

ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA FLAVONOIDA DARI CROTALARIA ANAGYROIDES

Abdul Mun'im

Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia,

Departemen Farmasi FMIPA UI Kampus UI, Depok

ABSTRACT

Four flavonoid glycosides have been isolated from the leaves of *Crotalaria anagyroides*. The glycosides are 1) apigenin 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosida, 2) apigenin 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside, 3) chrysoeriol 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, 4) chrysoeriol 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside. Their structures were elucidated by spectroscopic methods of UV, ^1H , ^{13}C and 2D-NMR DEPT, COSY and HMBC experiments.

Key-words: *Crotalaria anagyroides*, apigenin, apigenin 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosida, Chrysoeriol 7-O- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosida.

PENDAHULUAN

Senyawa flavonoida saat ini banyak mendapat perhatian karena, kelompok senyawa ini dilaporkan mempunyai berbagai aktifitas farmakologis seperti: antinflamasi, antioksidan, antibakteri dll. Senyawa ini tersebar pada tumbuhan baik tingkat rendah maupun tinggi, pada hampir pada setiap bagian tanaman.

Dalam rangka mencari senyawa flavonoid aktif baru perhatian tertuju pada genus *Crotalaria* (Mun'im, *et al*, 2003a dan b). Genus ini merupakan genus besar diperkirakan terdiri dari lebih dari 600 spesies. Sebagian besar tumbuh di Afrika dan India. Genus ini umumnya menghasilkan senyawa

alkaloida pirolizidin (Abegaz *et al*, 1987). Selain itu beberapa senyawa flavonoida baru berhasil diisolasi dari tanaman genus ini (Chaturvedi *et al*, 1987; Wanjala and Majinda, 1999).

C. anagyroides banyak tumbuh di daerah tropis. Tanaman ini di Indonesia digunakan sebagai pupuk hijau dan daunnya digunakan sebagai pakan ternak. Hanya ada satu literatur studi fitokimia dari tanaman ini, dimana kulit batangnya dilaporkan mengandung apiin (Subramanian and Nagarajan, 1970).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa flavonoida yang terdapat pada daun *C. anagyroides*.

Corresponding author : E-mail : munimab@yahoo.com

BAHAN DAN METODA

Bahan:

Daun *C. anagyroides* diperoleh dari Bogor. Tanaman dideterminasi di Herbarium Bogoriense. Semua bahan kimia yang digunakan berkualitas pro analisis diperoleh dari Wako (Jepang).

Alat : Spektrum UV dibuat dengan Shimadzu UV-365 spektrofotometer. Spektrum ¹H (400 MHz) dan ¹³C NMR (100 MHz) diperoleh dengan JEOL α 400 dalam DMSO-*d*₆ dengan internal standar TMS. KCKT semipreparatif dilakukan dengan Gaskuro Kogyo model 576 dilengkapi dengan detektor Uvidex 100-II (kolom: TSK gel ODS-80Ts, 250 x 10 mm, eluen 40% DMF dengan laju alir 1,6 ml/menit). KCKT analitik dilakukan dengan Tosoh CCPS dilengkapi dengan detektor Tosoh UV-8020 (kolom: TSK gel ODS-80TS, 250 x 4,6 mm, eluen 35% DMF dengan laju alir 0,6 ml/menit).

Metoda:

Ekstraksi dan Isolasi

Daun tanaman dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Setelah kering kemudian diserbuk. Sejumlah (3 kg) serbuk direfluks dengan MeOH 50%. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Residu yang diperoleh dicuci dengan kloroform berkali-kali, untuk menghilangkan klorofil. Hasil ekstraksi dikeringkan dengan *freeze dryer*.

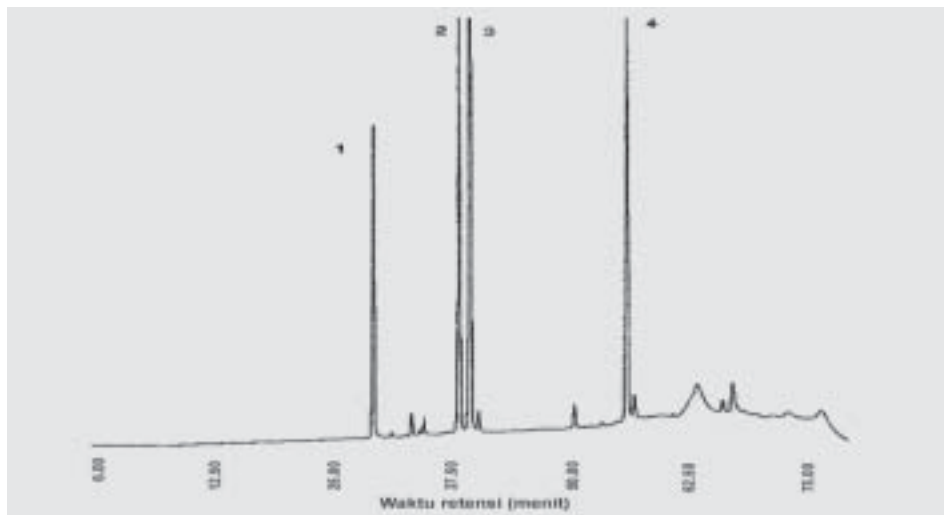
Ekstrak (3 g) yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan kolom Sephadex LH-20 (45 (7 cm) menggunakan eluen dimetil formamida (DMF) 50%. Hasil fraksinasi dimonitor serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 350 nm, diperoleh 4 fraksi.

Fraksi **3** (269 mg) dan **4** (1,5 g) dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan KCKT semipreparatif. Fraksi yang menunjukkan puncak yang sama dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Cairan kental yang diperoleh dikeringkan lebih lanjut dengan *freeze dryer*, dan diperoleh senyawa **1** (32 mg), **2** (87 mg), **3** (44 mg) dan **4** (47 mg).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada ekstraksi daun *C. anagyroides* dengan MeOH 50% diperoleh larutan kental berwarna kuning kehijauan. Setelah dicuci dengan kloroform warna larutan menjadi kuning muda, karena jumlah klorofil berkurang. Kandungan klorofil rendah diharapkan tidak mengganggu proses isolasi.

Fraksi **3** dan **4** dari Sephadex LH-20 dipisahkan lebih lanjut karena memperlihatkan pola kromatogram yang sama dan mengandung flavonoid relatif tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya. Fraksi ini pada HPLC analisis memberikan 4 puncak besar (Gambar 1). Keempat puncak tersebut dipisahkan lebih lanjut dengan KCKT semipreparatif.



Gambar 1. Profil kromatogram fraksi 4 ekstrak MeOH setelah fraksinasi dengan Sephadex LH-20.

Senyawa **1- 4** berupa hablur kuning muda. Berdasarkan pergeseran panjang gelombang pada spectrum UV pada spektrofotometer menunjukkan adanya inti flavonoida. Inti flavon tersebut memiliki gugus hidroksi pada posisi C-5. Hal ini ditunjukkan adanya pergeseran bathochromic pada penambahan $AlCl_3/HCl$, tetapi inti tersebut tidak menunjukkan adanya gugus *o*-dihidroksi pada cincin B, karena tidak memberikan pergeseran kimia pada penambahan $NaOAc/H_3BO_3$ (Mabry *et al.* 1970). Berdasarkan jumlah sinyal pada spectrum karbon NMR (Tabel 2), senyawa **1- 4** memiliki 2 gugus gula.

Pada daerah magnetik rendah spectrum proton NMR senyawa **1** (Tabel 1) menunjukkan adanya 6 puncak yang berasal proton aromatis. Sinyal pada δ 7,58 (1H, *d*, $J= 1,8$ Hz),

7,61 (1H, *dd*, $J= 1,8$ dan 8,5Hz) dan 6,95 (1H, *d*, $J= 8,5$ Hz) menunjukkan tipe katekol pada cincin B (Tabel 1). Sedangkan sinyal pada δ 6,44 (1H, *s*) dan 6,85 (1H, *s*) merupakan sinyal proton yang terikat masing-masing pada C-6 dan C-8. Berdasarkan data tersebut inti flavon tersebut tersubstitusi pada C-5, C-7, C-3' dan C-4'. Sinyal pada δ 3,90 (3H, *s*) merupakan ciri khas dari gugus metoksi. Gugus ini berdasarkan spektrum HMBC terikat pada C-3'. Dengan demikian inti flavon tersebut adalah chrysoeriol.

Spektrum proton NMR juga menunjukkan sinyal pada rentang δ 3,28-5,31. Sinyal ini memberikan cross-peak dengan 11 sinyal karbon (δ 60.2 - 121.2) pada spektrum C-H COSY. Berdasarkan spektrum 1H dan ^{13}C NMR senyawa **1**, sinyal tersebut berasal gugus gula apiosa dan glukosa

Tabel 1. Data ^1H NMR senyawa 1, 2, 3, dan 4 (DMSO- d_6 , 400 MHz).

Posisi	1 (δ ppm, J = Hz)	2 (δ ppm, J = Hz)	3 (δ ppm, J = Hz)	4 (δ ppm, J = Hz)
1				
2				
3	6,97 (1H, s)	6,97 (1H, s)	6,85 (1H, s)	6,85 (1H, s)
4				
5				
6	6,43 (1H, d, J =1,83)	6,44 (1H, s)	6,43 (1H, s)	6,42(1H, s)
7				
8	6,84 (1H, d, J = 2,44)	6,85 (1H, s)	6,80 (1H, s)	6,81 (1H, s)
9				
10				
1'				
2'	7,60 (1H, d, J = 1,83)	7,58 (1H, d, J = 1,83)	7,95 (1H, d, J = 8,51)	7,95 (1H, d, J = 9,14)
3'	3,90 (3H, s)	(3H, s)	6,94 (1H, d, J = 8,13)	6,94 (1H, d, J = 9,14)
4'				
5'	6,95(1H, d, J = 8,53)	6,95 (1H, d, J =8,5)	6,94 (1H, d, J = 8,53)	6,94 (1H, d, J = 9,14)
6'	7,59 (1H, dd, J = 7,31; 1,83)	7,61(1H, dd, J =8,5, 1,8)	7,95 (1H, d, J = 8,51)	7,95 (1H, d, J = 9,14)
Glukosa				
1''	5,11 (1H, d, J =7,92)	5,16 (1H, d, J = 7,3)	5,11 (1H, d, J = 7,92)	5,17 (1H, d, J = 7,3)
2''	3,82 (1H, m)	3,91 (1H, m)	3,86 (1H, m)	3,53 (1H, m)
3''	3,85 (1H, m)	3,90 (1H, m)	3,67 (1H, m)	3,53 (1H, m)
4''	3,71 (1H, m)	3,21 (1H, m)	3,74 (1H, m)	3,22 (1H, m)
5''	3,71 (1H, m)	3,32 (1H, m)	3,70 (1H, m)	3,67 (1H, m)
6''	3,31 (2H, m)	3,71 (2H, m)	3,64 (1H, m)	3,47 (2H, m)
Apiosa				
1'''	5,31 (1H, d, J = 1,22)	5,36 (1H, d, J = 1,2)	5,31 (1H, m)	5,36 (1H, m)
2'''	3,76(1H, m)	3,32 (1H, m)	3,76 (1H, m)	3,49(1H, m)
3'''				
4'''	3,66; 3,92 (2H, m)	3,68; 3,96 (2H, m)	3,75; 3,90 (2H, m)	3,68; 3,92; (2H, m)
5'''	3,55 (2H, s)	3,32 (1H, s)	3,31(2H, s)	3,32 (2H, s)

Ket: J = coupling constant, multiplicity; s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), m (multiplet)

(Agrawal 1992). Berdasarkan spektrum HMBC senyawa **1**, glukosa terikat pada C-7, sedangkan apiosa terikat pada C-6". Dengan demikian senyawa **1** dapat disimpulkan sebagai chrysoeriol 7- O - β -D- apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranosida (Bucar et

al. 1998). Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR senyawa **2** hampir sama dengan senyawa **1**. Hanya terjadi pergeseran sinyal pada spectrum ^{13}C NMR yang berasal dari C-2". Hal ini diakibatkan

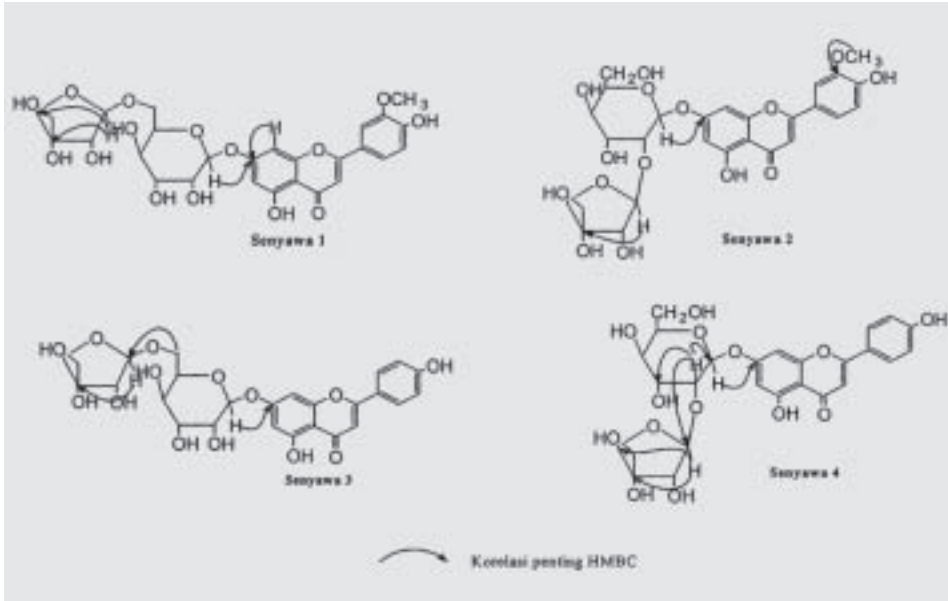
Tabel 2. Data ¹³C NMR senyawa **1**, **2**, **3** dan **4** (DMSO-d₆, 100 MHz)

Posisi C	1 (δppm)	2 (δppm)	3 (δppm)	4 (δppm)
1				
2	164,1	164,1	164,2	164,2
3	103,3	103,4	103,0	102,9
4	181,9	181,9	181,9	181,9
5	161,0	161,0	161,0	162,7
6	99,2	99,3	99,3	99,2
7	162,	162,6	162,6	161,5
8	94,8	94,9	94,7	94,7
9	156,8	156,8	156,8	156,8
10	105,2	105,3	105,3	105,2
1'	121,2	121,2	120,8	120,8
2'	120,4	120,5	128,5	128,5
3'	148,0	148,0	115,9	116,0
4'	151,0	151,0	161,4	161,0
5'	115,7	115,7	115,9	116,0
6'	110,3	110,3	128,5	128,5
Glukosa				
1''	98,7	98,2	98,1	98,6
2''	73,5	75,8	75,7	73,5
3''	73,4	76,0	76,0	73,3
4''	68,4	69,8	69,7	68,3
5''	75,6	76,7	76,7	75,4
6''	64,1	60,4	60,5	60,1
Apiosa				
1''	108,9	108,7	108,6	108,8
2''	76,0	77,0	77,0	75,9
3''	79,1	79,2	79,2	79,2
4''	73,8	73,9	73,9	73,9
5''	60,2	64,1	64,1	64,1

pada senyawa **2** apiosa terikat pada C-2''. Hal ini diperkuat dengan spektrum HMBC senyawa **2**, yang menunjukkan adanya long-range correlation antara sinyal yang berasal dari H-2'' dan C-1''. Berdasarkan hal tersebut struktur senyawa **2** dapat ditentukan sebagai chrysoeriol 7-*O*-β-D- apiofuranosyl(1→2)-β-D- glukopiranosida (Biswass *et al.* 1977).

Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.

Spektrum proton NMR senyawa **3** (Tabel 1) mirip dengan spektrum senyawa **1** dan **2**, hanya pada cincin B senyawa **2** menunjukkan tipikal *para*-hidroksi, yaitu sinyal pada δ 7,95 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz) dan 6,94 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz). Sedangkan sinyal inti flavon lainnya mirip dengan senyawa **1**



Gambar 2. Struktur kimia dan korelasi HMBC yang penting dari senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4**.

ataupun **2**, karena itu inti flavon tersebut adalah apigenin.

Pergeseran kimia sinyal pada spektrum ^1H dan ^{13}C NMR senyawa **3** yang berasal dari gugus gula sama dengan sinyal pada spectrum NMR senyawa **1**. Hal ini juga didukung oleh spectrum H-H COSY, C-H COSY dan HMBC senyawa **3**. Berdasarkan data tersebut senyawa **3** ditentukan sebagai apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glukopyranosida (Kaneko *et al.* 1995). Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.

Spektrum proton dan karbon NMR senyawa **4** hampir mirip dengan senyawa **3**, hanya terdapat pergeseran sinyal pada δ 75,7 yang berasal dari C-2". Dengan demikian

senyawa dapat disimpulkan sebagai apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -glukopiranosida, atau dikenal sebagai apiin. Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Keempat senyawa tersebut sudah dilaporkan sebelumnya, tetapi belum pernah ada laporan tentang isolasi senyawa tersebut dari daun *C. anagyroides*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil tersebut di atas senyawa flavonoida yang terdapat pada daun *C. anagyroides* adalah: apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosil (1 \rightarrow 6)- β -glukopiranosida, apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosil (1 \rightarrow 2)- β -glukopiranosida, chrysoeriol 7-*O*- β -D-

apiofuranosil (1→6)-β-D-glukopiranosida dan chrysoeriol 7-O-β-D-apiofuranosil (1→2)-β-D-glukopiranosida.

Senyawa 1

UV λ_{max} MeOH nm: 252, 269, 346; MeOH + NaOH: 261, 401; AlCl₃: 276, 296 sh, 373sh, 392; AlCl₃+HCl: 277, 296sh, 358, 388; NaOAc: 260, 300sh, 408; NaOAc + H₃BO₃: 253, 269, 348.

Senyawa 2

UV λ_{max} MeOH nm: 251, 268, 346; MeOH + NaOH: 252, 402; AlCl₃: 276, 297, 392; AlCl₃ + HCl: 278, 297, 358, 389; NaOAc: 260, 294, 409; NaOAc + H₃BO₃: 253, 269, 349.

Senyawa 3

UV λ_{max} MeOH nm: 268, 334; MeOH+ NaOH: 268, 386; AlCl₃: 268, 389; AlCl₃ + HBO₃: 269, 338; NaOAc: 277, 300, 349, 384; NaOAc+ HCl: 278, 300, 344, 383.

Senyawa 4

UV λ_{max} MeOH nm: 268, 334; MeOH + NaOH: 268; 386; NaOAc: 269, 390; NaOAc + H₃BO₃: 269, 340; AlCl₃: 276, 300, 344, 384; AlCl₃ + HCl: 277, 301, 349, 384.

Acknowledgements

The author thanks Dr. T Ozawa, Tsukuba University, Japan for 400 MHz NMR measurements.

DAFTAR PUSTAKA

Abegaz, B, Atnafu, G, Duddeck, H and Snatzke, G, 1987. Macrocyclic pyrrolizidine alkaloids of

Crotalaria rosenii. *Tetrahedron*, 43(14): 3263-3268.

Biswass, K M, Ali, M E and Haque M E, 1977. Isolation of chrysoeriol-7-O-β-D- glucopyranosidyl-(2→1)-D-apiofuranoside. *Indian J. Chem.*, Section B, 15b, 396.

Bucar, F, Ninov, S, Ionkova, I, Kartnig, T, Schubert-Zsilavec, M, Asenov, I and Konuklugil, B, 1998. Flavonoids from *Phlomis nissolii*. *Phytochemistry*, 48(3): 573-575.

Chaturvedi, R, Pant, N, Garg, HS and Bhakuni, DS, 1987. Isoflavonoids of *Crotalaria madurensis*. *J. Nat. Prod.*, 50(2): 266-269.

Kaneko, T, Sakamoto, M, Ohtani, K, Ito, A, Kasai, R, Yamasaki, K, and Padorina, WG, 1995. Secoiridoid and flavonoid glycosides from *Gonocaryum calleryanum*. *Phytochemistry* 39(1): 115-120.

Mabry, TJ, Markham, KR and Thomas, MB, 1970. The Systematic identification of flavonoids. New York, Springer, Verlag.

Mun'im, A, Negishi, O and Ozawa, T, 2003. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (2): 410-414.

Mun'im, A, Isoda, H, Seki, M, Negishi, O, and Ozawa, T, 2003. Estrogenic and acetylcholinesterase-enhancement activity of a new isoflavone, 7,2',4'-trihydroxy isoflavone-4'-O-β-D-glucopyranoside from *Crotalaria sessiliflora*. *Cytotechnology*, 43: 127-134.

Subramanian, SS and Nagarajan, S,
1970. Flavonoids of three *Crotalaria*
species. *Phytochemistry*, 9:
2581-2584.

Wanjala, CCW and Majinda RRT,
1999. Flavonoid glycosides from
Crotalaria podocarpa. *Phytochemis-*
try, 51: 705-707.