

IDENTIFIKASI DUA ASAM TRITERPEN YANG TERDAPAT DIDALAM *AMSONIA GRANDIFLORA*, Fam. APOCYNACEAE

Subagus Wahyuono

Laboratorium Fitokimia, Fak. Farmasi, UGM., Yogyakarta

ABSTRAK

Amsonia grandiflora adalah salah satu tanaman yang mudah tumbuh didaerah kering. Tanaman ini mengandung karbohidrat dalam jumlah besar disamping mempunyai nilai nutrisi yang sama dengan rumput alfalfa secara in-vitro. Tetapi tanaman ini tidak dimakan oleh ternak yang hidup didaerah tersebut. Dua senyawa asam triterpen dalam tanaman dapat diisolasi dari sari diklorometana *A. grandiflora* yang tidak larut dalam n -heksana. Berdasarkan atas spektrum inframerah, spektrum massa, spektrum resonansi magnetik inti, titik lebur dan rotasi optik, identifikasi kedua senyawa tersebut mengarah kepada asam betulinat dan asam oleanolat. Perbandingan secara langsung kedua senyawa tersebut dengan senyawa asam betulinat dan asam oleanolat baku, maka kedua senyawa tersebut disimpulkan sebagai asam betulinat dan asam oleanolat. Keberadaan dua triterpene asam dalam jumlah relatif tinggi memungkinkan mempengaruhi rasa tanaman, yang memungkinkan ternak tidak mau memakannya.

Kata kunci: *Amsonia grandiflora*, makanan ternak, asam betulinat, asam oleanolat.

ABSTRACT

An indigenous desert plant, *Amsonia grandiflora*, has a high carbohydrate content and an animal feed nutritive value in-vitro similar to alfalfa; however, this plant is not grazed in the wild. Two triterpene acids were isolated from the dichloromethane extract of *A. grandiflora* that was insoluble in n -hexane. Based on their infrared, mass and nuclear magnetic resonance spectra as well as their melting points and optical rotations, the two acids were suspected to be betulinic acid and oleanolic acid. Direct comparison of these two acids with authentic betulinic and oleanolic acid, these acids were confirmed as betulinic acid and oleanolic acid. The high concentrations of oleanolic acid and betulinic acid might impart a sour taste to the plant. This could possibly be the reason that animals in the wild do not graze this plant.

Key words : *Amsonia grandiflora*, animal feedstocks, betulinic acid, oleanolic acid.

PENDAHULUAN

Keperluan rumput alfalfa untuk ternak di negara bagian Arizona, USA, cukup besar mengingat rumput tersebut hanya tumbuh di sebagian kecil dari negara bagian Arizona daerah barat laut. Dengan demikian biaya ekstra harus dikeluarkan oleh para peternak untuk membeli alfalfa dari negara bagian tetangga seperti California, Colorado, dan Texas.

Upaya pemanfaatan tumbuhan lokal sebagai pengganti alfalfa telah dilakukan oleh Hoffmann dkk. (1985). Salah satu tanaman terpilih adalah *Amsonia grandiflora*, fam. Apocynaceae, karena ternyata komposisi kimiawi tanaman ini sebagai makanan ternak serta hasil analisis uji pencernakan secara *in-vitro* ekuivalen dengan data analisis yang diperoleh pada alfalfa. Tetapi anehnya, hewan ternak didaerah tersebut tidak memperdulikan tanaman *A. grandiflora*. Oleh karena itu suatu penelitian perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia terutama senyawa metabolit sekunder yang mungkin menyebabkan *A. grandiflora* tidak dapat dimanfaatkan oleh ternak.

CARA PENELITIAN

1. Bahan

Bagian tanaman untuk penelitian ini adalah seluruh bagian tanaman yang di atas tanah, dan dipanen dari kebun percobaan di *Bioresources Research Facility, Office of Arid Land Studies, College of Agriculture, Univ. of Arizona*, Tucson, Arizona, pada tanggal 3 Mei 1984. *A. grandiflora* ditanam melalui biji yang dikumpulkan selama musim dingin (1979-1980), dan diatur dengan kerapatan 18.000 tanaman per hektar.

Bahan material diangin-anginkan sampai kering kemudian diserbuk, sedangkan herbarium tanaman ini disimpan di The University of Arizona Herbarium.

2. Alat

Titik lebur ditetapkan dengan *Kofler hot-stage apparatus*, Analisis karbon-hidrogen dilakukan di University of Arizona Analytical Center, spektra inframerah direkam dengan spektrofotometer Beckman IR-33, spektra NMR dicatat dengan FT-NMR Jeol FX 90 Q dan spektrometer Bruker WM 250, spektra massa resolusi rendah diperoleh dengan *direct inlet probe* (70 eV, 200°C), *El ionization mode* pada Varian MAT 311 *A double focusing spectrometer*, yang dilengkapi dengan SS 200 data sistem, rotasi optik dicatat dengan *Autopol-III automatic polarimeter* (Rudolf Research, Fairfield, New Jersey), kemurnian senyawa yang diperoleh diuji dengan kromatografi cair-gas (*Series 3700, Varian Inst. group*) dengan detektor FID dan kolom dari gelas (1 meter kali 2 millimeter) yang diisi dengan OV 101 pada 80-100 mesh Chromosorb W-14.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Isolasi senyawa

a. Ekstraksi :

Bahan kering yang telah diserbuk (10,35 kg) disari dengan diklormetana (8 l) dalam ekstraktor tipe Lloyd. Sari diklormetana dikeringkan dengan cara diangin-anginkan memberi residu 0,59 kg. Sebagian dari sari diklormetana kering (0,248 kg) disari dengan *n*-heksana memberi sari larut *n*-heksana (109,8 g) dan endapan (137,6 g) yang pemisahannya dilakukan dengan sentrifugasi (15.000 rpm, selama 10 menit pada temperatur 10°C). Sari larut *n*-heksana disimpan untuk penelitian fitokimia berikutnya, sedangkan endapan (sari tidak larut dalam *n*-heksana) disari kembali dengan dietil eter dengan teknik yang sama seperti tertulis di atas, memberi endapan (41,3 g) dan sari larut eter (95,2 g). Kemudian terhadap sari larut eter dilakukan partisi tiga-corong pisah (α' 4 l) dengan *n*-heksana:air:etanol 95% (28:1:18, v/v) sebagai pelarut. Partisi ini memberi sari lapisan atas (26,4 g) dan sari lapisan bawah (68,8 g).

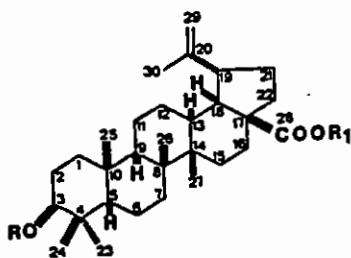
Sebagian dari sari lapisan atas (14,8 g) dipartisi lebih lanjut dengan kolom kromatografi dengan fase diam silika gel-60 (600 gram), fase gerak *n*-heksana dan campuran antara *n*-heksana dan etil asetat yang konsentrasinya menaik (2% - 20%). Setelah semua senyawa dielusi, kolom dicuci dengan campuran diklormetana dan metanol (1:1, v/v). Sembilan puluh satu fraksi (a' 200 ml) diperoleh dan digabungkan dalam beberapa kelompok berdasarkan atas data kromatogram lapis tipis. Fraksi 1-21 (5,2 g) berbentuk cair seperti minyak (non-polar), fraksi 23-53 (2.5 g) berbentuk padat, amorf dan fraksi 57-91 (4,8 g) juga berbentuk amorf.

b. Isolasi senyawa 1 :

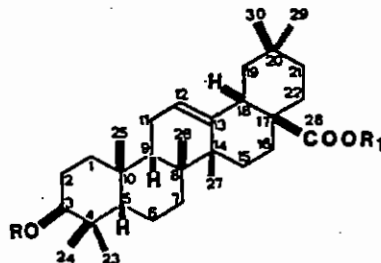
Fraksi 23-53 dilarutkan kedalam 10,0 ml campuran ekuivolume diklormetana dan metanol. Larutan dibiarkan dalam keadaan tertutup semalam, senyawa **1** mengkristal yang kemudian dipisahkan dengan penyaringan. Kristal yang diperoleh, dimurnikan dengan klt preparatif dengan fase diam silika gel GF 254 (E. Merck, Preparative grade) dan fase gerak *n*-heksana-etil asetat (3:1, v/v) dengan dua kali pengembangan. Senyawa **1** direkristalisasi dengan campuran pelarut diatas, senyawa **1** sebagai derivat trimetilsilil memberikan puncak tunggal pada kromatografi gas dengan waktu retensi 10,9 menit. Senyawa **1** mempunyai titik lebur 317- 318° C dan $[\alpha]_D^{25} +5,6^{\circ}$ (piridina; c, 0,45).

c. Isolasi senyawa 2 :

Fraksi 57-91 berisi satu senyawa utama (senyawa **2**) berdasarkan atas klt, dan tidak mudah larut dalam berbagai macam pelarut organik. Oleh karena isolasi senyawa **2** dilakukan dengan asetilasi sebagian dari fraksi ini (1,58 g) dengan piridina kering (2,0 ml) dan anhidrida asam asetat (2,0 ml). Derivat asetil (**2a**) yang diperoleh dipisahkan secara klt preparatif [*n*-heksana-etil asetat (4:1, v/v)], kemudian senyawa ini di-deasetilasi dengan KOH metanolik 10% menjadi **2** lagi. Senyawa **2** murni diperoleh dengan cara kristalisasi dengan metanol. Derivat trimetilsilil dari **2** memberikan puncak tunggal dalam kromatografi gas dengan retensi waktu 10,0 menit. Senyawa **2** mempunyai titik lebur 301-303° C dan $[\alpha]_D^{25} = +69^{\circ}$ (piridina; c, 0,35).



	R	R ₁
1	H	H
1a	H	Me
1b	COMe	H



	R	R ₁
2	H	H
2a	COMe	H
2b	COMe	Me

Identifikasi senyawa 1 dan 2

Spektrum inframerah (KBr) senyawa **1** menunjukkan serapan karakteristik pada 3435 (-OH), 3300-2500 (-COOH), 3080 (=C-H), 1385-1370 (dublet, jem-dimetil) dan 878 cm^{-1} (=CH₂). Spektrum resonansi magnetik inti (nmr) dari **1** (Gambar 1) menunjukkan adanya 6 buah metil, diantaranya: 5 metil tersier pada δ 0,83, 0,99, 1,06 (dua), 1,21 ppm dan sebuah metil vinil pada δ 1,68 ppm. Dua proton terminal pada δ 4,70 dan 4,90 ppm. Satu proton signal pada δ 3,40 ppm (multiplet, m) bergeser pada δ 4,55 ppm (multiplet) bila **1** diasetilasi (**1b**), proton ini diidentifikasi sebagai proton metina dari -OH sekunder. Konstanta kopling yang besar dari metina (-CH-OH) ini memberi petunjuk bahwa -OH tersebut pada posisi ekuatorial.

Resolusi rendah elektron impak spektrum massa (eims) **1** (Gambar 2) menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 456 (M^+). Pola sebitan **1** sangat karakteristik untuk triterpen pentasiklis terutama triterpen dengan kerangka dasar lupan. Ion sebitan pada m/z 438 (M^+ - H₂O) dan 410 (M^+ - HCOOH) adalah puncak utama pada daerah spektrum massa tinggi yang memberi indikasi adanya gugus fungsional (-OH, -COOH) pada **1**. Puncak-puncak pada m/z 248, 207 dan 189 (puncak dasar) pada dasarnya terjadi karena cincin-C dari triterpene kerangka lupane yang pecah dengan retensi muatan pada sebitan yang berisi cincin A/B atau D/E (Gambar 3). Adanya gugus -COOH pada cincin D/E dapat diketahui dengan membandingkan dengan spektrum massa dari derivat metil esternya (**1a**), sedangkan adanya gugus -OH pada cincin A/B dapat diketahui dengan cara yang sama terhadap spektrum massa dari derivat asetilnya (**1b**) (Ogunkoya, 1981).

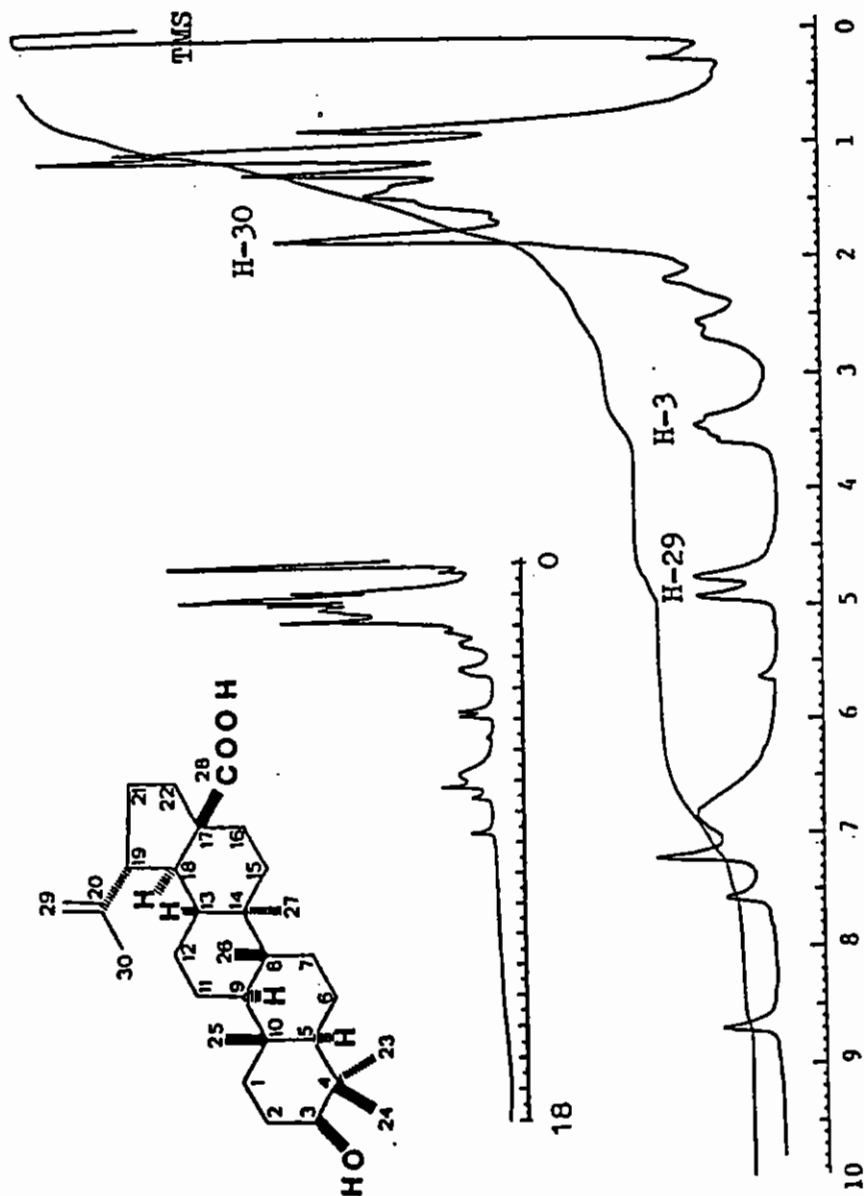
Data fisika dan spektra senyawa **1** ternyata sama dengan data asam betulinat yang telah dilaporkan oleh Devon dan Scott (1972). Lebih jauh lagi, perbandingan senyawa **1** secara langsung [campuran titik lebur, ko-kromatografi, perbandingan spektra (ir, nmr, dan MS)] dengan asam betulinat yang diisolasi dari tanaman *Manilkara diskolor* oleh Dr. S. D. Jolad (1985) (Col. of Pharmacy, Univ. of Arizona) menunjukkan bahwa senyawa **1** adalah asam betulinat.

Spektrum inframerah (KBr) **2** menunjukkan karakteristik serapan pada 3400 (-OH), 3000-2500 (-COOH), 1695 (-C=O) dan 1391-1362 cm^{-1} (dublet; jem-dimetil) (Nakanishi, 1966). Spektrum ir **2** sangat mirip dengan spektrum ir **1**, kecuali serapan pada 882 cm^{-1} (metilena terminal) tidak tampak.

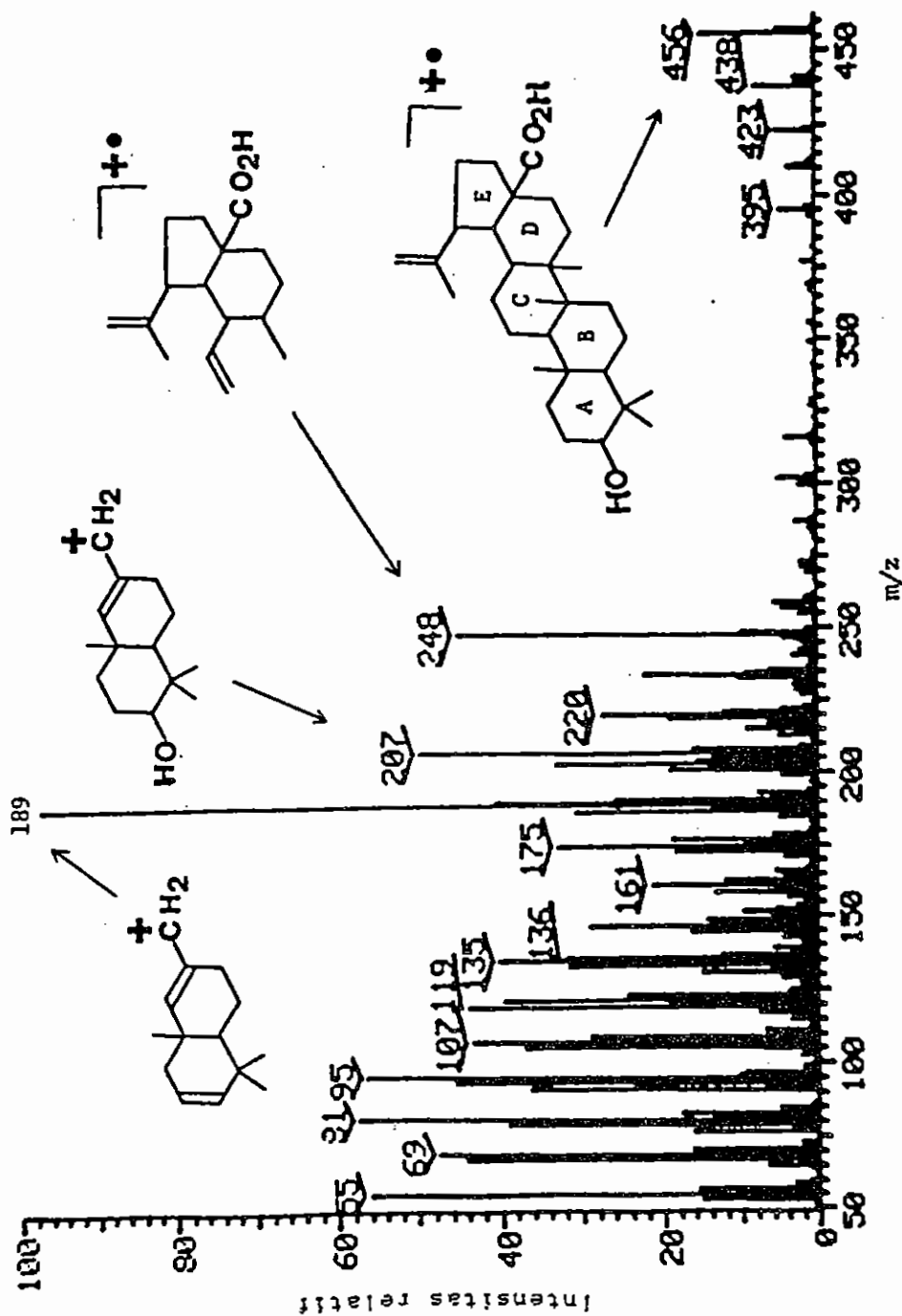
Spektrum resolusi rendah eims **2** (Gambar 4) sangat mirip dengan spektrum eims **1** yang juga menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 456 (M^+). Puncak utama spektrum pada massa yang tinggi antara lain m/z 438 (M^+ - H₂O), 423 (M^+ - CH₃), 411 (M^+ - COOH) dan 410 (M^+ - HCOOH). Sebitan-sebitan yang paling karakteristik adalah m/z 248 (puncak dasar), 203, 189 dan 133 yang terjadi karena pemecahan cincin C dengan retensi muatan pada sebitan A/B ataupun D/E (Gambar 5) (Budzikiewicz, 1963). Posisi -OH ataupun -COOH dapat disimpulkan dengan cara membandingkan spektra massa dari **2a** (derivat asetil) dan **2b** (derivat asetil dari metil ester). Adanya -OH pada cincin A/B dapat dikonfirmasi dengan data spektrum masa **2a** (m/z 207 tergeser ke m/z 249). Adanya gugus -COOH pada cincin D/E dapat dikonfirmasi dengan data spektrum massa **2b** (m/z 248 tergeser ke m/z 262) (Ogunkoya, 1981).

Spektrum nmr **2** (Gambar 6) mengkonfirmasi data spektrum ir dan spektrum massa di atas. Spektrum nmr **2** menunjukkan signal pada δ 3,19 ppm (m) tergeser ke δ 4,51 ppm (triplet, $J=8,6$ Hz) yang menerangkan bahwa -OH sekunder pada posisi mendatar (equatorial position) (Silverstein dkk., 1981). Signal multiplet pada δ 2,82 ppm (2 H) menunjukkan adanya -CH₂ pada posisi α dari -C=C-. Area antara δ 1,13 dan 0,76 ppm diintegrasikan sebagai 21 proton yang terdiri dari 7 metil tersier yaitu: satu metil pada δ 1,13, 1,03, 0,96, 0,95, 0,94, 0,978 dan 0,76

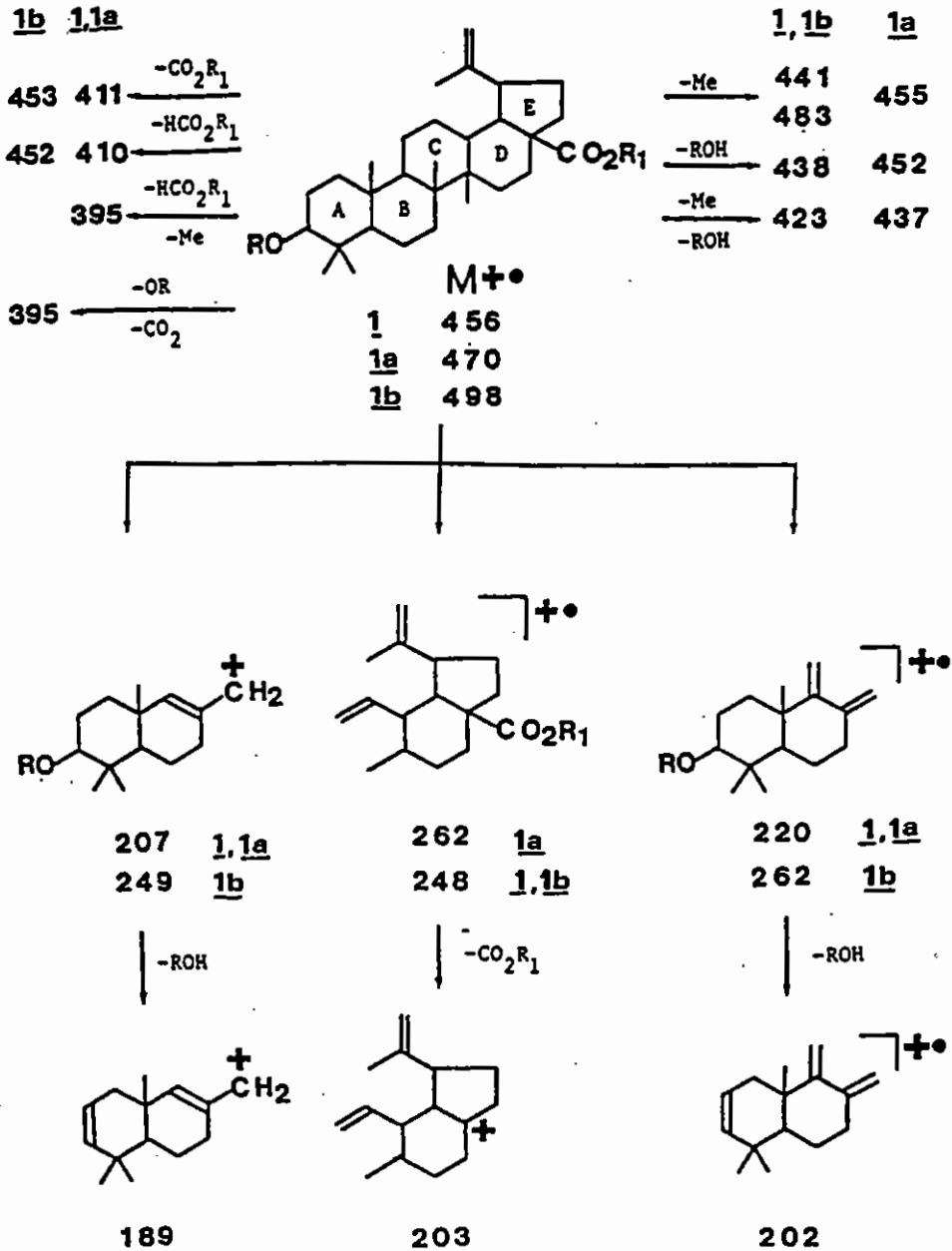
ppm. Proton dari -OH dan -COOH tidak memberi signal yang jelas,



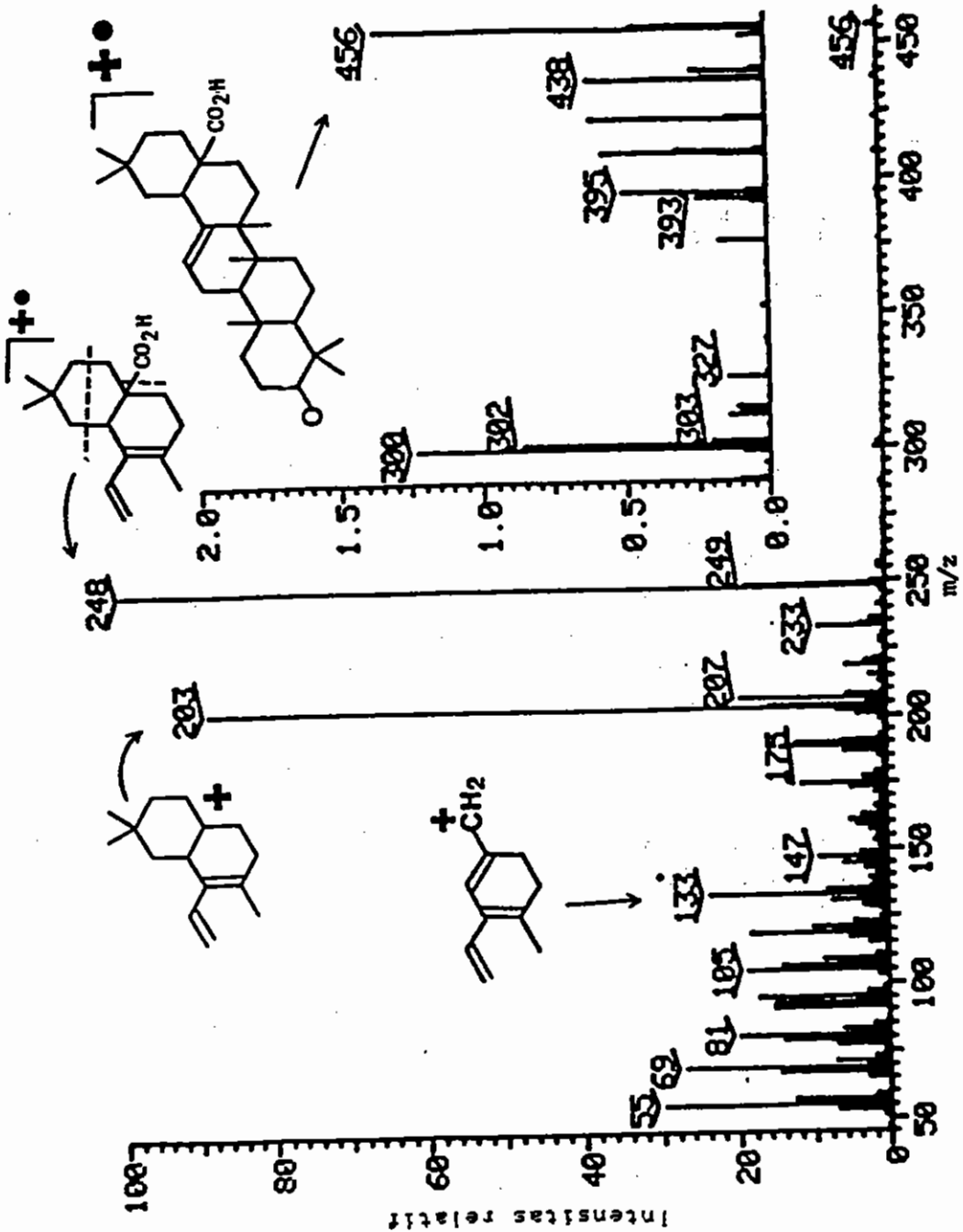
Gambar 1. Spektrum nmr (90 MHz) dari asam betulinat (1) dalam Piridina-d5.



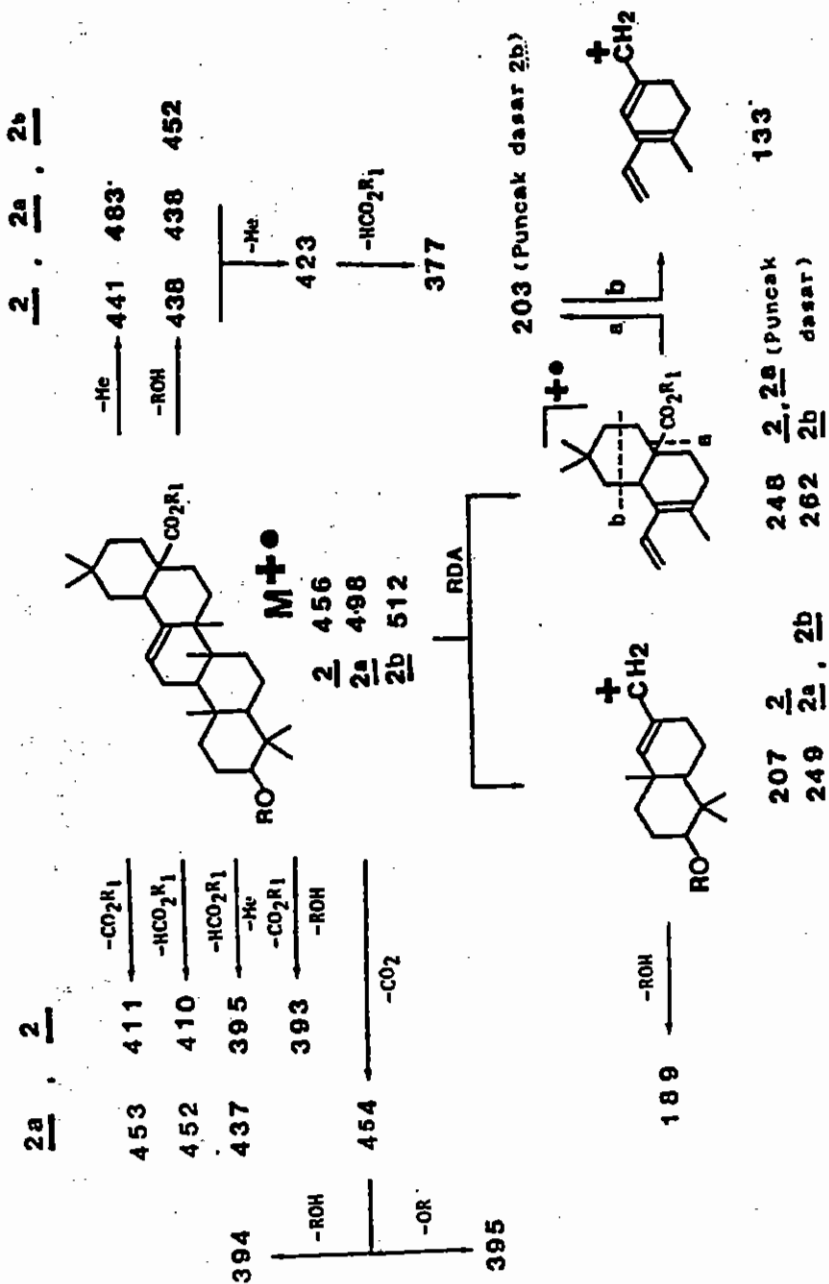
Gambar 2. Spektrum massa (Low Resolution EIMS) dari asam betulinat (1).



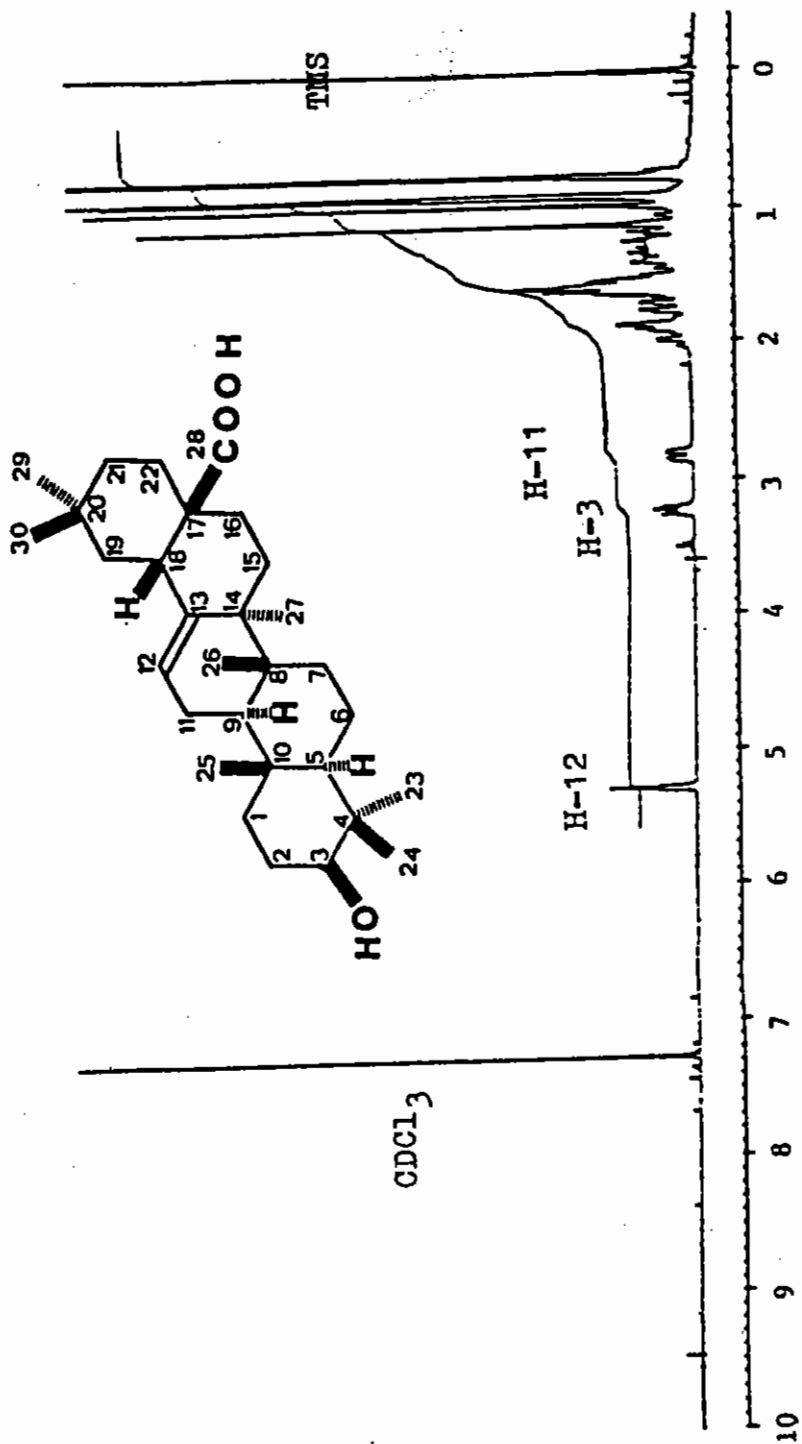
Gambar 3. Sebitan ion-ion utama (rasio m/z) spektra massa asam betulinat (1) dan derivatnya (1a, 1b).



Gambar 4. Spektrum massa (Low Resolution EIMS) dari asam oleolat (2).



Gambar 5. Sebitan ion-ion utama (rasio m/z) spektra massa asam oleanoilat (2) dan derivatnya (2a, 2b).



Gambar 6. Spektrum nmr (250 MHz) asam oleanolat (2) dalam kloroform-d.

walaupun demikian spektrum nmr **2b** (CDCl_3) menunjukkan adanya tambahan signal yang karakteristik pada δ 3,65 (singlet, 3H dari $-\text{COOCH}_3$) dan 2,10 ppm (singlet, 3H dari $\text{CH}_3\text{COO}-$). Tidak seperti nmr spektrum **1**, spektrum nmr **2** tidak menunjukkan adanya metilena terminal dan 3 proton dari vinilik metil.

Berdasarkan atas jumlah proton pada spektrum nmr, analisis karbon & hidrogen (C, 78,48; H, 10,90) dan bobot molekul pada m/z 456 maka disimpulkan bahwa rumus molekul **2** adalah $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Data fisika dan kimiawi **2** sama dengan data asam olenolat. Perbandingan secara langsung [ko-kromatografi, pengukuran titik lebur campuran dan spektra (ir, nmr, ms)] antara **2** dengan asam olenolat dari Dr. H. W. Kircher (1985) (*Col. of Agriculture, Univ. of Arizona*) menyimpulkan bahwa senyawa **2** adalah asam olenolat.

KESIMPULAN

Dua asam triterpen yang terdapat didalam sari diklormetana *Amsonia grandiflora* diidentifikasi sebagai asam betulinat dan asam olenolat berdasarkan atas data spektra (ir, ms dan nmr) kedua senyawa tersebut dan derivat-derivatnya serta perbandingan langsung dengan senyawa baku. Kadar yang tinggi dari kedua triterpen asam tersebut didalam tanaman mempengaruhi rasa tanaman tersebut menjadi asam, yang memungkinkan binatang ternak tidak mau memakannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Budzikiewicz, H., J. M. Wilson, dan Carl Djerassi (1963), Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems XXXII, Pentacyclic Triterpenes, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3688-3699.
- Devon, T. K., dan A. I. Scott (1972), *Handbook of Naturally Occurring Compounds*, vol. II Terpenes, hal. 310 dan 320, Academic Press, New York.
- Hoffmann, J. J., B. E. Kingsolver, dan Hunsu Punnapayak (1985), *Ethanol production from arid lands plants, Final report*, Arlington: The Bio-energy Council.
- Jolad, Shivanand D., *Kontak pribadi*.
- Kircher, Henry W., *Kontak pribadi*.
- Nakanishi, K., (1966), *Infrared Absorption Spectroscopy Practical*, Holden day, San Fransisco.
- Ogunkoya, L., (1981), Application of Mass spectrometry in structural problems in triterpenes, *Phytochemistry*, vol. 20, hal. 121-126.
- Silverstein, R. M., G. C. Bassler, and T. C. Morrill, (1981), *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 3rd. Ed., John Wiley and Sons Inc., New York.