ISOLASI DESOKSIURIDINDIASETAT DAN THIMIDINDIASETAT DARI SPONS *Theonella swinhoei*

THE ISOLATION OF DESOXYURIDINEDIACETATE AND THYMIDINEDIACETATE FROM Theonella swinhoei

Agus Supriyono

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika BPPT

E-mail: axinella@gmail.com.

Abstrak
Pada percobaan ini dilakukan isolasi kendungan senyawa yang berasal dari biota laut jenis spons. Sampel spons *Theonella swinhoei* diambil dari kedalaman sekitar 50 meter dibawah permukaan air di sekitar pulau Karkar Papua. Sampel segar dimaserasi langsung dalam methanol dan dikerjakan lebih lanjut di laboratorium. Karena terlalu polar dan kompleksnya fraksi utama pada analisa KCKT maka dilakukan derivatisasi dengan metode asetilasi. 50 mg fraksi polar ekstrak spons dilarutkan dalam 2 ml Pyridin kemudian ditambah dengan 2 ml asam asetat anhidrat. Larutan ini diaduk pada suhu dingin selama 24 jam. Hasil derivatisasi dikeringkan dengan rotavapour dan freezedryer. Keberhasilan derivatisasi dianalisis dengan KLT dan KCKT. Dari Langkah ini berhasil dideteksi 2 senyawa yang kemudian diisolasi menggunakan kolom Sephadex LH20 dengan fase gerak Aseton. Hasil isolat kemudian ditentukan berat molekulnya dengan FAB-MS dan strukturnya molekulnya ditentukan dengan metode NMR (H, C, Dept, COSY H-H). derivate nukleosida yang diperoleh adalah Desoksiuridindiasetat dengan m/z 311 $[M-H]^-$ dan UV max 253 nm dan Thimidindiasetat m/z 325 $[M-H]^-$ dan UV max 260 nm.

Kata kunci: spons, derivatisasi, nukleosida, isolasi

Abstract
This study conducted to isolate the active compounds from marine sponge. Theonella swinhoei sample sponge was obtained from Karkar island waters in Papua at 50 m depth. The fresh sample was macerated in methanol and the further treatmend was conducted in laboratory. Since the compounds was to polar and yhe main fraction was too complexs in the HPLC analysis, the sample was derivated by acetylation method. The 50 mg of polar fraction extract was dissolved in 2 ml of Pyridine and added with 2 ml of aceticacid anhydrate. This solution was homogenized in cold temperature for 24 hours. The derivate was dried by rotary evaporator and freezedryer. The derivate was analysis with TLC and HPLC. From this step was detected two compounds which isolated using Sephadex LH20 column with acetone as mobile phase. The molecular weight of Isolated fraction was determined by FAB-MS and the molecular structure was determined by NMR method (H, C, Dept, COSY H-H). The derivate nucleosides obtain were Desoxyuridinediacetate with m/z 311[M-H]$^-$ UV max 253 nm and Thymidinediacetate m/z 325 [M-H]$^-$ UV max 260 nm.

PENDAHULUAN

Nukleosida termasuk dalam kelas senyawa organik dengan strukturnya terdiri dari a nukleobase heterosiklik yang mengandung nitrogen dan gula 5-karbon. Mikroorganisme dan organisme laut dikenal mampu menghasilkan nukleosida dengan struktur yang khas dan sifat biologis yang tidak biasa. Penemuan aktivitas biologis yang luar biasa ini membuat nukleosida laut menjadi salah satu sumber senyawa penuntun pada sejumlah besar penelitian sintesis berbagai analog nukleosida dan evaluasi lebih lanjut terhadap aktivitas biologisnya terus dieksplorasi.

Namun demikian semenjak ditemukannya nukleosida oleh Bergman pada tahun 1950, hingga kini belum ada review

mengenai nukleosida yang di bicarakan secara komprehensif.

Sampai saat ini telah dilaporkan sekitar 68 nukleosida yang berasal dari laut yang membicarakan potensi aktivitas biologi serta pengembangannya kearah sintesis.

Dengan sangat menariknya potensi tersebut di atas maka, pada penelitian ini dilakukan usaha untuk mengisolasi nukleosida yang berasal dari biota laut (dalam hal ini dari spons). Dengan harapan akan semakin banyak nukleosida yang ditemukan sehingga potensi sebagai senyawa penuntun pada sintesis secara kimia juga semakin besar.

METODE PENELITIAN

Sampel spons *Theonella swinhoei* diperoleh pada kedalaman 50 meter dari sekitar kepulauan Karkar Papua. Spons segar yang diperoleh langsung dimaserasi dalam metanol dan disimpan sampai pengerjaan lanjut di Laboratorium.

Di laboratorium sampel spons tersebut di hancurkan lebih lanjut dengan blender dan di ekstraksi berulang dengan metanol. Filtrat yang diperoleh dari penyaringan kemudian dikeringkan dengan rotavapour. Agar ekstraksi spons ini bisa dilakukan secara optimal, maka disetiap pemberian metanol baru ekstraknya dikontrol dengan analisa menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sampai diperkirakan semua metabolit sekunder dalam spons tersebut habis.

Ekstrak kental spons yang diperoleh selanjutnya disuspensikan dengan air, kemudian dilakukan partisi cair cair secara berulangkali dengan n-Butanol yang telah dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Lapisan atas dipisahkan dan dikeringkan dengan rotavapour. Ekstrak yang diperoleh dinamakan fase n-Butanol. Fase ini bersifat polar dengan jumlah metabolit sekunder yang sangat banyak dan kompleks. Karena terlalu polar, pemisahan ekstrak ini sangat sulit dilakukan sehingga pada langkah selanjutnya digunakan metode derivatisasi untuk menurunkan polaritasnya.

Derivatisasinya menggunakan metode asetilasi terhadap ekstrak kental spons tersebut. Untuk bahan baku proses asetilasi digunakan 50 mg ekstrak kental yang selanjutnya dilarutkan dalam 2 ml Pyridin. Sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, ke dalam larutan ini ditambahkan perlahan lahan Asam asetat anhidrid dan pengadukan dilanjutkan selama 24 jam pada suhu dingin. Keberhasilan dari hasil proses derivatisasi dikontrol dengan metode KLT atau dengan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

Setelah produk derivatisasi telah semuanya diperoleh, maka dilanjutkan dengan pengeringan pelarut menggunakan rotavapour dan dilanjutkan dengan alat *freezedryer* sampai kering.

Isolasi dilanjutkan dengan pemisahan memakai metode kromatografi kolom dengan fase diam Sephadex LH20 dan fase bergerak Aseton.

Senyawa murni yang diperoleh diuji kemurniannya dengan KCKT dan dilanjutkan langkah elusidasi struktur menggunakan metode spektroskopi (MS dan NMR).

Instrumen dan Teknik Pengumpulan Data

Pengukuran berat molekul dilakukan dengan metode EI MS (Electron Ionization Mass Spectrometry) menggunakan spectrometer MS Finnigan MAT 8430 dan Finnigan MAT 90 dengan energy ionisasi 70 eV yang disuntikkan secara langsung. Metode yang digunakan FAB dan sampel dilarutkan dengan matriks Gliserin.

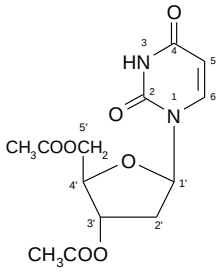
Spektra ^{1}H und ^{13}C NMR diukur pada NMR-Spektrometer Bruker AM300, ARX-400 dan DMX-600. Skala pergeseran kimia memakai standar TMS, sedang "coupling constant" dalam Hertz (Hz).

Selain dilakukan pengukuran spektra satu dimensi ^{1}H und ^{13}C-NMR juga dilakukan percobaan 2 dimensi NMR (^{1}H,^{1}H-COSY- dan ^{1}H,^{13}C-COSY- (direct: HMQC, long range: HMBC).

Pengukuran spektra UV/Vis dilakukan dalam H_2O dan panjang gelombang maksimumnya diukur dengan Spektrofotometer Lambda 2 dari Perkin-Elmer. Pengukuran menggunakan kuvet Quarz yang berisi H_2O sebagai referen dan dilakukan scanning dari panjang gelombang 200-700 nm.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini diperoleh senyawa dengan struktur yang ditunjukkan pada Gambar 1. Pada pengukuran Fab-MS dengan matriks Gliserin terlihat dengan jelas suatu puncak molekul pada 311 $[M-H]^-$. Dan dari prediksi diperoleh struktur formula $C_{13}H_{16}N_2O_7$.

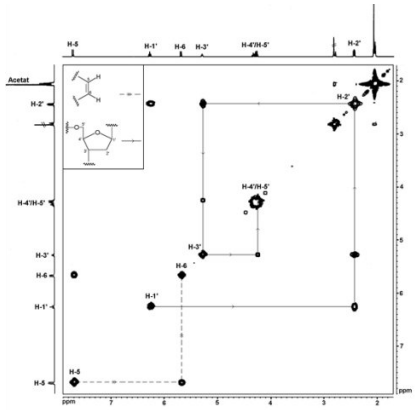


Gambar 1. Desoksiuridindiasetat

Pada spektra ^{13}C-NMR terlihat adanya 11 atom C. Pada spektra tersebut terdapat 2 yang mempunyai intensitas dua kali lebih besar dan ini diprediksi sebagai puncak metil dari C karbonil gugus asetat, dimana masing-masing puncak mempunyai pergeseran yang sama. Untuk lebih membuktikan dugaan ini dilakukan percobaan DEPT. terbukti pada spektra DEPT terlihat puncak 2 Metil-, 2 Metilen, 5 Metin- merupakan C kuarter.

Pada analisis menggunakan ^{1}H-^{1}H-COSY NMR terlihat semua puncak H basa Pirimidin (H-5 di 5,68 ppm dan H-6 di 7,71 ppm) serta puncak H dari cincin Desoxyribose (H-1' di 6,27 ppm, H-2' di 2,44 ppm, H-3' di 5,29 ppm, H-5' dan H-4' di 4,25-4,36 ppm) (lihat gambar 2).

Pada spektra 1H-NMR terlihat jelas puncak Singlet dari proton metil gugus asetat pada pergeseran 2,08 ppm (dimana kedua proton metil ini mempunyai pergeseran yang sama.



Gambar 2. Spektra 1H-1H-COSY NMR Dari Desoksiuridindiasetat

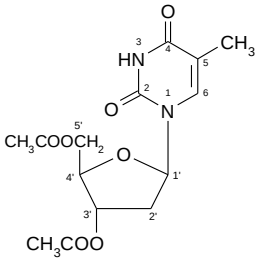
Desoksiuridindiacetat mempunyai serapan UV maximum pada panjang gelombang 253 nm (diukur dalam H_2O).

Tabel 1. Data 1H- und 13 C-NMR Desoksiuridindiasetat

Atom	^{1}H NMR δ [ppm]	^{1}H NMR *J* [Hz]	^{13}C NMR δ [ppm]
2			163,4 s
3-NH	10,04 brs		
4			151,2 s
5	5,68 d	J_{5-6} = 8,1	103,1 d
6	7,71 d	J_{6-5} = 8,2	140,5 d
1'	6,27 t	$J_{1'-2'}$ = 7,1	83,0 d
2'	2,44 dd	$J_{2'-1'}$ = 7,1 $J_{2'-3'}$ = 4,5	37,6 t
3'	5,29 dt	$J_{3'-2'}$ = 4,4 $J_{3'-4'}$ = 2,5	75,2 d
4'	4,25-4,36 m		85,9 d
5'	4,25-4,36 m		64,6 t
Acetat (2x)	2,08 s		20,7 q

[s = Singlet, d = Dublet, q = kuartet, brs = Singlet lebar

Sedangkan senyawa kedua sebagai berikut:



Gambar 3. Thimidindiasetat

Tabel 2. Data 1H-NMR Thimidindiasetat

Atom	^{1}H NMR δ [ppm]	^{1}H NMR *J* [Hz]
5-CH_3	1,94 d	$J_{5\text{-Me - 6}}$ = 1,0
6	7,53 d	$J_{6\text{ - 5-Me}}$ = 1,1
1’	6,28 dd	$J_{1'\text{-2a'}}$ = 6,2 $J_{1'\text{-2b'}}$ = 8,1
2a’	2,46 ddd	$J_{2a'\text{-1'}}$ = 6,2 $J_{2a'\text{-2b'}}$ = 14,3 $J_{2a'\text{-3'}}$ = 2,7
2b’	2,41 ddd	$J_{2b'\text{-1'}}$ = 8,1 $J_{2b'\text{-2a'}}$ = 14,3 $J_{2b'\text{-3'}}$ = 2,9
3’	5,29 dt	$J_{3'\text{-2a'}}$ = 2,7 $J_{3'\text{-2b'}}$ = 2,9 $J_{2'\text{-3'}}$ = 6,1
4’	4,27 - 4,44 m	
5’	4,27 - 4,44 m	
Acetat (2 x)	2,08 s	

[s = Singlet, d = Dublet, q = kuartet, m = Multiplet]

Pada pengukuran berat molekul dengan metode FAB-MS menggunakan matrik Gliserin menunjukkan suatu perbedaan fragmentasi yang jelas bila dibanding Desoksiuridin yaitu selisih 14 dan berat molekul relatifnya yaitu 325 [M-H]–dan dengan diperkuat spektra ^{1}H-NMR diperoleh perkiraan struktur formula $C_{14}H_{18}N_2O_7$.

Pengamatan pada spektra ^{1}H-NMR-menunjukkan kemiripan dengan spektra 2’-Desoksiuridindiasetat. Perbedaannya pada hilangnya puncak H-5 disekitar 5,68 ppm dan timbulnya puncak gugus metil sekitar 1,94 ppm (5-CH_3). Puncak pergeseran split dublett proton H-6 sekitar 7,53 ppm (J = 1,1 Hz) menunjukkan adanya kopel jauh (melalui 4 ikatan) dari gugus metil 5-CH_3. Dengan membandingkan data spektra NMR dari Desoksiuridindiasetat maka pergeseran H NMR dari Thimidindiasetat ditunjukkan pada tabel.

Thimidindiasetat mempunyai serapan UV-Maximum pada 260 nm (diukur dalam H_2O).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari isolasi metabolit sekunder fase n-Butanol yang bersifat polar terlebih dahulu dilakukan asetilasi. Hasil derivate yang diperoleh selanjutnya telah diisolasi dan diperoleh 2 buah derivate nukleosida yaitu Desoxyuridindiacetat dan Thymidindiasetat

Saran

Dilakukan uji aktivitas biologi, dalam hal ini antivirus, karena beberapa beberapa obat antivirus yang ada sekarang merupakan hasil pengembangan dari nukleosida.

DAFTAR PUSTAKA

Attaway, D.H., Zaborsky, O.R. (1993).

Marine Biotechnology, Vol.1 (Pharmazeutical and Bioactive Natural Products) Plenum Press, New York.Bergmann, W., Feeney R.J. (1951) Contribution to the study of marine sponges. 32. The nucleosides of sponges. J. Org. Chem. 16, 981-987.

Faulkner, D.J. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 1993, 10, 497–539.

Isono, K. Nucleoside antibiotics Structure, biologicalactivity, and biosynthesis. J. Antibiot. 1988, 41, 1711–1739.

Isono, K. Current progress on nucleoside antibiotics. Pharmacol. Ther. 1991, 52, 269–286.

Proksch, P.; Edrada-Ebel, R.A.; Ebel, R. Drugs from the sea—Opportunities and obstacles. Mar. Drugs 2003, 1, 5–17.