

ISOLATION OF AN ANTIFEEDANT TRITERPENOID FROM THE SEED OF *Barringtonia asiatica*

Isolasi dan Penentuan Struktur Saponin Antifidan dari Biji *Barringtonia asiatica*

Emma J. Pongoh

Jurusan Kimia, Universitas Negeri Manado, Tondano-Minahasa, Sulawesi Utara 95618, Indonesia

Rymond J. Rumampuk

Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Cisitua-Sangkuriang Gedung 50, Bandung 40135 Indonesia

Ponis Tarigan

Jurusan Kimia, Universitas Padjadjaran, Jalan Singaperbangsa no.2 Bandung 40133, Indonesia

Anthony J. Herlt, Lewis N. Mander

Research School of Chemistry, Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia

ABSTRACT

An antifeedant triterpenoid saponin has been isolated from the seed of *Barringtonia asiatica* and its structure elucidated mainly by two dimensional NMR spectroscopy is identified as 3-O-[[β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronopyranosyloxy]-22-O-[2-(E)-methyl-2-butenyloxy]-15, 16,28-trihydroxy-(3 β ,15 α ,16 α ,22 α)-olean-12-ene. This compound showed antifeedant activity towards *Epilachna* sp larvae

Keywords: *Barringtonia asiatica*, saponin, antifeedant.

PENDAHULUAN

Barringtonia asiatica (L.) Kurz (Lecythidaceae) adalah salah satu tumbuhan mangrove yang tumbuh di daerah tropis Asia dan Pasifik, termasuk Australia bagian utara, dan biji tumbuhan ini digunakan sebagai racun ikan [1,2,3]. Di Indonesia, tumbuhan ini tumbuh di tepi pantai Sulawesi, Maluku, dan Jawa [3]. Tumbuhan ini dilaporkan pertama kali pada tahun 1934 mengandung campuran saponin yang dinamakan barinin-A₁ [4]. Penelitian pendahuluan terhadap senyawa bioaktif dari biji *B. asiatica* menunjukkan bahwa ekstrak metanolnya memiliki aktivitas antifidan [5]. Senyawa bioaktif yang telah diisolasi dari biji *B. asiatica* yang diambil dari daerah Samoa Bagian Barat adalah suatu saponin baru, ranunkosida VII (1) yang mempunyai aktivitas toksik terhadap *Artemia salina* [6].

Pada tulisan sebelumnya dilaporkan bahwa biji *B. asiatica* yang diambil dari daerah Sanger Talud, Sulawesi Utara, Indonesia mengandung tiga saponin triterpen yaitu 3-O-[[β -D-galaktopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukuronopirano-siloksi]-22-O-[2-metilbutiroiloksi]-16,28-dihidroksi-(3 β ,16 α ,22 α)-olean-12-en (2), [1] 3-O-[[β -D-galaktopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-

glukopiranosil (1 \rightarrow 2)]- β -D-glukuronopiranosiloksi]-22-O-[2-(E)-metil-2-buteniloksi]-15,16,28-trihidroksi-(3 β ,15 α ,16 α , 22 α)-olean-12-en (3) [2] dan 3-O-[[β -D-galaktopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukuronopiranosiloksi]-22-O-[2-metilbutiroiloksi]-15,16,28-trihidroksi-(3 β ,15 α , 16 α ,22 α)-olean-12-en (4) [2]. Ketiga saponin dari *B. asiatica* ini dapat dikelompokkan kedalam saponin monodesmosidik dan saponin asam (saponin ester), dan mempunyai aktivitas toksik terhadap *Artemia salina* serta bersifat antifidan terhadap larva *Epilachna* sp [7].

METODE PENELITIAN

Prosedur Umum

Spektrum Inframerah diambil pada instrumen Perkin-Elmer 1800 FTIR spectrophotometer. Rotasi optik diukur pada instrumen Perkin-Elmer 241 polarimeter. Spektrum FABMS diukur dalam matriks 3-nitrobenzyl pada instrumen VG Analytical ZAB-SEQ2 Mass Spectrometer. Spektrum RMI-¹H dan ¹³C diambil pada instrumen Varian INOVA (500 MHz untuk ¹H dan 125 MHz untuk ¹³C). Semua spektrum RMI diukur dalam piridin-d₅ pada 25 °C dan pergeseran kimia diekspresikan dalam δ (ppm). Percobaan 2D menggunakan program standar INOVA.

KCKT fase terbalik semi-preparatif: kolom YMC-Pack ODS-AQ, 5 μ m 120Å 250 μ m dengan diameter 10 dan 20 mm, suhu terprogram 40 °C. Fase gerak adalah A: MeOH/THF/H₂O/HOAc (9/1/90/0.05), B: MeOH/THF/HOAc (90/10/0.05) elusi isokratik 60% B. Kecepatan alir adalah: 10 mL min⁻¹ untuk kolom berdiameter 20 mm (step 1) dan 4 mL min⁻¹ untuk kolom berdiameter 10 mm (step 2). Instrumen HPLC yang digunakan adalah Waters 510 dan 481, injektor Rheodyne 7125; sample loop 4,4 mL; detektor UV/visible λ 210 nm.

KG menggunakan instrumen Varian-3400, detektor FID, kolom BP-1 (100% polydimethylsiloxane) panjang 12 m dan diameter 0.22 mm. Suhu injektor 250 °C dan detektor 320 °C. Suhu diprogram pada 50 °C selama 2 menit kemudian setiap menit dinaikan 10 °C sampai 300 °C dan dibiarkan selama 3 menit sebelum didinginkan. Waktu retensi gula dalam 4 dibandingkan dengan gula standar yang diperlakukan pada kondisi yang sama.

Bahan Tumbuhan.

Biji *Barringtonia asiatica* dikumpulkan pada bulan April tahun 1996 di daerah Sangihe Talaud, Sulawesi Utara. Spesies tumbuhan ini dideterminasi oleh Pak Djuandi di Herbarium Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung.

Ekstraksi dan Isolasi.

Ekstraksi bahan tumbuhan (3.0 kg) telah dijelaskan sebelumnya [1,2,3,5]. Sejumlah 4,35 g saponin kasar dilarutkan dalam metanol dan diinjeksikan pada kolom KCKT fase terbalik skala besar menggunakan kondisi tahap 1 diperoleh lima fraksi LSF1 ($t_R = 46.11$), LSF2 ($t_R = 50.67$), LSF3 ($t_R = 61.65$), LSF4 ($t_R = 65.64$), LSF5 ($t_R = 74.33$). Selanjutnya fraksi LSF1 dan LSF2 digabung dan dimurnikan menggunakan kondisi KCKT tahap 2 diperoleh dua subfraksi SSF1 dan SSF2, dimana subfraksi pertama (SSF1) yang diperoleh berupa padatan amorf putih (4) sebanyak 70 mg.

Senyawa 4:

Padatan amorf putih, 70 mg; $[\alpha]_{25D} +4.60$ (2.63 mg mL⁻¹ CH₃OH); IR (KBr) ν_{maks} 3429, 2947, 1685, 1648, 1521, 1387, 1278, 1157, 1076, 1041 cm⁻¹; RMI (lihat Tabel 1-4); FABMS (lihat teks); teknik negatif FABMS resolusi tinggi m/z 1071.5429 [M - 1]⁻ (hitungan untuk C₅₃H₈₃O₂₂, 1071,5352); analisis elementer: C 55.5%, H 7.7% hitungan untuk C₅₃H₈₄O₂₂ + CH₃COOH + 3H₂O, C 55.6%, H 8.0%.

Hidrolisis asam.

Sejumlah 1 mg senyawa 4 dihidrolisis dalam suasana asam menggunakan prosedur yang

dilakukan oleh Chapman dan Kennedy.¹⁶ Hidrolisat dilarutkan dalam 100 μ l piridin, kemudian ditambahkan 100 μ l BSTFA mengandung 1% TMCS dan dipanaskan pada 95 °C selama 1 jam sebelum dilakukan analisis dengan KG.

Uji Aktivitas Antifidan.

Uji aktivitas antifidan menggunakan prosedur pada tulisan sebelumnya,² ringkasnya adalah: senyawa 4 dilarutkan dalam metanol untuk mendapatkan konsentrasi 1000, 500, 100 dan 50 μ g mL⁻¹ yang selanjutnya digunakan sebagai larutan uji. Media uji berupa daun *Solanum nigrum* berumur satu bulan yang dipetik pada hari percobaan. Larutan uji dioleskan pada paroh kiri bagian belakang daun, dan metanol (larutan kontrol) dioleskan pada paroh kanan kemudian dikeringkan dengan bantuan blower. Daun yang sudah terolesi dengan larutan uji dan larutan kontrol dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah diberi lapisan kain kasa dan tisu basah untuk menjaga kelembaban. Daun ditutup dengan cawan petri yang lebih kecil yang telah diberi lubang di tengah dengan diameter 3,5 cm. Kemudian masukkan pada paroh kiri (paroh daun yang terolesi larutan uji) dua ekor serangga uji berupa larva *Epilachna* sp. instar 3-4 yang telah dipuasakan selama 2 jam. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai jam ke-4, 6, 8, 12, dan 24 dengan mengukur luas daun yang telah dikonsumsi oleh serangga uji melalui pembagian daun kedalam 32 sektor. Aktivitas antifidan dihitung berdasarkan rumus $[(C - T)/(C + T)] \times 100$, dimana C adalah jumlah bagian kontrol yang dikonsumsi dan T adalah jumlah bagian perlakuan yang dikonsumsi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak saponin kasar (4,35 g) yang menunjukkan aktivitas antifidan terhadap larva *Epilachna* sp [5] dipisahkan dan dimurnikan melalui beberapa tahap kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik preparatif (lihat seksi eksperimen) diperoleh senyawa 4 berupa padatan amorf putih sebanyak 70 mg. Hasil uji aktivitas antifidan (Tabel 1) menunjukkan bahwa senyawa 4 memberikan aktivitas 100 % pada konsentrasi 1000 μ g mL⁻¹. Dari hasil uji aktivitas antifidan tersebut, dapat dikatakan bahwa senyawa 4 mempunyai potensi sebagai senyawa pestisida alam yang ramah lingkungan, karena saponin sangat mudah larut dalam air.

Tabel 1 Aktivitas antifidan senyawa **4** terhadap larva *Epilachna* sp.

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Aktivitas (%) |
|----------------------------------|---------------|
| 1000 | 100.00 |
| 500 | 63.35 |
| 100 | 39.09 |
| 50 | 10.00 |

Tabel 2 Pergeseran kimia proton dan karbon dari spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C bagian aglikon dan asam pada **4** (piridin- d_5).

| Posisi H dan C | δ C (ppm) | DEPT | δ H (ppm) multiplisitas, J (Hz) |
|------------------|------------------|-----------------|--|
| Aglikon | | | |
| 1 | 39,6 | CH ₂ | 0,84 <i>dm</i> , 12,0 1,38 <i>dm</i> , 12,0 |
| 2 | 26,7 | CH ₂ | 1,80 <i>dm</i> , 11,5 2,10 <i>dm</i> , 11,5 |
| 3 | 89,3 | CH | 3,28 <i>dd</i> , 4,0; 11,0 |
| 4 | 38,9 | C | - |
| 5 | 55,4 | CH | 0,79 <i>m</i> |
| 6 | 18,8 | CH ₂ | 1,36 <i>m</i> , 1,58 <i>m</i> |
| 7 | 36,7 | CH ₂ | 2,06 <i>m</i> , 2,17 <i>m</i> |
| 8 | 41,7 | C | - |
| 9 | 47,1 | CH | 2,52 <i>m</i> |
| 10 | 36,7 | C | - |
| 11 | 24,0 | CH ₂ | 1,75 <i>dm</i> , 11,0; 1,87 <i>dm</i> , 11,0 |
| 12 | 124,8 | CH | 5,45 <i>br</i> , <i>s</i> |
| 13 | 144,5 | C | - |
| 14 | 47,8 | C | - |
| 15 | 67,6 | CH | 4,24 <i>m</i> |
| 16 | 74,7 | CH | 4,56 <i>m</i> |
| 17 | 45,5 | C | - |
| 18 | 41,6 | CH | 3,02 <i>dd</i> , 3,5; 14,0 |
| 19 | 47,0 | CH ₂ | 1,32 <i>m</i> ; 2,87 <i>t</i> , 13,5 |
| 20 | 32,0 | C | - |
| 21 | 41,5 | CH ₂ | 1,94 <i>m</i> ; 2,80 <i>t</i> , 12,0 |
| 22 | 71,9 | CH | 6,15 <i>dd</i> , 5,5; 12,0 |
| 23 | 27,9 | CH ₃ | 1,22 <i>s</i> |
| 24 | 16,8 | CH ₃ | 1,09 <i>s</i> |
| 25 | 15,8 | CH ₃ | 0,81 <i>s</i> |
| 26 | 17,6 | CH ₃ | 1,01 <i>s</i> |
| 27 | 21,4 | CH ₃ | 1,87 <i>s</i> |
| 28 | 62,9 | CH ₂ | 3,59 <i>d</i> , 10,5; 3,75 <i>d</i> , 10,5 |
| 29 | 33,6 | CH ₃ | 1,05 <i>s</i> |
| 30 | 25,3 | CH ₃ | 1,27 <i>s</i> |
| Asam | | | |
| 1 ^{'''} | 167,9 | C | - |
| 2 ^{'''} | 136,4 | C | - |
| 3 ^{'''} | 129,8 | CH | 6,82 <i>qq</i> , 1,0; 7,0 |
| 4 ^{'''} | 14,1 | CH ₃ | 1,42 <i>d</i> , 7,0 |
| 5 ^{'''} | 12,3 | CH ₃ | 1,75 <i>d</i> , 1,0 |

Namun pengembangan senyawa **4** untuk pestisida alami perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melibatkan para peneliti multi-disiplin, dan mungkin dapat dipelajari modifikasi struktur **4** untuk mendapatkan aktivitas antifidan yang lebih tinggi, atau dengan kata lain senyawa **4** dapat dijadikan senyawa pandu (*lead compound*) untuk saponin antifidan. Disamping itu, penelitian pestisida alam dapat dikembangkan pada ekstrak kasar saponin *B. asiatica* karena ekstrak tersebut menunjukkan juga aktivitas antifidan [5].

Elusidasi struktur senyawa **4** dilakukan dengan menganalisis data spektroskopi. Spektrum massa FAB dengan teknik ionisasi positif dan negatif menunjukkan ion-ion pada m/z 1095,7 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ dan 1071,6 $[\text{M}-\text{H}]^-$, dan pengukuran dengan FAB resolusi tinggi menggunakan teknik ionisasi negatif menunjukkan ion m/z 1071,5429 $(\text{M}-\text{H})^-$ yang setara dengan perhitungan untuk formula molekul $\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{O}_{22}$ (1071,5352). Analisis elementer untuk **4** memberikan 55,5% C dan 7,7% H yang setara dengan perhitungan untuk $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{22} + \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2\text{O}$ (55,6% C dan 8,0% H).

Tabel 3 Korelasi RMI yang teramati pada bagian aglikon dan asam dalam **4**.

| Proton | ^1H - ^1H DQCOSY | ^1H - ^{13}C HMQC-TOCSY* | ^1H - ^{13}C HMQC | ^1H - ^{13}C HMBC |
|------------------|---|--|-------------------------------------|---|
| Aglikon | | | | |
| 1 | H-2 | C-1 , H-3 | C-1 | C-2, C-10, C-25 |
| 2 | H-1, H-3 | C-2 , H-3 | C-2 | C-3, C-10 |
| 3 | H-2, OH-3 | C-3 , H-1, H-2 | C-3 | C-1, C-2, C-4, C-23, C-24 |
| 4 | | | | |
| 5 | H-6 | C-5 , H-6, H-25 | C-5 | C-1, C-3, C-4, C-7, C-8, C-10, C-23, C-25 |
| 6 | H-5, H-7 | C-6 | C-6 | C-7 |
| 7 | H-6 | C-7 , H-6, H-25 | C-7 | C-6, C-26, C-27 |
| 8 | | | | |
| 9 | H-11 | C-9 | C-9 | C-25, C-26, C-11 |
| 10 | | | | |
| 11 | H-9, H-12 | C-11 | C-11 | C-12, C-9, C-13 |
| 12 | H-11 | C-12 , H-19 | C-12 | C-9, C-11, C-14, C-18, C-19 |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | H-16 | C-15 , H-16 | C-15 | C-8, C-14, C-16, C-18, C-27 |
| 16 | H-15, OH-16 | C-16 , H-15 | C-16 | C-15, C-17, C-18, C-19, C-21, C-28 |
| 17 | | | | |
| 18 | H-19 | C-18 | C-18 | C-12, C-13, C-14, C-16, C-17, C-28 |
| 19 | H-18 | C-19 | C-19 | C-13, C-17, C-18, C-20, C-29, C-30 |
| 20 | | | | |
| 21 | H-22 | C-21 , H-22, H-30 | C-21 | C-17, C-20, C-22, C-29, C-30 |
| 22 | H-21, OH-22 | C-22 , H-21 | C-22 | C-16, C-17, C-18, C-21, C-28 |
| 23 | | C-23 | C-23 | C-24, C-3, C-4, C-5 |
| 24 | | C-24 | C-24 | C-23, C-3, C-4, C-5 |
| 25 | | C-25 , H-27 | C-25 | C-9, C-10, C-5 |
| 26 | | C-26 | C-26 | C-7, C-8, C-9, C-14, C-5 |
| 27 | | C-27 | C-27 | C-8, C-13, C-14, C-15 |
| 28 | OH-28 | C-28 | C-28 | C-16, C-17, C-18 |
| 29 | | C-29 | C-29 | C-19, C-20, C-21 |
| 30 | | C-30 | C-30 | C-19, C-20, C-21 |
| Asam | | | | |
| 1 ^{'''} | | | | |
| 2 ^{'''} | | | | |
| 3 ^{'''} | H-4 ^{'''} , H-5 ^{'''} | C-3^{'''} , H-4 ^{'''} , H-5 ^{'''} | C-3 ^{'''} | C-1 ^{'''} , C-2 ^{'''} , C-4 ^{'''} , C-5 ^{'''} |
| 4 ^{'''} | H-3 ^{'''} , H-5 ^{'''} | C-4^{'''} , H-3 ^{'''} , H-5 ^{'''} | C-4 ^{'''} | C-1, C-2, C-3 |
| 5 ^{'''} | H-3 ^{'''} , H-4 ^{'''} | C-5^{'''} , H-3 ^{'''} , H-4 ^{'''} | C-5 ^{'''} | C-1, C-2, C-3 |

* Korelasi satu ikatan dicetak **tebal**.

Berdasarkan spektrum massa FAB, analisis elementer, dan spektrum DEPT RMI- ^{13}C dapat ditetapkan formula molekul **4** adalah $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{22}$ (BM 1072).

Spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C bagian aglikon dari **4** yang ditabulasikan dalam Tabel 2 menunjukkan adanya sinyal-sinyal sebagai berikut : tujuh gugus metil pada pergeseran kimia (δ) proton dalam ppm 0,81 (s), 1,01 (s), 1,05 (s), 1,09

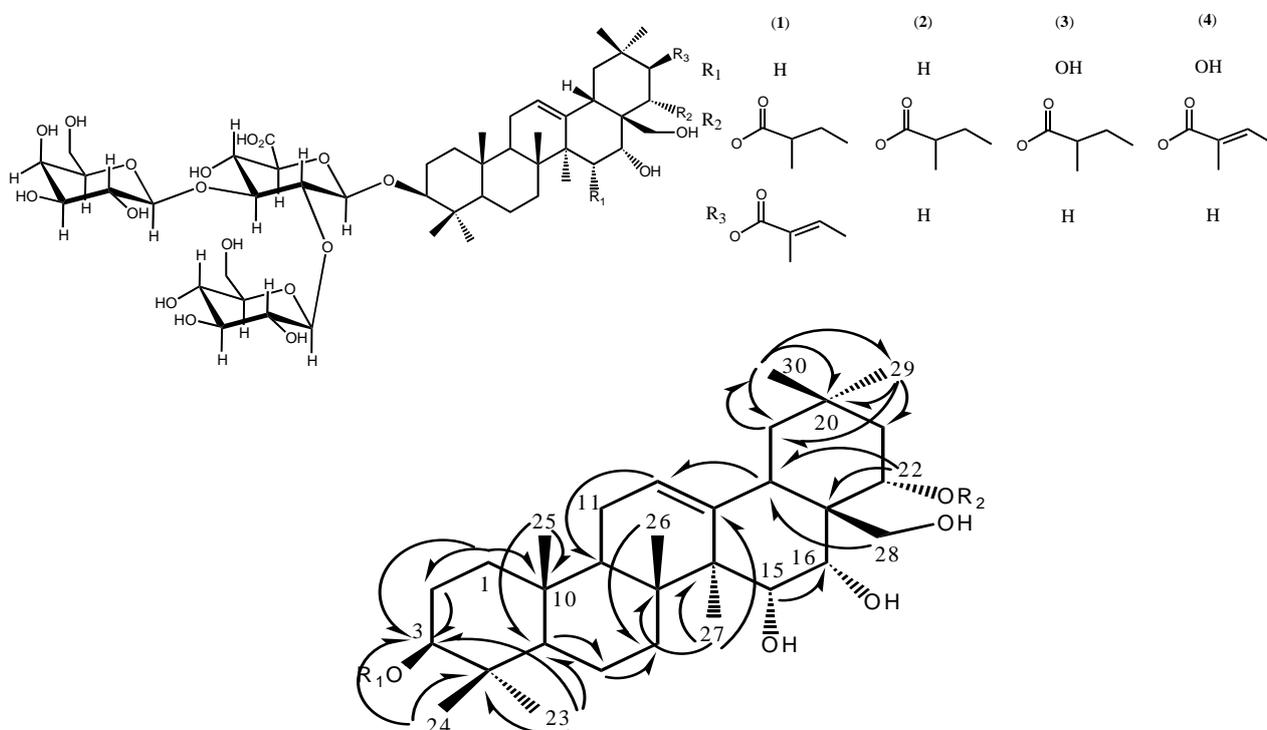
(s), 1,22 (s), 1,27 (s), 1,87 (s) dan pergeseran kimia (δ) karbon 15,8 (CH_3), 16,8 (CH_3), 17,6 (CH_3), 21,4 (CH_3), 25,3 (CH_3), 27,9 (CH_3), 33,6 (CH_3); satu proton olefinik pada δ 5,45 (*br*, *s*) dan sepasang karbon olefinik pada δ 124,8 (CH) dan 144,5 (C); dua proton metilen pada δ 3,59 (*d*, 10,5) dan 3,75 (*d*, 10,5) yang terikat pada satu karbon yang terhidroksilasi (karbon hidroksimetilen) pada δ 62,9

(CH₂). Sinyal-sinyal tersebut mengindikasikan bahwa aglikon pada **4** adalah golongan triterpen olean-12-en dengan satu karbon hidroksimetilen (28-CH₂OH). Penetapan struktur triterpen tersebut didasarkan juga pada korelasi jarak jauh proton dan karbon yang teramati dalam spektrum HMBC (Gambar 1).

Dalam triterpen olean, geometri cincin A/B, B/C, C/D adalah *trans* sedangkan geometri cincin D/E bisa *trans* atau *sis* [8]. Geometri cincin D/E ditentukan oleh kedudukan ruang antara H-28 dan H-18 [3]. Apabila H-28 dan H-18 terletak dalam satu bidang (konfigurasi 17 β -18 β), maka geometri cincin D/E adalah *sis*. Demikian sebaliknya untuk geometri cincin D/E *trans* disebabkan oleh konfigurasi 17 β -18 α atau H-28 dan H-18 tidak sebidang. Untuk menetapkan geometri cincin D/E pada aglikon **4** dilakukan melalui pengamatan harga pergeseran kimia C-12 dan H-18. Berdasarkan pergeseran medan rendah (paramagnetik, ~5ppm) C-12 pada aglikon **4** mengindikasikan tidak ada efek sterik dari C-19 (geometri cincin D/E *sis*).

Disamping itu, adanya pergeseran paramagnetik ~ 2 ppm dari atom H-18 menunjukkan tidak ada efek γ -*gaus* dengan H-27. Hal ini menunjukkan konfigurasi 18 β -H. Dengan demikian dapat ditetapkan bahwa H-18 dan H₂-28 berkedudukan sebidang, sehingga geometri cincin D/E adalah *sis* dan geometri cincin A/B, B/C, C/D *trans* seperti yang umum ditemukan pada kelompok triterpen olean.

Sinyal proton sistem AB terisolasi pada δ 3,59 dan 3,75 dengan multiplisitas masing-masing *doublet* ($J = 10,5$ Hz) mengindikasikan dua proton hidroksimetilen dari H-28. Kedua proton tersebut berkorelasi langsung (satu ikatan) dengan karbon pada δ 62,9 ppm (C-28). Adanya sinyal lebar pada δ 4,24 (*m*) dan 4,56 (*m*), yang saling berkorelasi dalam spektrum DQCOSY dan HMQC-TOCSY (Tabel 3) mengindikasikan proton-proton yang terletak pada C-15 dan C-16. Multiplisitas sinyal H-15 dan H-16 adalah multiplet karena sinyal kedua proton tersebut tumpang tindih dengan sinyal dari proton-proton gula. Hal ini menyebabkan penentuan konfigurasi α atau β dari substituen OH pada C-15 dan C-16 tidak bisa dilakukan melalui perhitungan tetapan gandingan. Masalah ini dapat dipecahkan melalui pengamatan terhadap pergeseran kimia H-26, H-27, C-15, dan C-16.



Gambar 1. Korelasi HMBC bagian aglikon pada **4**.

Dalam Tabel 1 ditunjukkan bahwa H-27 mengalami pergeseran paramagnetik pada δ 1,87 ppm mengindikasikan adanya interaksi 1,3 aksial antara 16α -OH dengan H-27,² hal ini didukung juga dengan adanya pergeseran paramagnetik [karakteristik untuk α (aksial)-OH] dari C-16 pada δ 74,7 ppm [9]. Dengan demikian dapat ditetapkan bahwa konfigurasi substituen OH pada C-16 adalah 16α -OH (α -aksial). Pengamatan yang sama dilakukan pada pergeseran kimia H-26 untuk menentukan konfigurasi substituen OH pada C-15. Pergeseran diamagnetik dari H-26 pada δ 1,01 ppm menunjukkan tidak terjadi interaksi 1,3-aksial dengan OH-15. Hal ini didukung juga dengan adanya pergeseran diamagnetik C-15 pada δ 67,6 ppm. Sehingga dapat ditetapkan konfigurasi 15α -OH (α -ekuatorial). Disamping itu sampai saat ini belum ada publikasi untuk konfigurasi 15β -OH yang ditemukan pada kelompok triterpen. Pergeseran paramagnetik \sim 50 ppm dari C-15, C-16, dan C-28 mengindikasikan juga bahwa ketiga karbon tersebut terhidroksilasi. Dari spektrum RMI-¹H ditunjukkan juga adanya sebuah sinyal sistem AMX dari proton awaperisai (*deshielded*) dengan multiplisitas *doublet-doublet* pada δ 6,15 ($J = 12,0$ dan 5,5 Hz) yang disebabkan oleh gandengan proton-proton metilen pada δ 2,07 (*br*) dan 2,79 (*t*, $J = 12,0$ Hz), mengindikasikan proton yang terikat pada C-22. Keawaperisainya H-22 menunjukkan bahwa posisi tersebut teresterifikasi. Berdasarkan harga tetapan gandengan H-22 ($J = 12,0$ dan 5,5 Hz) dapat ditetapkan bahwa substituen ester pada C-22 berkonfigurasi α -ekuatorial.

Berdasarkan uraian tadi dan dengan perbandingan data literatur [10] maka bagian triterpen pada **4** ditetapkan sebagai barigenol-A₁ yang teresterifikasi pada C-22. Posisi proton dan karbon dalam aglikon barigenol didukung juga dengan analisis korelasi HMBC yang diilustrasikan pada Gambar 1. Untuk ester yang terikat pada C-22 diindikasikan dengan adanya sinyal-sinyal dari dua gugus metil vinilik pada δ 1,42 (*d*, $J = 7,0$ Hz) dan 1,76 (*d*, $J = 1,0$ Hz) yang dalam spektrum DQCOSY berkorelasi dengan satu sinyal sistem AM₃X₃ dari metin etilenik pada δ 6,82 (*qq*, $J = 7,0$ dan 1,0 Hz). Disamping sinyal-sinyal tersebut, pada spektrum RMI-¹³C terdapat sinyal-sinyal dari sepaang karbon olefinik pada δ 129,8 dan 136,4 serta satu karbonil pada δ 167,9. Informasi-informasi ini mengindikasikan adanya sebuah residu asam tiglat (*tiglic acid*). Kesimpulan ini merupakan juga hasil konfirmasi dengan data literatur pergeseran kimia proton dan karbon untuk gugus-gugus tigloil dan angeloil [10].

Posisi teresterifikasi pada C-22 oleh residu asam tiglat dikonfirmasi melalui pengamatan rekaman spektrum HMBC yang diilustrasikan dalam Gambar 2. Spektrum HMBC menunjukkan adanya korelasi antara H-22 pada δ 6,15 (*dd*, 12,0; 5,5 Hz) dengan sebuah atom karbonil pada δ 167,9 (*s*) dari C-1''' residu asam tiglat. Hal ini mengindikasikan bahwa residu asam tiglat tersebut terletak pada C-22 pada bagian triterpen **4**. Dengan demikian dapat ditetapkan bahwa bagian triterpen pada **4** termasuk residu asamnya adalah 22-O-tigloil-barigenol-A₁.

Pergeseran glikosilasi teramati pada C-3 dari aglikon yaitu dengan munculnya sinyal pada δ 89,4 yang menggambarkan pergeseran paramagnetik \sim 10 ppm, mengindikasikan bahwa rantai gula terletak pada posisi tersebut. Dugaan ini didukung oleh adanya sebuah sinyal sistem AMX dari proton metin H-3 pada δ 3,27 (*dd*, 11,0; 4,0 Hz) yang berkorelasi dengan dua proton dari H-2 pada δ 1,80 (*m*) dan 2,10 (*m*) dalam spektrum DQCOSY. Berdasarkan harga tetapan gandengan H-3 dapat ditetapkan bahwa konfigurasi O-glikosidik pada C-3 adalah β (ekuatorial). Posisi bagian gula pada aglikon ditentukan juga melalui rekaman spektrum HMBC (Gambar 2). Identifikasi residu gula dan korelasi-korelasinya ternyata lebih menantang dan sulit. Hal ini disebabkan oleh tumpang tindihnya sinyal-sinyal pada RMI [2], bahkan pada RMI medan kuat. [12]. Langkah pertama untuk mengidentifikasi residu gula, dapat dilakukan dari proton dan karbon anomerik [3, 13]. Daerah anomerik spektrum RMI-¹H dan RMI-¹³C pada **4** (Tabel 4) menunjukkan tiga sinyal *doublet* dari proton anomerik pada δ 4,94 (*d*, $J = 7,5$ Hz); 5,30 (*d*, $J = 7,5$ Hz); dan 5,66 (*d*, $J = 7,0$ Hz), dua sinyal karbon anomerik pada δ 104,0 dan 105,3. Dalam spektrum HMQC ditunjukkan bahwa proton anomerik pada δ 4,94 berkorelasi dengan atom karbon pada δ 104,0 dan dua proton anomerik pada δ 5,30 dan 5,66 berkorelasi dengan atom karbon pada δ 105,3. Hal ini mengindikasikan bahwa gula yang ada pada **4** berjumlah tiga satuan monosakarida. Sebuah sinyal atom karbonil pada δ 172,0 dan dua sinyal hidroksimetil pada δ 61,9 dan 63,4 dalam spektrum RMI-¹³C menunjukkan adanya sebuah residu gula asam dan dua satuan gula heksosa.

Permasalahan umum dalam elusidasi struktur saponin adalah penentuan korelasi antara resonansi proton-proton dan karbon yang berada pada gula yang sama, karena adanya sinyal-sinyal yang tumpang tindih pada δ 3,5-5 ppm dalam spektrum RMI-¹H [3, 13]. Penetapan sistem spin dari setiap residu gula pada **4** ditentukan dari rekaman spektrum HMQC-TOCSY [3, 13].

Tabel 4 Tabulasi pergeseran kimia (δ , ppm) proton dan karbon dari spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C satuan-satuan gula pada 4.

| Posisi H dan C | Glc (glukosa) | | Gal (galaktosa) | | Glc-A(asam glukuronat) | |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| | δC | δH | δC | δH | δC | δH |
| 1 | 104,0 | 5,65 | 105,0 | 5,30 | 105,0 | 4,94 |
| 2 | 76,4 | 4,07 | 72,9 | 4,49 | 79,0 | 4,44 |
| 3 | 78,6 | 4,23 | 75,4 | 4,13 | 87,8 | 4,36 |
| 4 | 72,5 | 4,14 | 70,2 | 4,46 | 71,9 | 4,52 |
| 5 | 77,9 | 3,824,54 | 77,3 | 4,15 | 77,4 | 4,54 |
| 6 | 63,4 | 4,32 4,46 | 61,9 | 4,33 4,44 | - | - |

Harga δC Glc-A yang dicetak miring menunjukkan karbon yang tersubstitusi oleh residu gula yang lain.

Tabel 5 Tabulasi korelasi berantai bagian gula pada 4.

| Residu-A (glukosa) | | Residu-B (galaktosa) | | Residu-C (asam glukuronat) | |
|--------------------|-------------------|----------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| No. C | No. H | No. C | No. H | No. C | No. H |
| C1 | H1,H2,H3,H4,H5 | C1 | H1,H2,H3,H4 | C1 | H1,H2,H3,H4,H5 |
| C2 | H1,H2,H3,H4,H5 | C2 | H1,H2,H3 | C2 | H1,H2,H3,H4,H5 |
| C3 | H1,H2,H3,H4,H5,H6 | C3 | H1,H2,H3,H4 | C3 | H1,H2,H3,H4,H5 |
| C4 | H1,H2,H3,H4,H5,H6 | C4 | H1,H2,H3,H4,H5 | C4 | H1,H2,H3,H4,H5 |
| C5 | H1,H2,H3,H4,H5,H6 | C5 | H4,H5,H6 | C5 | H1,H2,H3,H4,H5 |
| C6 | H3,H4,H5,H6 | C6 | H5,H6 | C6 | - |

Proton yang dicetak tebal menunjukkan korelasi satu ikatan dengan karbon

Bagian HMQC bertujuan untuk menentukan korelasi langsung (satu ikatan) antara proton dan karbon [14], dan bagian TOCSY digunakan untuk menentukan korelasi berantai (*relayed correlation*) antara proton dengan proton yang berjarak lebih dari tiga ikatan dalam setiap residu gula [16]. Rincian dari aplikasi percobaan ini untuk tiga satuan monosakarida (residu-A, B, C) yang ada pada 4 dijelaskan di bawah ini. Korelasi berantai yang teramati melalui teknik HMQC-TOCSY ditabulasikan dalam Tabel 5. Hidrolisis asam [16] terhadap 4 diikuti dengan per-trimetilsililasi kemudian dianalisis dengan kromatografi gas dilakukan untuk mengkonfirmasi bagian gula.

Residu-A

Proton dan karbon anomerik dari residu-A menunjukkan empat puncak silang dalam spektrum HMQC-TOCSY. Subspektrum yang lengkap dapat digambarkan dari proton-proton metin AH-3", AH-4", dan AH-5" (A singkatan dari residu-A, H-3", H-4", dan H-5" masing-masing adalah proton metin pada posisi 3", 4", dan 5"). Korelasi antara proton-proton AH-6" dan AH-5", kemudian AH-5" dengan AH-1", mengindikasikan adanya tetapan gandengan visinal yang besar dari proton-proton di dalam cincin yang berorientasi *trans* diaksial dari gula heksosa,¹² sehingga dapat ditetapkan bahwa residu-A berkonfigurasi "gluko". Disamping itu, harga tetapan gandengan proton anomeriknya ($^3J_{\text{H-1,H-2}}$) sebesar 7,0 Hz, mengindikasikan sebuah

konfigurasi β -anomerik. Dengan demikian, residu-A dapat ditetapkan sebagai β -glukopiranosida.

Residu-B

Dalam spektrum HMQC-TOCSY, proton dan karbon anomerik dari residu-B (BH-1") hanya menunjukkan tiga puncak silang, sehingga diperkirakan adanya harga tetapan gandengan visinal yang kecil antara proton BH-4" dan BH-5" ($^3J_{\text{H-4,H-5}}$) dari gula heksosa yang berkonfigurasi "galakto".¹² Analisis lebih lanjut pada spektrum HMQC-TOCSY untuk residu ini menunjukkan suatu korelasi dengan satu karbon metilenik pada pergeseran medan kuat (diamagnetik) pada posisi 6. Harga tetapan gandengan proton anomerik ($^3J_{\text{H-1,H-2}}$) sebesar 7,5 Hz, mengindikasikan konfigurasi β -anomerik. Dengan demikian residu-1B ditetapkan sebagai β -galaktopiranosida.

Residu-C

Seperti pada residu-A, puncak-puncak silang dalam spektrum HMQC-TOCSY residu-C melalui proton dan karbon anomeriknya menunjukkan empat puncak silang. Hal ini mengindikasikan adanya tetapan gandengan visinal yang besar antara proton-proton cincin yang berorientasi *trans* diaksial. Dengan demikian residu-1C diperkirakan mempunyai konfigurasi "gluko". Sebagai tambahan, analisis spektrum HMBC menunjukkan korelasi antara dua proton pada δ 4,52 dan 4,54 (CH-4', CH-5') dengan sebuah atom karboksil pada δ 172,0,

mendukung penetapan asam β -glukuronopiranosidik. Konfigurasi β dideduksi dari harga tetapan gandengan proton anomernya ($^3J_{H-1,H-2}$) yaitu 7,5 Hz.

Tahap akhir dalam elusidasi struktur saponin adalah penentuan ikatan-ikatan antar satuan gula dan atau gula dengan aglikon. Secara teori, informasi ini dapat diamati melalui korelasi antara proton anomeric dengan karbon dari monosakarida yang bersebelahan atau karbon dari aglikon.^{3,13} Oleh karena itu, dalam penelitian ini telah dilakukan percobaan HMBC yang merupakan metode yang sangat sensitif untuk menentukan ikatan interglukosidik karena HMBC adalah teknik yang dapat mendeteksi korelasi heteroatom (1H dan ^{13}C) dengan jarak ikatan lebih dari satu. Korelasi interglukosidik jarak jauh yang terjadi antara proton anomeric suatu residu gula dengan karbon dari residu gula yang lain atau karbon dari aglikon yang teramati dalam spektrum HMBC ditunjukkan pada Gambar 2. Korelasi interresidu gula dapat dengan mudah diidentifikasi karena resonansi dari 1H dan ^{13}C masing-masing residu gula telah ditetapkan dengan jelas terlebih dahulu.

Spektrum HMBC menunjukkan bahwa proton anomeric dari residu-A (AH-1'') pada δ 5,65 berkorelasi dengan C-2' (δ 79,0 ppm) dari residu-C, dan proton anomeric dari residu-B (BH-1''') pada δ 5,30 berkorelasi dengan C-3' (δ 87,8 ppm) dari residu-C. Hal ini mengindikasikan sebuah rantai karbohidrat trisakarida bercabang (mempunyai dua satuan gula terminal). Selanjutnya bagian trisakarida A, B, C tersebut terikat pada atom C-3 dari aglikon. Hal ini diindikasikan oleh sebuah

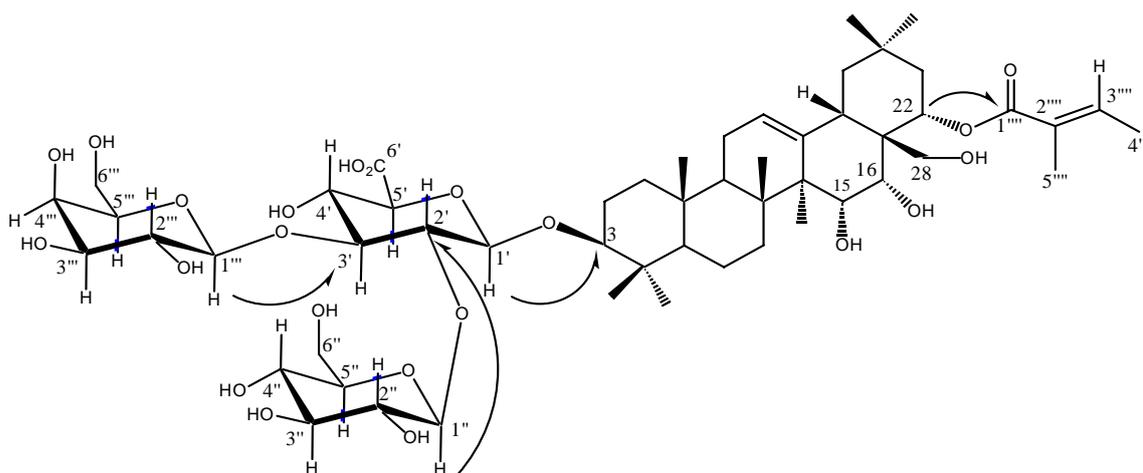
puncak silang yang terbentuk dari korelasi antara proton anomeric (CH-1') dari residu-C pada δ 4,94 dengan C-3 (δ 89,4 ppm) dari aglikon barigenol-A₁.

KESIMPULAN

Berdasarkan penjelasan-penjelasan tadi, maka struktur **4** dapat ditetapkan sebagai 3-O-[[β -D-galaktopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranosil (1 \rightarrow 2)]- β -D-glukuronopiranosiloksi]-22-O-[2(*E*)-metil-2-buteniloksi]-15,16,28-trihidroksi-(3 β ,15 α ,16 α ,22 α)-olean-12-en.

Daftar Pustaka

1. Rumampuk, R.J., Tarigan, P., Herlt, A.J., and Mander, L.N., 2001, *Proceedings of the International Seminar on Natural Products Chemistry and Utilization of Natural Resources*, Universitas Indonesia-UNESCO, June 5-7, pp 208-214.
2. Herlt, A.J., Mander, L.N., Pongoh, E.J., Rumampuk, R.J., and Tarigan, P., 2002, *J. Nat. Prod.*, 62, 115-120.
3. Rumampuk, R.J. 2001, Elusidasi Struktur Saponin dari Biji *Barringtonia Asiatica* (L.) Kurz. *Disertasi*, Universitas Padjadjaran, Bandung, September 2001.
4. Nozoe, T. 1993, *J. Chem. Soc. Japan*, 55, 1106-1114
5. Pongoh, E.J., 1997, Isolasi dan identifikasi senyawa saponin antimakan dari biji *Barringtonia asiatica* L. Kurz dengan bioindikator Larva *Epilachna sparsa*, *Thesis Magister*, Universitas Padjadjaran, Bandung.



Gambar 2 Korelasi HMBC untuk penentuan posisi rantai gula dan bagian asam dalam **4**

6. Burton, R., 1998, Isolation and structure elucidation of biologically active natural products from *Barringtonia asiatica* and *Caesalpinia brasiliensis*. *Master's Thesis*, Brigham Young University, Utah, USA.
7. Pongoh, E.J., Rumampuk, R.J., Tarigan, P., Herlt, A.J., and Mander, L.N., 2003, Presentasi pada Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XIII. Universitas Padjadjaran, Bandung, 18-19 Februari.
8. Hostettmann, K., and Marston, A., 1995, *Chemistry and Pharmacology of Natural Products Series: Saponins*, Cambridge University Press: Cambridge.
9. Mahato, S.B. and Kundu, A.P., 1994, *Phytochemistry*, 37, 1517-1575.
10. Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G. and Delaude, C., 1998, *Phytochemistry*, 49, 2081-2085.
11. Koike, K., Kudo, M., Jia, Z., Nikaido, T., Ide, Y. and Sakura, T. 1999, *J. Nat. Prod.*, 62, 228-232.
12. Delay, C., Gavin, J.A., Aumelas, A., Bonnet, P.A. and Roumestand, C. 1997, *Carbohydr. Res.*, 302, 67-78.
13. Rumampuk, R.J., Bahti, H.H., Soemitro, S., and Tarigan, P. 2001, *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Universitas Sebelas Maret, 13 Oktober 2001, hal 356-362.
14. Bax, A. and Subramanian, S. 1986, *J. Magn. Reson.*, 67, 565-570.
15. Davis, D.G. and Bax, A. 1985, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 2820-2821.
16. Chapman, M.F. and Kennedy, J.F., 1986, *Carbohydrate analysis – a practical approach*. IRL Press, pp. 25 & 78-79.