

Isolasi dan elusidasi struktur senyawa utama dari sponge *Axynissa aplysinoides*

Isolation and structure elucidation of main compound originated from sponge *Axynissa aplysinoides*

Wahono Sumaryono, Agung Eru Wibowo dan Chaidir

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika – Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Abstrak

Telah dilakukan isolasi senyawa utama dari sponge *Axynissa aplysinoides* yang diperoleh dari perairan laut Lombok. Ekstrak metanol sponge yang telah dikeringkan difraksinasi kedalam fraksi non polar, semipolar dan polar, masing-masing dengan menggunakan heksan, etil asetat dan butanol. Identifikasi dan isolasi senyawa dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Elusidasi struktur isolat dilakukan dengan menggunakan spektrometri massa (SM-EI) dan spektrokopi resonansi magnetik inti proton dan karbon (^1H - dan ^{13}C -RMI). Senyawa utama diidentifikasi sebagai (E)-(4-hidroksistiril trimetilamonium

Kata kunci : Isolasi, elusidasi struktur, *Axynissa aplysinoides*

Abstract

Isolation of the main compound of sponge *Axynissa aplysinoides* collected from Lombok seawater, has been conducted. Methanol extract of dried sponge was fractionated into nonpolar, semipolar and polar fractions using hexane, ethyl acetate and butanol. Identification and final purification of the main compound was done using column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). Structure elucidation of the main compound was performed using mass spectrometry (EIMS), ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopies. The main compound was identified as (E)-(4-hydroxystyryl) trimethylammonium

Key words : isolation, structure elucidation, *Axynissa aplysinoides*

Pendahuluan

Lautan Indonesia adalah bagian dari wilayah Indopasifik, yang merupakan salah satu pusat keanekaragaman biota laut terbesar di dunia. Sumber daya biota laut tersebut merupakan aset potensial yang dapat didayagunakan menjadi aneka produk termasuk diantaranya produk farmasi. Jenis biota laut di daerah tropis Indonesia diperkirakan 2 – 3 kali lebih besar dibandingkan dengan biota laut di daerah subtropis dan daerah beriklim dingin (Van Soest, 1994)

Jumlah dan penyebaran sponge sangat banyak. Sekitar 7000 jenis sponge telah dipublikasi, tetapi berdasarkan perkiraan sekitar 15.000 spesies hidup di perairan laut dan danau.

Di Australia 1.400 spesies telah dipublikasi dalam literatur ilmiah dan diperkirakan sekitar 5000 jenis sponge hidup di wilayah benua tersebut (Hooper, 2000). Plat sahur, suatu wilayah yang terletak di antara bagian tenggara Indonesia dan bagian barat laut Australia merupakan daerah yang paling banyak ditemukan jenis sponge *Demospongiae*. Sekitar 830 jenis binatang sponge hidup tersebar di wilayah laut Indonesia (Hooper, 1993).

Biota laut (*marine organism*) merupakan sumber bahan alam yang sangat kaya dengan aktivitas biologi yang unik. Beberapa diantaranya mempunyai aktivitas antifungi dan antitumor. Disamping itu ada juga yang mempunyai aktivitas sebagai stimulan keke-

balan dan penghambat enzim tertentu. Selama 30 tahun terakhir, lebih dari 7000 senyawa aktif berhasil diisolasi dari biota laut dan digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan obat baru (Edrada, 1998). Senyawa halichondrin B merupakan salah satu contoh senyawa alam dari laut dengan struktur sangat kompleks yang hanya dapat diisolasi dari organisme penghasilnya. Organisme yang dapat dikulturkan dalam jumlah besar, merupakan kondisi yang ideal untuk dilakukan eksplorasi kandungan senyawa kimia, beberapa di antaranya adalah mikroorganisme laut. Kenyataan yang menunjukkan bahwa mikroorganisme laut dapat dikultur, telah terlupakan oleh para peneliti sehingga eksplorasi senyawa aktif melalui kultur mikroorganisme laut belum banyak dilakukan hingga dekade 80-an. Hal ini mendorong upaya-upaya penelitian yang dilakukan selama 10 tahun terakhir difokuskan pada berbagai organisme laut seperti bakteri, fungi dan mikroalga (Hoeller, 1999).

Metodologi

Bahan

Sponge *Axynissa aphysinoides* diperoleh dari perairan Sekotong Lombok Barat. Sampel dideterminasi oleh Prof Van Soest dari Museum Zoologi Amsterdam dan disimpan di museum tersebut.

Cara penelitian

Sampel yang telah dikeringkan (14 g) diekstraksi menggunakan metanol (MeOH). Ekstrak MeOH kemudian difraksinasi cair-cair dengan pelarut heksan, etil asetat dan butanol. Terhadap masing-masing fraksi kemudian dilakukan analisa KCKT (Knauer) dengan kolom fase balik (*reverse phase*) C-18, 125 x 4 mm (Eurosphere, *prepacked*) dengan detektor Photo Dioda Array (UVD 340S Gynkotec) untuk menentukan keberadaan senyawa utama. Fase gerak menggunakan campuran metanol-air dengan sistem gradien (Tabel I) dengan kecepatan alir 1 mL/menit.

Proses isolasi diawali dengan melakukan kromatografi kolom fraksi butanol. Fase diam yang digunakan adalah sephadex LH 20 (Sigma) dengan fase gerak MeOH 100%. Terhadap masing-masing subfraksi hasil kromatografi kolom dilakukan analisa KCKT untuk merunut keberadaan senyawa utama. Fraksi yang mengandung senyawa utama selanjutnya dilakukan KCKT preparative (Hitachi) untuk mengisolasi senyawa utama.

Tabel I. Komposisi fase gerak dalam analisa KCKT

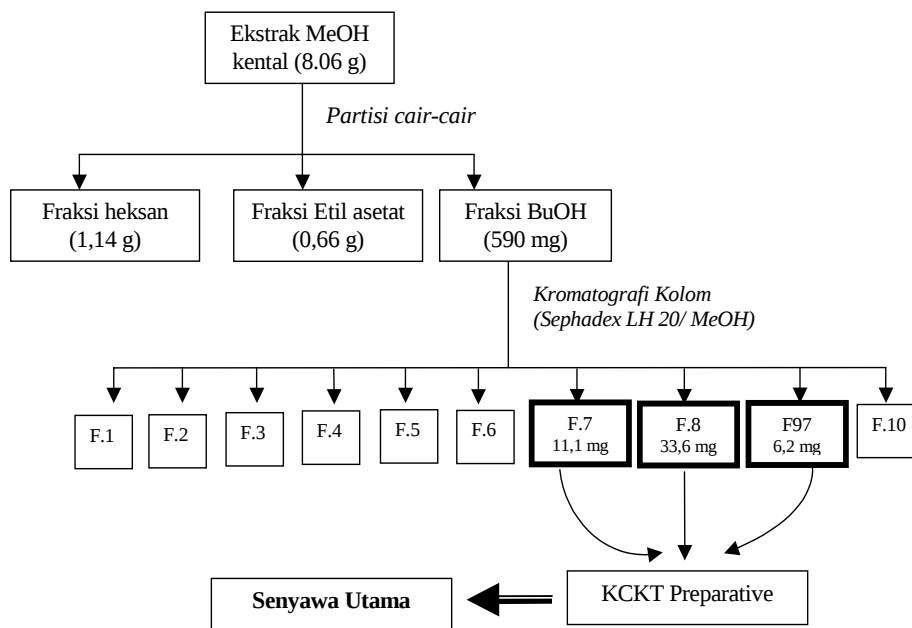
Waktu (menit)	Prosentase Pelarut	
	Metanol	Air
0	0	100
10	0	100
12	5	95
20	5	95
22	10	90
25	10	90
27	30	70
30	30	70
32	60	40
35	60	40
40	100	0
45	100	0

Elusidasi struktur senyawa utama hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan Spektrometer Massa (Finnigan TSQ 7000), ^1H - dan ^{13}C -RMI (Bruker ARX 400, 100 MHz dan 400 MHz).

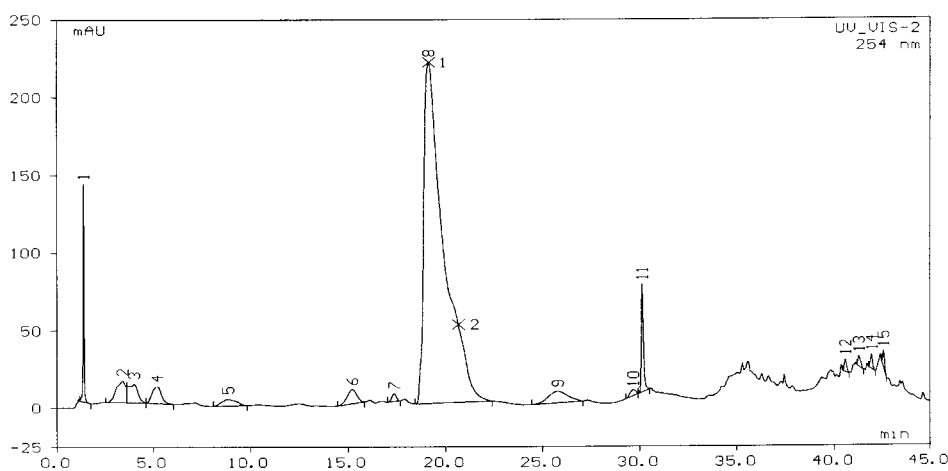
Hasil Dan Pembahasan

Terhadap ekstrak metanol *Axynissa aphysinoides* telah dilakukan serangkaian tahapan isolasi (Gambar 1). Target senyawa yang akan diisolasi adalah senyawa utama dalam ekstrak metanol sponge *Axynissa aphysinoides*, yaitu senyawa yang menunjukkan puncak tertinggi dalam profil kromatogram KCKT dari ekstrak metanol (Gambar 2). Profil kromatogram KCKT tersebut menunjukkan bahwa senyawa utama muncul pada waktu retensi 19,16 menit, dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 202,4 nm.

Selanjutnya, berdasarkan kromatogram KCKT (dengan memperhatikan pola absorpsi pada masing-masing puncak) dari masing-masing fraksi hasil partisi cair-cair ekstrak metanol dapat diketahui bahwa senyawa utama terdapat dalam fraksi butanol. Fraksinasi selanjutnya menggunakan metoda kromatografi kolom dari fraksi butanol menghasilkan 10 sub fraksi (Gambar 1). Dengan analisa KCKT diketahui bahwa senyawa utama terdapat pada sub fraksi 7, 8 dan 9. Hasil isolasi dengan KCKT preparative diperoleh senyawa utama sebanyak 3,7 mg. Adapun kromatogram senyawa tersebut (Gambar 3).



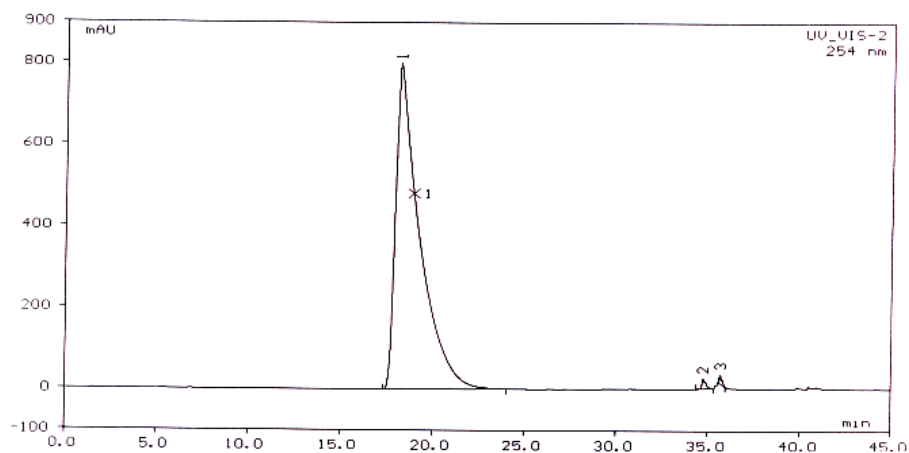
Gambar 1. Skema proses isolasi senyawa utama



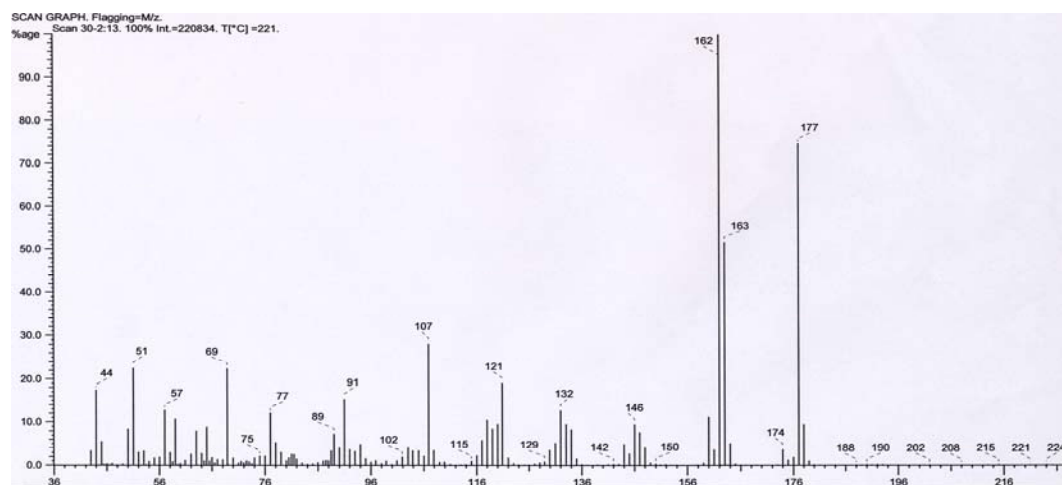
Gambar 2. Kromatogram KCKT ekstrak metanol sponge *Axymissa aphysinoides*

Spektroskopi massa EI senyawa utama menunjukkan molekul ion dengan nilai m/z 177. Berat molekul ganjil ini menunjukkan bahwa senyawa utama tersebut mengandung atom nitrogen dengan jumlah ganjil. Selanjutnya pola fragmentasi menunjukkan nilai m/z 162, 146 dan 132 yang menunjukkan kemungkinan adanya pelepasan gugus metil secara berurutan. (Gambar 4).

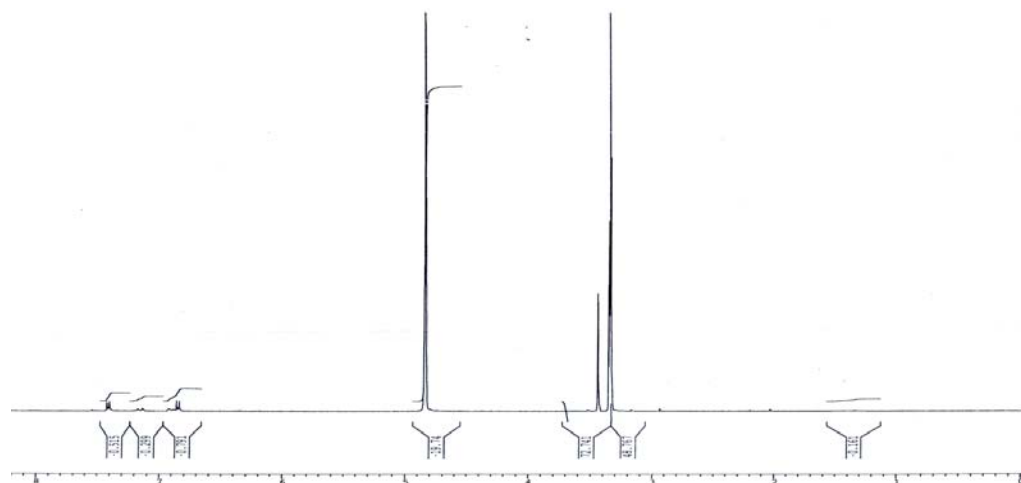
Spektroskopi ^1H -RMI (Tabel II) menunjukkan adanya sepasang puncak duplet di bawah medan pada geseran kimia 7,41 ppm (d, 8,6 Hz) dan 6,86 ppm (d, 8,6 Hz) dengan integrasi masing-masing 2 proton aromatis. Konstanta kopling 8,6 Hz menunjukkan posisi orto satu sama lain, yang berarti terdapat cincin aromatis tersubstitusi para. Selanjutnya terdapat juga sepasang peak duplet dengan geseran kimia



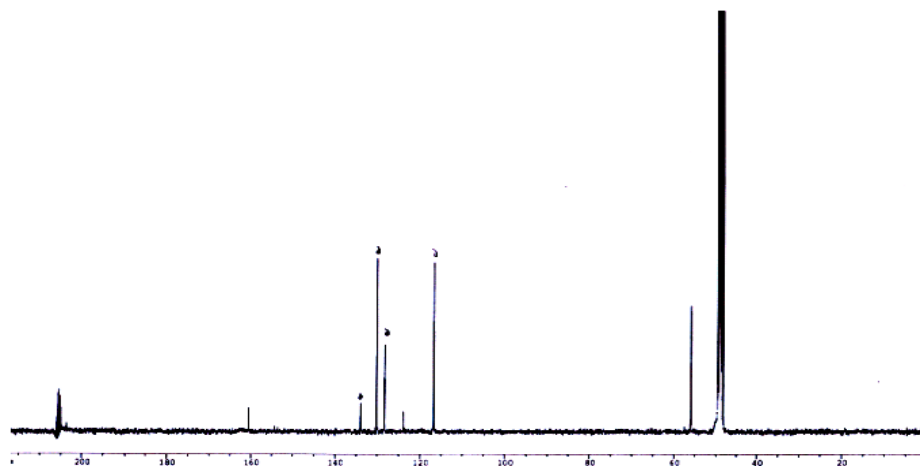
Gambar 3. Kromatogram KCKT isolat senyawa utama



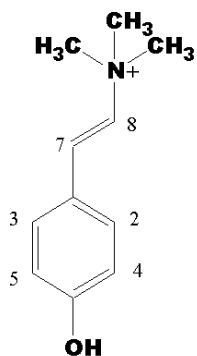
Gambar 4. Spektra Massa senyawa utama hasil isolasi



Gambar 5. Spektrum ^1H -RMI (400 MHz, MeOD) isolat

Gambar 6. Spektrum ^{13}C -RMI (100 MHz, MeOD) isolatTabel II. Data spektrum ^1H - dan ^{13}C -RMI senyawa hasil isolasi

No atom	CHn	ΔH (ppm)	δC (ppm)
1	C		123,9
2	CH	7,41 (d, 8,6 Hz)	128,4
3	CH	7,41 (d, 8,6 Hz)	128,4
4	CH	6,86 (d, 8,6 Hz)	116,9
5	CH	6,86 (d, 8,6 Hz)	116,9
6	C		160,6
7	CH	7,15 (d, 14,1 Hz)	128,4
8	CH	6,91 (d, 14,1 Hz)	134,0
9	CH ₃	3,45 (s)	56,0
10	CH ₃	3,45 (s)	56,0
11	CH ₃	3,45 (s)	56,0

Gambar 7. Struktur senyawa utama sponge *Axyssa aphysinoides* ;(E)-(4-hidroksistiril) trimetilamonium

7,15 ppm (d, 14,1 Hz) dan 6,91 ppm (d, 14,1 Hz) yang menunjukkan adanya proton olifenik. Sedangkan peak singlet pada geseran kimia 3,45 ppm dengan integrasi sekitar 9 proton menunjukkan adanya 3 gugus metil amid.

Spektroskopi ^{13}C -RMI menunjukkan pula karbon metilamid 56,0 ppm, (C9,C10, C11), karbon aromatis tersubstitusi para, 116,9 ppm (C4, C5), 128,4 ppm (C2,C3), 123,9 (C1), 160,6 ppm (C6) dan karbon olifenik pada geseran kimia 128,4 ppm (C7) dan 134,0 ppm (C8). Penetapan nilai geseran kimia dan konstanta kopling masing-masing proton dan karbon dilakukan dengan membandingkan dengan data senyawa yang telah dipublikasi sebelumnya (Reinaldo, 1995).

Berdasarkan data-data tersebut dan mengacu pada beberapa referensi yang ada, maka dapat ditentukan senyawa utama hasil isolasi adalah senyawa dengan berat molekul 177 dengan rumus molekul $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}$ dan diidentifikasi sebagai (E)-(4-hidroksistiril) trimetilamonium. Senyawa tersebut telah diisolasi dari jenis sponge yang sama yaitu *Axyssa aphysinoides* yang dikoleksi dari daerah Palau, Maluku.

Kesimpulan

Telah berhasil diisolasi senyawa utama dari ekstrak metanol sponge *Axyssa aphysinoides* yang berasal dari perairan pulau Lombok yaitu senyawa dengan berat molekul 177 dengan rumus molekul $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}$.

Daftar Pustaka

- Abraham R.J, Fisher J and Loftus P, 1988, Introduction to NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons Chichester- New York-Brisbane-Toronto-Singapore
- Dudley, H.W and Fleming, I, 1995, Spectroscopy methods in organic chemistry, fifth edition, Toronto
- Edrada, R.A, 1998, Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Compound Secondary Metabolites from Philippine Marine Sponges and Soft Coral, Dissertation, Departement of Pharmaceutical Biology, Wuerzburg University, Germany
- Heller, U., 1999, Isolation, Biological Activity and Secondary Metabolite Investigation of Marine-deivaed Fungi and Selected Host Sponges, Dissertation, Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultat der Technischen Universitat Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Germany
- Higa, T., Tanaka, J.I., and Tan, L.T., 1998, Cytotoxic macrocycles from marine sponges dalam Attar-Rahman ang M. Iqbal Coudhary, New Trends in Natural Product Chemistry, Harwood Academic Publisher
- Hooper, J.N.A, 2000, Sponguide : Guide to sponge collection and identification, Queensland Museum, South Brisbane, Autralia, <http://www.qmuseum.qld.au/naturewel-come>
- Reinaldo S.C and D. John Faulkner, 1995, Metabolites of the Palauan Sponge *Axynissa aphysinoides*, Journal of Natural Products, Vol. 58, No. 1, pp 145-148.
- Van Soest, R.W.M, 1994, "Demosponge distribution pattern, In : Van Soest, R.W.M, Van Kompen, T.M.G, Braekman, J.C. (Eds), Sponge in Time and Space", A.A. Balkema, Rotterdam