dari sinyal gugus-gugus metil, oksimetin dan proton olefinik tersebut, dapat diduga bahwa senyawa ini merupakan suatu sterol, tentu saja dengan gugus hidroksi (oksimetin) terletak pada C-3.

Disamping itu adanya 4 gugus asetil, menyatakan adanya 4 gugus hidroksi, yang menunjukkan adanya gugus glukosil. Hal tersebut didukung dengan adanya resonansi proton anomerik pada δ 4,59 (d, J = 7,9 Hz). Tetapan kapling proton anomerik tersebut cukup besar, maka konformasi gugus glukosil tersebut adalah beta (p). Spektrum ¹³C-NMR juga mendukung adanya 6 gugus metil pada δ 11,9; 19,4; 18,8; 19,8; 19,1; dan 12,0, ikatan rangkap pada δ 140,5 (s) dan 122,2 (d) (lihat Tabel 1). Berdasarkan data tersebut, dan dibandingkan dengan data dari literatur [1], dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 merupakan 3 β -O- β -D-glukopiranosil sitosterol.

Spektrum ¹H NMR senyawa 2 menunjukkan kemiripan dengan senyawa 1, kecuali dengan munculnya puncak baru pada δ 4,6 (dd, J = 12,0; 2,8 Hz), 4,22 (dd, J = 12,0; 5,2

Hz) dan 2,31 (t, J = 7,3 Hz), 1,29 (bs), dan metil triplet pada δ 0,89 (t, J = 7,0 Hz), yang merupakan alkil suatu ester. Adanya gugus gugus fungsional tersebut juga didukung oleh data spektrum ¹³C NMR (Tabel 1).

Senyawa 2 kemudian diasetilasi, memberikan senyawa turunan tri asetil (2a) yang dikonfirmasi oleh spektrum ¹H NMR pada δ 2,03; 2,01; dan 1,93. Berdasarkan data tersebut di atas, dan dikonfirmasi dengan data dari literatur [2] bahwa senyawa 2 merupakan 6-O-acyl-glucopyranosyl sitosterol. Mengingat berat molekul sulit untuk ditentukan, maka berdasarkan hasil integrasi jumlah proton pada δ 1,29 sebanyak 36H, dapat disimpulkan alkil atau asam lemak tersebut mempunyai nilai n dengan jumlah genap (14, 16, dan 18) yang pada umumnya terdapat sebagai campuran pada tanaman maupun hewan [3]. Dengan demikian senyawa 2 merupakan campuran 6-O-palmitoil glukopiranosil sitosterol, 6-O-stearil glukopiranosil sitosterol, dan 6-O-arakidoil glukopiranosil sitosterol [2].

Senyawa 3 didapatkan dalam bentuk kristal dengan tl. 18g/190°C, [α]_D²² 10,98 (EtOH, c = 0.1), dan dalam spektrum IR dapat diketahui adanya gugus hidroksi pada pita serapan 3400-3200 cm⁻¹, dan gugus karbonil pada 1640 cm⁻¹. Spektrum massa menunjukkan berat molekul 450, berdasarkan fragmen pada m/z 302 (M⁺ - C₆H₁₂)⁴ adalah indikasi hilangnya satu gugus ramnosil. Data ¹H dan ¹³C dalam Tabel 2, didukung berdasarkan hasil pengukuran spektrum INEPT dan ¹H-¹³C COSY (Correlation Spectroscopy), seperti terlihat dalam Gambar 2. Hubungan sinyal ¹H dan ¹³C tersebut ditentukan dengan adanya perpotongan sinyal-sinyal tersebut. Misalnya CH-5 mempunyai resonansi proton aromatik H-5' pada δ 6.81(s), sedangkan resonansi karbon C-5' pada δ 116,39.

Mengacu pada data spektrum massa, dan data spektrum NMR (Tabel 2), senyawa 3 mempunyai rumus molekul C₂₁H₂₂O₁₁ dengan bilangan ketidak jenuhan adalah sepuluh. Data spektrum ¹³C NMR memperlihatkan adanya 2 gugus aromatik dan satu gugus karbonil, berdasarkan puncak dengan nilai pergeseran kimia diatas 100. Tidak adanya sinyal sp² lainnya menyatakan ada satu gugus yang berbentuk cincin.

Spektrum ¹H NMR (Tabel 2) menunjukkan adanya sinyal alifatik suatu flavonol pada δ 5,1 dan 4,59 (masing-masing, H-2, H-3, d, J = 10,7 Hz). Tetapan kapling sebesar J = 10,7 Hz, membuktikan bahwa

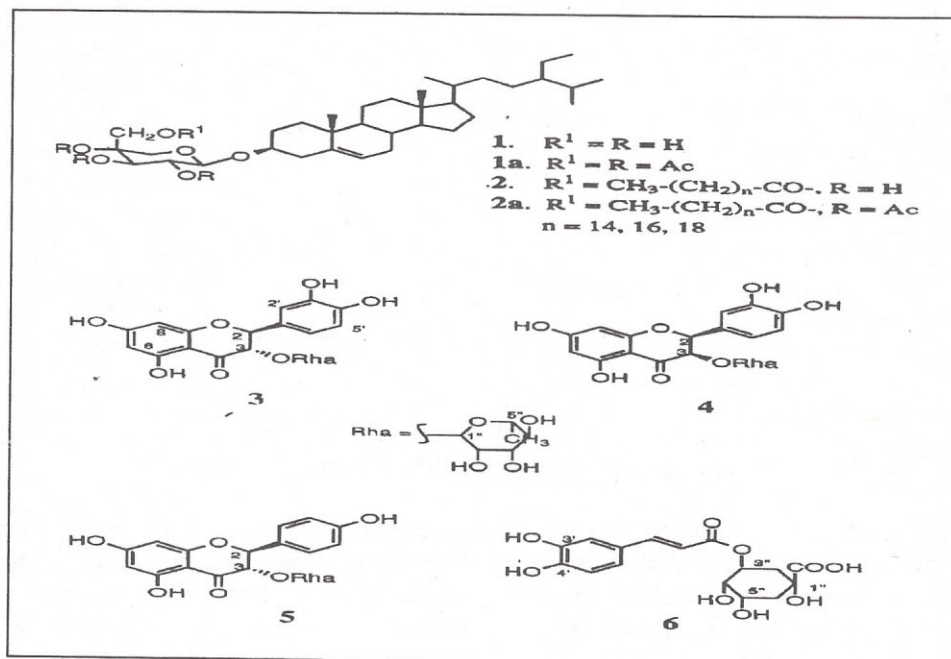
hubungan proton H-2 dan H-3 adalah secara trans. Lima puncak proton aromatik ditunjukkan pada δ 5,93; 5,91 (masing-masing, H-6, H-7, d, $J = 2,1$ Hz); 6,95 (H-2', d, $J = 2,1$ Hz), 6,81 (H-5', s), 6,82 (H-6', d, $J = 2,1$ Hz). Spektrum ^1H NMR tersebut juga menyatakan adanya satu

proton anomerik pada δ 4,1 (H-1", d) dengan konstanta $J = 1,5$ Hz dan satu metil doublet pada δ 1,17 (CH₃-6", $J = 6,1$ Hz), yang diidentifikasi sebagai gugus α -rhamnose.

Tabel 1. Data ^1H dan ^{13}C NMR untuk Senyawa 1a dan 2 (CDC13).

Posisi C/H	1a		2	
	δc	δH (J dalam Hz)	δH (J dalam Hz)	
1	373		37,4	
2	29,5		29,6	
3	80,1	3,48 (tt, $J = 6,5; 4,6$)	79,6	3,57 (m)
4	39,0		39,0	
5	140,5		140,4	
6	122,2	5,35 (dd, $J = 5,2$)	122,2	5,36 (dd, $J = 7,3; 2,8$)
7	32,0		32,0	
8	32,0		32,0	
9	50,3		50,3	
10	36,8		36,8	
11	21,1		21,2	
12	39,9		39,9	
13	42,4		42,5	
14	56,9		56,9	
15	24,3		25,0	
16	28,3		28,3	
17	56,2		56,3	
18	11,9	0,67 (s)	11,9	0,68 (s)
19	19,4	0,99(s)	19,4	1,0 (s)
20	36,2		36,2	
21	18,8	0,93 (d, $J = 6,7$)	19,1	0,92 (d, $J = 6,4$)
22	34,1		34,3	
23	26,3		26,4	
24	46,0		46,0	
25	29,4		29,4	
26	19,8	0,84 (d, $J = 7,0$)	18,8	0,84 (d, $J = 7,0$)
27	19,1	0,81 (d, $J = 7,0$)	19,8	0,81 (d, $J = 7,0$)
28	23,2		23,2	
29	12,0	0,85 (t, $J = 7,3$)	12,1	0,83 (t, $J = 7,0$)
1'	99,7	4,59 (d, $J = 7,9$)	101,1	4,35 (d, $J = 7,6$)
2'	71,7	4,95 (dd, $J = 9,5; 7,9$)	73,7	3,35 (dd, $J = 7,6; 8,9$)
3'	73,1	5,2i (t, $J = 9,5$)	76,2	3,45 (t, $J = 8,9$)
4'	68,8	5,08 (t, $J = 9,5$)	70,4	3,40 (dd, $J = 8,9$)
5'	71,8	3,68 (ddd, $J = 9,5; 5,2; 2,8$)	74,0	3,55 (ddd, $J = 11,6; 8,9; 2,5$)
6'	62,3	4,13 (dd, $J = 12,2; 2,8$)	63,4	4,30 (dd, $J = 11,6; 2,5$)
		4,25 (dd, $J = 12,2; 5$)	4,42 (dd, $J = 11,6; 5,2$)	
			14,1	0,89(t, $J=7,0$)
			29,7	1,26 (36H, bs)
			174,5	

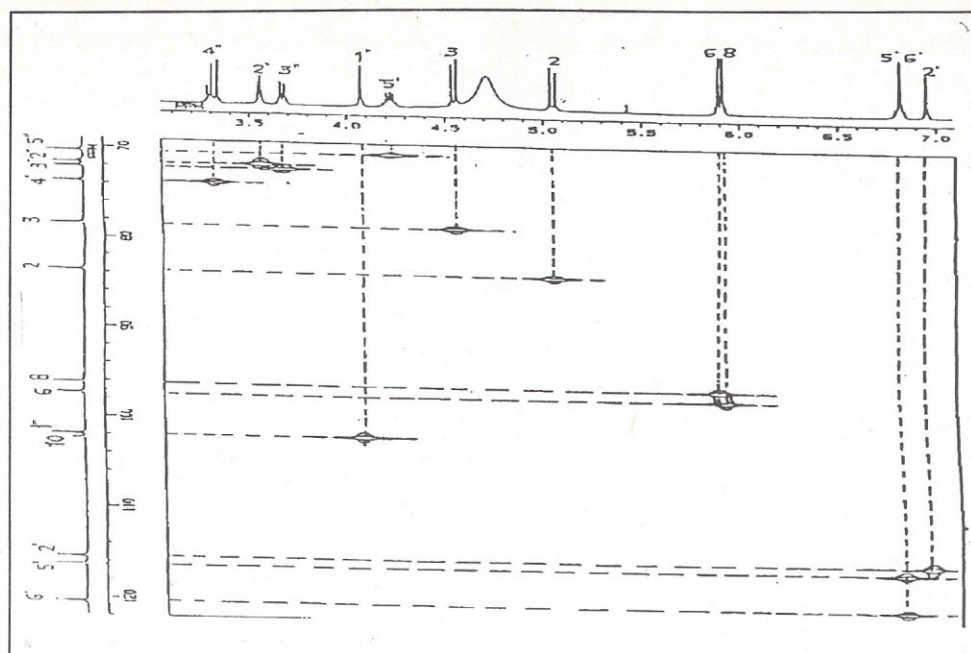
1a. CH₃C00: δC 21,1; 20,7; 20,6; 20,6 (170,6; 170,3; 169,2; 169,2)
 δH 1,99; 2,01; 2,04; 2,07



Gambar 1. Kandungan senyawa kimia dari *S. cordifolia*.

Tabel 2. Data-H dan C N M R untuk Senyawa 3, 4, 5 (C D30 D)

Posisi C/H	δC	δH (J dalam Hz)	δC	δH (J dalam Hz)	δC	δH (J dalam Hz)
2	83,78	5,10 (d, J = 10,7)	82,13	5,40 (d, J = 2,8)	83,75	5,12 (d, J = 10,7)
3	78,51	4,59 (d, J = 10s7)	75,62	4,19 (d, J = 2,8)	78,59	4,59 (d, J = 10,7)
4	195,76		194,34		196,66	
5	165,30		166,37		168,62	
6	97,41	5,93 (d, J = 2,1)	97,43	5,92 (d, J = 2,1)	97,43	5,93 (d, J = 2,1)
7	168,39		168,33		170,54	
8	96,27	5,91 (d, l = 2s1)	96,29	5,91 (d, l = 2,1)	96,29	5,92 (d, J = 2,1)
9	163,92		164,49		164,03	
10	102,48t		101,88		102,08	
1'	129,14		128,75		130,00	
2'	115,30	6,95 (d, J = 2,1)	115,38	6,95 (d, J = 2,1)	129,84	7,32 (dd, J = 8,2; 2,1)
3'	146,37		146,38		116,12	6,82 (dd, J = 8,2; 2,1)
4'	147,20		147,70		159,30	
5'	116,39	6,81 (s)	116,39	6,84 (d, J = 2,1)	116,45	6,82 (dd, J = 8,2; 2,1)
6'	120,47	6,82 (d, J = 2s1)	119,48	6,84 (d, J = 2,1)	129,89	7,32 (dd, J = 8,2; 2,1)
1''	102,01	4,10 (d, l = 1,5)	100,27	4,95 (d, J = 1,8)	102,04	4,01 (d, J = 1,8)
2''	71,68	3,55 (dd, J = 3,94; 1,5)	72,09	3,67 (dd, J = 3,4; 1,8)	71,65	3,50 (dd, J = 3,7; 1,8)
3''	72,16	3,67 (d, J = 9,8; 3,7)	72,12	3,945 (dd, J = 9,8; 3,4)	72,16	3,64 (dd, J = 9,5; 3,7)
4''	73,80	3,33 (t, J = 9,8)	73,46	3,20 (t, J = 9,8)	73,75	3,28 (t, J = 9,5)
5''	70,43	4,25 (d, J = 9,9; 6,1)	70,41	2,50 (dq, J = 9,8; 6,1)	70,24	2,50 (dq, J = 9,5; 6,4)
6''	17,77	1,17 (d, J = 6,1)	17,75	0,94 (d, J = 6,1)	17,78	0,94 (d, J = 6,4)



Gambar 2. Hasil pengukuran spektrum INEPT dan ^1H - ^{13}C COSY.

Spektrum ^{13}C NMR juga memperlihatkan adanya gugus-gugus tersebut diatas (Table 2), disamping gugus karbonil pada δ 195,76 (C4), lima oksikarbon pada δ 165,30 (C-5), 168,39 (C-7), 163,92 (C-9), 146,7 (C-3), 147,2 (C4'), dan dua atom karbon kuartener suatu aromatik pada δ 102,48 (C-10), 129,14 (C-1'). Berdasarkan data tersebut, yang didukung dengan spektrum ^1H - ^1H COSY dan dibandingkan dengan data dari pustaka [4] maka dapat disimpulkan bahwa senyawa 3 diidentifikasi sebagai 3-O- α -L-rhamnosyl taxifolin, dikenal dengan nama Astilbin, yang telah diisolasi dari bahan obat tradisional China, *Engelhardtia chrysolepsis*. Senyawa ini mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, anticendawan, dan antivirus [8].

Senyawa 4 dengan tl. 170-172°C, mempunyai data spektrum NMR yang mirip sekali dengan senyawa 3 (Tabel 2), tetapi sinyal proton H-2 pada δ 5,40 (d) dan H-3 pada δ 4,19 (d), mempunyai hubungan secara cis. Hal tersebut dimanifestasikan dengan nilai J sebesar 2.8 Hz. Berdasarkan data tersebut, senyawa 4 ditetapkan sebagai Isoastilbin.

Senyawa 5 diisolasi dalam bentuk kristal, dengan nilai $[\alpha]_D^{24}$ -34,90° (CHCl₃, c = 0,1), tl. 171-173°C. Spektrum IR senyawa 5 menunjukkan adanya gugus hidroksi pada 3400-3200 cm^{-1} , karbonil pada 1640 cm^{-1} . Senyawa 5 juga menunjukkan kemiripan dengan senyawa 3, tetapi menunjukkan 6 proton aromatik, dan 4

oksikarbon. Adanya perbedaan tersebut ditunjukkan dengan hilangnya gugus hidroksil (oksikarbon) C-3' dan munculnya puncak proton aromatik baru pada δ 6,82 (H-3', dd, I = 8,2; 2,1 Hz). Bertitik tolak dari data tersebut, dan data NMR senyawa 3 atau 4, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa 5 adalah Engelitin, telah diisolasi dari tanaman obat *Exocarpos spp.* (Santalaceae), dan mempunyai aktivitas sebagai anticendawan [8].

Senyawa 6 diisolasi dalam bentuk bubuk, $[\alpha]_D^{22}$ -122,96 (H₂O, c = 0,07), dengan tl. 206-209°C. Berpanduan pada data spektrum ^1H , ^{13}C NMR dan INEPT, maka rumus molekul senyawa 6 adalah C₁₆H₁₈O₉ dan mempunyai delapan bilangan ketidakjenuhan. Dalam spektrum IR senyawa ini menampilkan pita serapan pada panjang gelombang 3400-3300 cm^{-1} dan 1700 cm^{-1} , yang masing-masing menyatakan adanya gugus hidroksi dan ester konjugasi.

Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR senyawa 6 menyatakan adanya satu cincin aromatik tersubstitusi dengan tiga substituen, yang dikaitkan dengan adanya 3 sinyal proton aromatik pada δ 7,09 (s, H-2'), 6,87 dan 7,02 (masing-masing, 1H, H-5', H-6', d, J = 8,2 Hz), dan enam sinyal karbon pada δ 127,84 (s, C-1'), 116,02 (d, C-2'), 148,66 (s, C-3'), 145,20 (C4'), 117,1 (d, C-5'), dan 123,45 (d, C4'). Adanya trans olefin diperlihatkan adanya resonansi proton pada δ 7,53 dan 6,29 (masing-masing, 1H, H-3, H-2, d, J = 15,9 Hz),

sedangkan resonansi karbon pada δ C 115.50 (d, C-2) dan 148.85 (d, C-3), serta karbonil suatu konyugasi ester pada δ 169,2 (C-1). Beranjak dari data spektroskopi tersebut, senyawa 6 merupakan turunan senyawa asam kafeat.

Disamping itu spektrum ^1H NMR juga menggambarkan adanya gugus kuinoat dengan tampilnya 3 puncak oksimetin pada δ 5,29 (td, H-3", J = 9,8; 4,9 Hz), 3,82 (dd, H4", J = 9,8; 3,1 Hz), 4,22 (ql, H-5', J = 3,1 Hz), dan 2 gugus metilen pada δ 2,15; 2,0; dan 2,03; 2,16, masing-masing H-2", H-6", dd, J = 12,7; 3, 1 Hz. Spektrum ^{13}C NMR juga mendukung adanya gugus-gugus tersebut diatas, yaitu 3 karbon oksikrnetin pada δ 72.18 (d, C-3w), 73.87 (C4"), 71.71 (C-S"), dan oksikarbon pada δ 77,75 (C-1"), serta dua karbon metilen pada δ 38,26 (C2"), 39,41 (C-6"), disamping gugus karboksil pada δ 181.53 (s, C-7"). Berdasarkan data tersebut, dan didukung oleh spektrum ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY [5], maka senyawa 6 diidentifikasi sebagai asam 3-kafeoil kuinat atau asam klorogenat [6]. Menurut sumber pustaka [8] senyawa 6 menunjukkan aktivitas sebagai antibakteri, antimutagenik, antitumor, antivirus, dan antioksidan.

KESIMPULAN

Pada penelitian pendahuluan dari kulit batang tanaman obat tradisional *S. cordifolia* telah berhasil diisolasi lima senyawa murni dan satu senyawa campuran (2), dan semua senyawa ini telah diisolasi dari tanaman obat lain. Dua senyawa steroid saponin (1) dan (2), diperoleh dari ekstrak eter tanaman tersebut. Sedangkan empat senyawa murni lain yaitu astilbin (3), dan diastereoisomernya isoastilbin (4) dan engelitin (5) serta senyawa turunan fenolat sebagai asam klorogenat,(6). Senyawa 5 memperlihatkan aktivitas sebagai anticendawan, sedangkan senyawa 3 dan C mempunyai aktivitas sebagai anticendawan, antibakteri, dan antivirus. Disamping itu senyawa 6 juga menunjukkan aktivitas sebagai antimutagenik, antitumor, dan antioksidan [8]. Pada hasil penelitian pendahuluan ini, senyawa-senyawa baru belum berhasil diketemukan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam usaha untuk mendapatkan senyawa-senyawa bioaktif baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan (Monbusho) Jepang, atas pemberian beasiswanya untuk melakukan penelitian ini. Tak lupa pula ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof. Takashi Tokoroyama dan Dr. Kozo Shibata (Faculty of Science, Osaka City University) atas saran-sarannya selama melakukan penelitian ini. Kepada Professor Tetsuya Ogura, dari Universidad Autonoma De Guadalajara, Meksiko, penulis juga mengucapkan terima kasih atas bantuannya untuk mendapatkan sampel tanaman obat tradisional *S. cordifolia*, serta ucapan terima kasih disampaikan kepada Mr. S. Shimada, Faculty of Science, Osaka City University, atas bantuannya untuk pengukuran spektrometri massa.

DAFTAR PUSTAKA

1. H. Kojima, N. Sato, N. Sato, A. Hatano, H. Ogura. Sterol glucosides from *Prunellavulgaris*. *Phytochemistry*. 29(7):2351-55(1990).
2. S. Kadota, N. Lami, Y. Tezuka, T. Kikuchi. Constituents of the Roots of *Boerhaava-diffusa* L. *Chem. Pharm. BuU*. 37(12): 34143420 (1989)
3. D. W. Martin, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. *Harper's Review of Biochemistry*, 14th ed. Lange Medical Publication, Maruzen Asia, Singapore, 1983, pp. 188.
4. R. Kasai, S. Hirono, W.H. Chou, O. Tanaka, F.H. Cheo. Sweet Dihydroflavonol Rhamnoside from Leaves of *Engelhardtia chrysolepsis*, a Chinese Folk Medicine, Hung qi. *Chem.Pharm. Bull.* 36 (10): 4167-70 (19Q38).
5. M. Hanafi. MSc. Studies On the Chemical Constituents of some Plants from Malaysia, Tibet and Mexico. Thesis, Osaka City University (1993)
6. S. Budari, M. J. O. Neil, A. Smith, and P. E Heckelmen. *The Merk Index*, 11 th ed. Mercic&Co. Inc., Rahway, NJ., USA. 1989; pp330.
7. A. H. William. Phenolic Compounds of *Smilax glycyphylla*, *Phytochemistry*.6(11): 1583-1584(1967).
8. J. B. Harborne and H. Baxter. *Phytochemical Dictionary, A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor & Francis, London, Washington, DC. 1993, pp. 370, 386, 475.

STUDI KIMIA SENYAWA GLIKOSIDA TUMBUHAN SUNGKEI, *PERONEMA CANESCENS* (VERBENACEAE)

Partomuan Simanjuntak

Puslitbang Bioteknologi-LIPI
Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911

INTISARI

Dua senyawa glikosida dari ekstrak metanol *Peronema canescens* Jack. (Verbenaceae) telah diisolasi dan dielusidasi struktur kimianya. Senyawa fenolik dan flavonoid glikosida tersebut ditentukan berdasarkan data-data spektrometri dari Resonansi Magnet Inti (RMI) proton, 13 karbon, masa dan dengan bantuan ultra-lembayung (ditambah dengan reagen diagnostika untuk senyawa flavonoid glikosida).

ABSTRACT

Two glycoside compounds from methanol extract of *Peronema canescens* Jack. (Verbenaceae) were isolated and elucidated using on the basis of Nuclear magnetic resonances (^1H -, ^{13}C -NMR), mass and ultra-violet (with diagnostic reagent).

PENDAHULUAN

Sungkei, *Peronema canescens* Jack. adalah suatu tumbuhan obat dari familia Verbenaceae dan banyak di kenal sebagai nama *Jati Sabrang* (Jawa, Sunda); *Sungkai*, *Sungaki* atau *Sungkei* (Sumatera, Bengkulu), dan *Kurus* (Kalimantan, Banjarmasin). Tumbuhan ini banyak tumbuh di hutan campuran terutama di hutan sekunder. Berdasarkan informasi daun *sungkei* banyak digunakan di daerah Bengkulu sebagai obat tradisional yaitu untuk antimalaria [1].

Tujuh senyawa furanoditerpenoid tipe klerodan (clerodane) dari ekstrak aseton daun *Sungkei*, *Peronema canescens* telah berhasil dielusidasi struktur kimianya yang disebut peronemin B₂ (1), A₂(2), B₃(3), A₃(4), B₁(5), C₁(6) dan D₁(7) [2].

Dalam tulisan ini akan dilaporkan dua senyawa glikosida (8 dan 9) yang diisolasi dan dimurnikan dari ekstrak metanol. Identifikasi

dan elusidasi struktur kimia kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektrometri RMI proton dan 13 karbon, masa dan dengan bantuan spektra ultra-lembayung (ditambah dengan reagen diagnostik untuk identifikasi senyawa flavonoid glikosida) (Gambar 1).

METODOLOGI

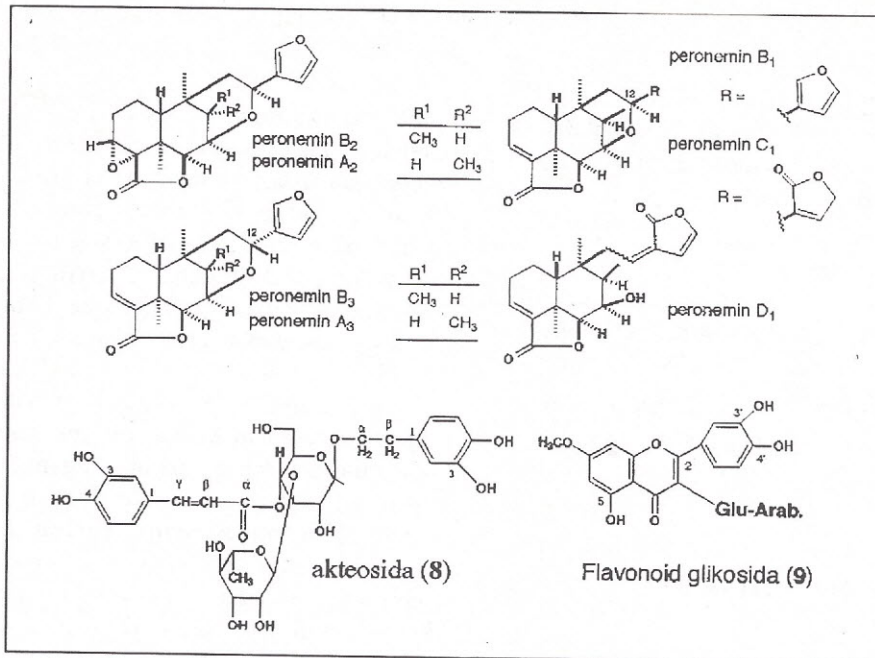
Daun kering *Sungkei* diekstraksi dengan pelarut aseton panas sebanyak tiga kali. Residu atau ampas daunnya diekstraksi kembali dengan pelarut metanol panas (60-70°C) sebanyak tiga kali, kemudian pemisahan dan pemurniannya dilakukan pada kromatografi kolom silika gel dengan menggunakan sistem pelarut kloroform : metanol : air = 65 : 35 : 10. Terhadap contoh yang telah dimurnikan dilakukan elusidasi strukturnya dengan kombinasi metoda RMI proton, 13 karbon, masa, infra- merah (IM) dan ultra-lembayung (UL). Keseluruhan proses tersebut secara skematis dapat dilihat pada gambar 2.

BAHAN DAN ALAT

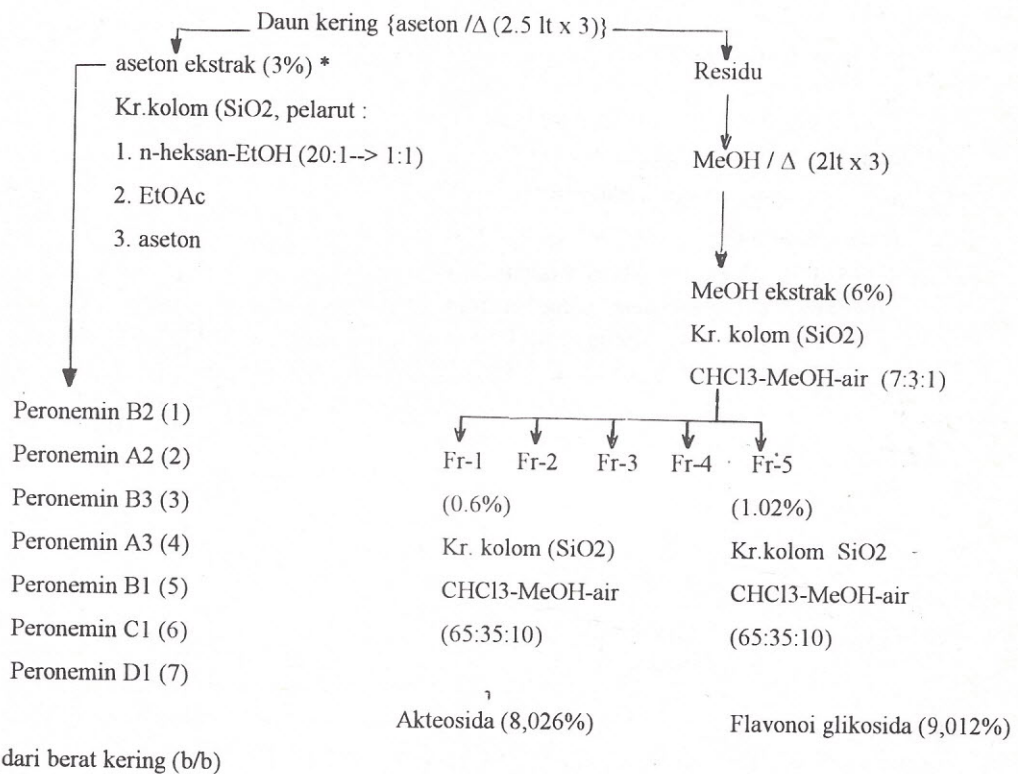
Bahan

Daun kering *Sungkei*, *Peronema canescens* dikumpulkan dari daerah propinsi Bengkulu pada bulan Agustus 1990. Ekstraksi dilakukan dengan aseton panas, kemudian ampasnya diekstraksi kembali dengan metanol panas. Untuk kromatografi kolom digunakan kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merck) sebagai fasa diam dan campuran kloroform : metanol : air = 65 : 35 : 10 sebagai eluen. Untuk kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan kiesel gel 60 F₂₅₄ plates (0.2 mm, Merck) dan pendeteksian spot pada KLT dilakukan dengan menggunakan reagen 1% Ce(SO₄)₂/10% H₂SO₄ pekat. Reagen diagnostika untuk uji flavonoid yang digunakan adalah pelarut natrium metanolat, natrium asetat, kom-

binasi natrium asetat-asam borat dan aluminium klorida.



Gambar 1. Struktur senyawa kimia hasil isolasi dari *Peronema canescens*.



Gambar 2. Prosedur isolasi senyawa kimia 1-9

Alat

Spektrometer Hitachi 330 untuk pengambilan spektra UL, spektrometer JASCO FT/IR (dengan pelet KBr) untuk pengambilan data spektra infra-merah, data spektra masa (FAB-MS) diperoleh dengan spektrometer JEOL SX-102, data spektra proton dan ^{13}C karbon RMI diukur dengan spektrometer JEOL JNM EX-270. Identifikasi adanya gugus gula dilakukan dengan menggunakan alat GC Shimadzu GC-9A, dengan kondisi ; kolom : 2% OV-17; temp. kolom : 140°C ; gas pembawa : nitrogen; flow rate : 50 ml/men.; temp. injeksi : 180°C ; detektor : FID.

HASIL DAN DISKUSI

Senyawa 8 yang diperoleh mempunyai bentuk serbuk amorf. $[\alpha]_{\text{D}} - 82.9^{\circ}$ ($c=1.17$, dalam pelarut metanol), dan dari data spektrometri Masa (FAB-MS) memberikan m/z 647.1954 ($M+\text{Na}^+$) dengan rumus molekul $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}\text{Na}$ (Calcd. 647.1953).

Pengamatan dengan spektrum infra-merah (IM) menunjukkan adanya gugus hidroksil (3335 cm^{-1} , melebar), gugus ester terkonjugasi (1697 cm^{-1}), ikatan ragkap dua (1628 cm^{-1}), dan cincin aromatik ($1511, 1603\text{ cm}^{-1}$). Hasil analisis RMI proton memberikan spektrum yang menunjukkan adanya gugus metil sekunder [$\delta\text{H } 1.10$ (3H, d, $J=6.3\text{ Hz}$)], proton etilen pada [$\delta\text{H } 2.75$ dan 4.04 (masing-masing 1H, keduanya t, $J=7.3\text{ Hz}$)], dua proton anomerik pada [$\delta\text{H } 4.38$ (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$) dan $\delta\text{H } 5.19$ (d, $J=1.3\text{ Hz}$)], dua proton olefenik [$\delta\text{H } 6.28$ dan 7.60 (masing-masing 1H, keduanya d, $J=15.8\text{ Hz}$)] yang memberikan signal tipe AB yang menunjukkan proton trans.

Gugus aromatik ditunjukkan oleh adanya proton-proton yang beresonansi pada medan rendah (low field) yaitu $\delta\text{H } 6.95$ (1H, dd, $J=8.0, 2.0\text{ Hz}$), 6.71 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$), 7.07 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$) yang menunjukkan adanya substitusi gugus hidroksil pada posisi C-3 dan C-4 dari gugus kafeat (cafeic acid). Demikian juga untuk aromatik lain adanya substitusi gugus hidroksil

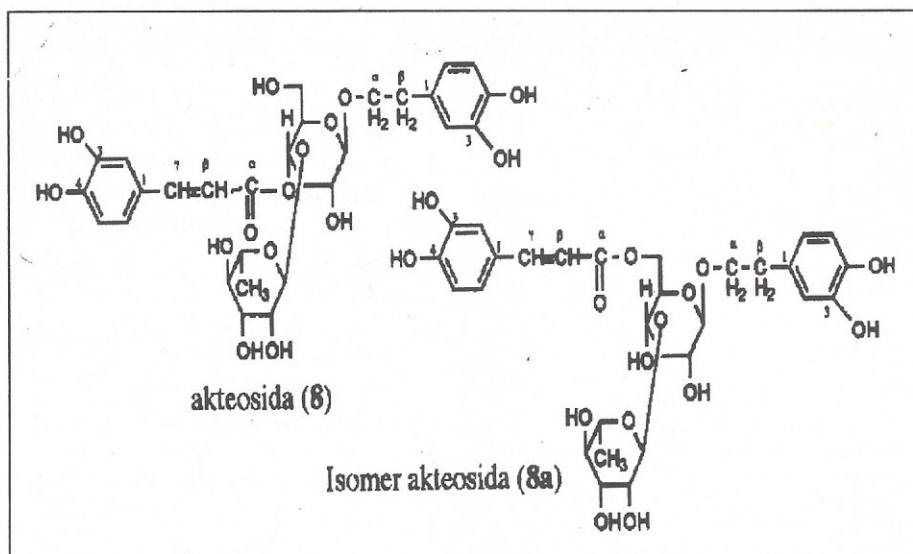
pada posisi C-3 dan C-4 ditunjukkan oleh spektra pada $\delta\text{H } 6.71$ (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$), 6.79 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$) dan 6.56 (1H, dd, $J=8.0, 2.0\text{ Hz}$).

Analisis RMI ^{13}C karbon dan eksperimen DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) memberikan 29 sinyal karbon yaitu satu kuartet, tiga triplet, delapan belas doublet (yang terdiri dari delapan signal karbon pada medan rendah, sepuluh signal karbon pada medan tinggi) dan tujuh singlet (yang terdiri dari satu karbon karbonil, empat signal karbon yang teroksidasi dan dua signal karbon tersier).

Hidrolisis senyawa 8 dalam suasana asam memberikan komponen gula-gula glukosa dan ramnosa dengan perbandingan 1 : 1 yang juga dibuktikan dengan analisis kromatografi gas. Selanjutnya untuk penetapan struktur kimianya, senyawa 8 telah dibandingkan dengan senyawa standar akteosida berdasarkan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan 3 jenis sistem pelarut (CHCl_3 : metanol : air = 10 : 3 : 1; metanol : air = 2 : 1 dan asetonitril : air = 1 : 1) dan spektra proton-RMI (Tabel 1, Gambar 3).

Tabel 1. Data RMI karbon untuk senyawa 8 dan 8a (NMR 67.5 MHz, CD_3OD)

No karbon	8	8a		8	8a		
aglikon	1	131.5	131.4	glukosa	1	103.8	104.2
	2	116.6	116.6		2	75.4	75.3
	3	144.0	144.5		3	81.6	84.2
	4	145.6	145.9		4	70.2	70.0
	5	117.3	117.1		5	75.8	75.5
	6	121.0	121.3		6	62.1	64.7
as. kafeat	α	71.9	72.3	ramnosa	1	102.6	102.8
	β	36.3	36.6		2	71.9	72.2
	1	127.3	127.7		3	71.9	72.2
	2	114.5	115.0		4	73.6	73.7
	3	149.2	149.4		5	70.1	70.6
	4	146.3	146.5		6	18.3	18.4
	5	116.4	116.4				
	6	123.1	123.1				
	α	168.2	169.1				
	β	115.4	115.1				
τ	147.8	147.2					



Gambar 3. Struktur akteosida dan isomernya.

Tabel II. Spektrum UV senyawa 9 dengan variasi reagen diagnostik

Pelarut	Band I(240-280 nm)	Band II(320-340 nm)
Metanol	256, 261	351
NaOMe	215, 242, 248, 262	402
AlCl ₃	254, 261	275, 295, 432
NaOAc	258, 260	352
NaOAc/ H ₃ BO ₃	258, 261	376

Isomer akteosida (8a)

Dari penelusuran data kimia fisika untuk senyawa isomer akteosida (8a) [3] diketahui bahwa data IM, RMI proton hampir sama dengan senyawa akteosida (8). Demikian juga dari hasil hidrolisis senyawa 8a dalam suasana asam memberikan komponen gula-gula glukosa dan ramnosa dengan perbandingan 1 : 1. Tetapi dengan menggunakan analisis RMI ¹³karbon dapat dipastikan bahwa ada perbedaan antara 8 dengan 8a pada dua atom karbonnya, yaitu terdapatnya dua signal karbon pada pergeseran kimia ke medan rendah. Karbon pertama, pada C-3 glukosa mengalami pergeseran kimia

menjadi δC 84.2 (+ 3.6 ppm) dan kedua, pada C-6 glukosa mengalami pergeseran kimia ke δC 64.7 (+ 2.6 ppm). Jadi, struktur 8a merupakan suatu isomer akteosida 8 yang gugus ramnosil dan kafeoil nya berada pada posisi C-3 dan C-6 di dalam gugus glukosa (Tabel 1, Gambar 3).

Senyawa 9 mempunyai bentuk amorf yang berwarna kuning, dan data spektrometri masa (FAB-MS) memberikan nilai m/z 611 (M+H)⁺; 617 (M+Li)⁺; dan 633 (M+Na)⁺ (Tabel II). Spektrum IM menunjukkan adanya gugus hidroksil pada 3300 cm⁻¹ (melebar) dan gugus karbonil pada 1660 cm⁻¹. Hasil analisis proton RMI menunjukkan bahwa pada moiety benzoil terdapat satu gugus metoksi (δH 3.67 ppm). Adanya dua proton yang berada pada posisi H-6 dan H-8 dapat diketahui dari tetapan kopling (coupling constant) sebesar 1.0 Hz (yaitu δH 6.34, 6.47, keduanya d, J=1.0 Hz). Pada gugus sinamoil (cinnamoyl moiety) diketahui adanya spektrum proton yang berada pada posisi H-2', H-5' dan H-6' yaitu masing-masing δH 8.29 (d, J=1.3 Hz), 7.33 (d, J=8.3 Hz) dan 8.39 (dd, J=1.3, 8.3 Hz). Adanya gula glukosa dan arabinosa dapat diketahui dari proton anomernya pada δH 4.38 (d, J=8.0 Hz), δH 5.19 (d, J=1.3 Hz).

Tabel III. Data Spektra proton dan ¹³karbon RMI senyawa 9 (δH 270 MHz, piridin dan 67.5 MHz, piridin)

No.	RMI proton	RMI-karbon	
aglikon	2	-	156.8 (s)
	3	-	134.9 (s)
	4	-	178.7 (s)
	5	-	162.2 (s)
	6	6.47 (d, J=1.0 Hz)	98.2 (d)
	7	-	165.4 (s)
	8	6.34 (d, J=1.0 Hz)	91.9 (d)
	9	-	156.7 (s)
	10	-	106.0 (s)
	1'	-	122.3 (s)
	2'	8.29 (d, J=1.3 Hz)	117.3 (d)
	3'	-	146.8 (s)
	4'	-	150.5 (s)
5'	7.33 (d, J=8.3 Hz)	116.2 (d)	
6'	8.39 (dd, J=1.3, 8.3 Hz)	123.3 (d)	
Ome	3.67 (s)	55.7 (q)	
glukosa	1	5.44 (d, J=6.6 Hz)	106.1 (d)
	2	4.19 (m)	77.6 (d)
	3	4.10 (m)	77.4 (d)
	4	4.24 (m)	75.4 (d)
	5	4.16 (m)	75.3 (d)
	6	4.43 (m)	66.8 (t)
arabinosa	1	6.57 (d, J=7.3 Hz)	100.4 (d)
	2	4.91 (t, J=8.3 Hz)	81.5 (d)
	3	4.19 (m)	70.8 (d)
	4	4.55 (d, J=3.0 Hz)	69.5 (d)
	5	4.21 (m)	61.5 (t)

Hidrolisis senyawa 9 dalam suasana asam memberikan komponen gula glukosa dan arabinosa yang dibandingkan dengan standar pada analisis kromatografi gas. Dari analisis ¹³karbon dan eksperimen DEPT diperoleh dua puluh tujuh signal karbon yang terdiri dari sepuluh (singlet), empat belas (doublet), dua (triplet) dan satu (kuartet) (Tabel III). Dalam menentukan adanya gugus-gugus hidroksil dan metoksil dan posisi kedua gugus tersebut dapat dijelaskan melalui eksperimen UL ditambah dengan reagen diagnostika [4] sebagai berikut :

1. Dengan reagen natrium metanolat menghasilkan munculnya pita baru pada pita I (240 - 280 nm), dan terjadi pergeseran panjang gelombang pada pita II (320 - 340 nm) ke arah yang lebih panjang *bathochromic* sebesar 51 nm. Hal ini menunjukkan terdeteksinya gugus hidroksil pada posisi C-3' dan C-4'.
2. Dengan reagen aluminium klorida menunjukkan tidak terjadi perubahan apa-apa pada

pita I, sedangkan pada pita II muncul pita baru yang menunjukkan adanya gugus hidroksil pada posisi C-3', C-4' dan C-5'.

3. Dengan reagen natrium asetat tidak memberikan adanya perubahan apa-apa pada kedua pita. Hal ini menunjukkan bahwa pada posisi C-7 tidak ada gugus hidroksil tetapi terdapat gugus metoksil.
4. Dengan reagen natrium asetat / asam borat tidak menghasilkan adanya perubahan pada pita I, sedangkan pada pita II terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang gelombangnya yaitu sebesar 25 nm. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat gugus hidroksil pada posisi C-5.

Jadi struktur kimia dari senyawa 9 dapat ditentukan dan merupakan suatu senyawa flavonoid yang disebut sebagai 3',4',5-trihidroksi-7-metoksi flavon-3-O-glukopiranosilara-binosida.

KESIMPULAN

Dari studi kimia terhadap tumbuhan obat tradisional Indonesia, *Sungkei*, *Peronema canescens* (*Verbenaceae*) telah diisolasi dan dielusidasi struktur kimia baru dari senyawaan furanoditerpen tipe klerodan yang dinamakan sebagai peronemin A2, A3, B1, B2, B3, C1, dan D1, dan 2 senyawa glikosida yang telah dikenal yaitu glikosida asam kafeat. Senyawa glikoida yang merupakan senyawa sangat polar diperlukan ekstraksi dengan pelarut-pelarut polar seperti metanol atau air.

PUSTAKA

1. I. Kitagawa, *Research Report of Investigation of Naturally occurring Drug Materials in Indonesia 2*. Osaka (1990).
2. I. Kitagawa, P. Simanjuntak, N. Nagami, T. Mahmud, H. Shibuya and M. Kobayashi, Indonesian Medicinal Plants VII. Seven New Clerodane-type Diterpenoids, peronemin A2, A3, B1, B2, B3, C1 and from leaves of *Peronema canescens* (*Verbenaceae*) *Chemical Pharm. Bull.*, 42, 1050 - 1055 (1994).
3. R. Cooper, P.H. Solomon, I. Kubo, K. Nakanishi, J. Shoolery and J.L. Occolowitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 7953 (1980).
4. T.J. Mabry, K.R. Markham and M.B. Thomas, *The systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York, Berlin (1970).