

## ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF BISDEMETHYLAAPTAMINE FROM BUNAKEN MARINE PARK SPONGE *Aptos*, sp.

### *Isolasi dan Penentuan Struktur Bisdemetilaaptamin dari Sepon Aptos Sp. Taman Laut Bunaken*

**Wilson AR Rombang**

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

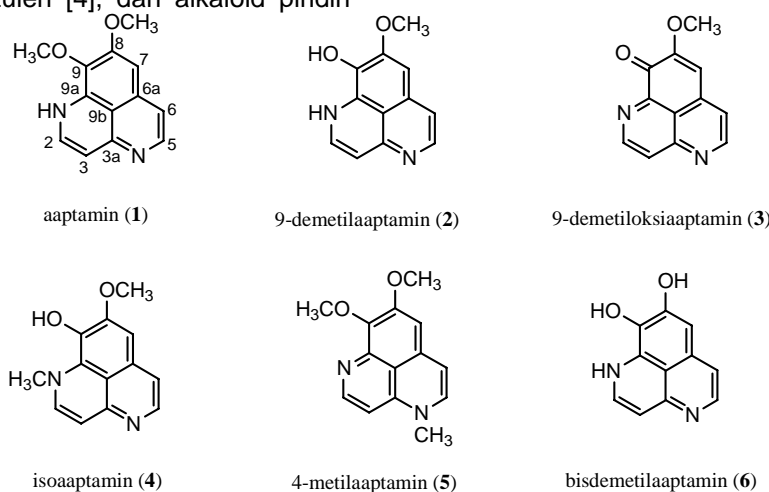
*Bisdemethylaaptamine*, an alkaloid naphthyridine with molecular weight 200 and formulae molecule  $C_{11}H_8N_2O_2$  has been isolated from Bunaken Marine Park sponge *Aptos* sp. Isolation was done by using several stages of column chromatography and high performance liquid chromatography. Molecular weight of this naphthyridine alkaloid was determined by electron ionization (EI) and electrospray ionization (ESI) mass spectroscopies and its structure assigned to be 8,9-dihydroxy-1H-benzo[d,e][1,6]naphthyridine by proton and carbon nuclear magnetic resonances ( $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR).

**Keywords:** *Sponge, Aptos* sp., naphthyridine alkaloid, bisdemethylaaptamin.

### PENDAHULUAN

*Aptos* sp (Demospongiae) adalah sepon laut yang hidup di sekitar pantai Bunaken, Sulawesi Utara [1], dan di pantai Pulau Baranglompo Sulawesi Selatan [2]. Sepon genus *Aptos* telah dibuktikan mengandung beberapa alkaloid naftiridin (1 – 6) seperti ditunjukkan pada Gambar 1 [3], disamping alkaloid azulen [4], dan alkaloid piridin

[5]. Beberapa alkaloid naftiridin tersebut dilaporkan mempunyai aktivitas biologi diantaranya penghalang  $\alpha$ -adrenoseptor dan aktivitas kardiotonik [6], sitotoksik [7], antiviral [8], antimikroba [9], antioksidan [10], disamping potensi antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak etanol dan beberapa fraksi alkaloid dari sepon *Aptos* sp Taman laut Bunaken [11].



**Gambar 1** Beberapa alkaloid naftiridin alam.

Berdasarkan data spektrum massa dan profil kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dari isolat alkaloid asal sepon *Aptos* sp. Taman Laut Bunaken dapat diindikasikan bahwa sepon ini mengandung bisdemetilaaptamin (**6**) [1], suatu alkaloid naftiridin yang dihipotesiskan sebagai prekursor alkaloid naftiridin aaptamin (**1**) dan turunannya [12]. Disamping itu, spesies sepon ini dilaporkan juga mengandung tiga alkaloid naftiridin (**1**, **2**, **4**) [1]. Sebagai lanjutan dari penelitian kami tentang kandungan alkaloid dari sepon *Aptos* sp. Taman Laut Bunaken, pada makalah ini kami ingin mendiskusikan isolasi dan penentuan struktur bisdemetilaaptamin (**6**) dari sepon tersebut yang pada tulisan sebelumnya [1] hanya diidentifikasi dengan data spektrum massa dan profil KCKT.

### Metode Penelitian Umum

Instrument kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang digunakan adalah Hewlett Packard HP1090 dengan *diode array detector* (DAD) pada panjang gelombang  $\lambda$  254 nm. Fase diam pada kromatografi kolom adalah sephadex LH-20. Spektrum massa diambil menggunakan teknik ionisasi elektron (EI) dan ionisasi elektro spray (ESI) pada instrumen VG Quatro II mass spectrometer. Spektrum resonansi magnetik inti (RMI)  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  diambil pada instrumen Varian INOVA pada 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) dan 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) dalam  $\text{DMSO}-d_6$ .

### Bahan sepon

Sepon *Aptos* sp. dikumpulkan dari Taman Laut Bunaken Sulawesi Utara pada bulan April 2000. Sampel sepon dideterminasi dan disimpan di Lembaga Oseanologi Nasional-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LON-LIPI).

### Ekstraksi dan Isolasi.

Bahan segar sepon *Aptos* sp. sebanyak 4 kg diekstraksi dengan etanol diperoleh ekstrak etanol sebanyak 638 g. Sejumlah 200 g ekstrak etanol dilarutkan dalam metanol-asam asetat (1:0,01) kemudian dipartisi dengan n-heksan diperoleh tiga lapisan yaitu lapisan n-heksan (lapisan atas), lapisan metanol-asam (lapisan tengah), dan lapisan air-asam (lapisan bawah). Lapisan metanol-asam selanjutnya dievaporasi diperoleh 80 g ekstrak metanol-asam. Dari ekstrak metanol-asam diambil 10 g dan dilakukan kromatografi kolom dengan fasa diam sephadex LH-20 (100 g) dan eluen metanol-diklorometan-asam asetat (1:1:0,01) diperoleh tiga fraksi masing-masing disebut MF-1 (7,02 g), MF-2 (570 mg), dan MF-3 (200 mg). Sejumlah 20 mg fraksi MF-2 menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel (20 g) dan eluen diklorometan-

metanol (7:3), diperoleh empat fraksi yaitu MF-2A.1 (6 mg), MF-2A.2, MF-2A.3, dan MF-2A.4. Fraksi MF-2A.1 (6 mg) selanjutnya dilakukan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik [Instrumen Hewlett Packard 1090, Kolom C-18,  $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4,6$  mm; detektor UV pada  $\lambda$  375 nm, Eluen: A.  $\text{H}_2\text{O}$ -0,05% HOAc, B. MeOH-0,05% HOAc, Elusi isokratik pada 20% B selama 60 menit, kecepatan alir 1 mL/menit] diperoleh beberapa puncak, dan untuk puncak pada waktu retensi ( $t_R$ ) 12,630 menit dimurnikan lebih lanjut menggunakan KCKT [Instrumen Waters 510, Kolom C-18,  $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 10$  mm; detektor UV pada  $\lambda$  375 nm, Eluen:  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{H}_2\text{O}$ :TFA (19:81:0,1), Elusi isokratik selama 60 menit, kecepatan alir 4 mL/menit] diperoleh isolat senyawa **6** sebanyak 1,1 mg. Isolat yang diperoleh selanjutnya diuji kemurniannya dengan KCKT fase terbalik menggunakan kondisi KCKT [Instrumen Hewlett Packard 1090, Kolom YMC ODS-AQ,  $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 20$  mm; detektor UV pada  $\lambda$  375 nm, Eluen:  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{H}_2\text{O}$ :TFA (20:80:0,1), Elusi isokratik selama 60 menit, kecepatan alir 10 mL/menit] dan menunjukkan satu puncak pada waktu retensi 12,5 menit yang mengindikasikan isolat tersebut relatif murni.

**Senyawa 6 sebagai garam monotrifloroasetat; 8,9-Dihidroksi-1H-benzo[d,e][1,6]naftiridin-4-ium monotrifloroasetat.** 0.9 mg, padatan kuning. UV/Vis  $\lambda_{\text{maks}}$  402, 363, 313, 267, 241 nm. Inframerah (KBr)  $\nu_{\text{maks}}$  3531, 3169, 2892, 1660, 1611, 1575, 1439, 1401, 1340, 1234, 1192, 1133, 1095, 940, 853, 801, 722, 643  $\text{cm}^{-1}$ , NMR (lihat Tabel 1). EI- dan ESI-MS lihat teks.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejumlah 4 kg sepon *Aptos* sp. diekstraksi dengan etanol diperoleh 638 g ekstrak etanol. Selanjutnya diambil 200 g ekstrak etanol dan dilarutkan dalam metanol-asam asetat (100:1) kemudian dipartisi dengan n-heksan diperoleh tiga lapisan masing-masing lapisan n-heksan (lapisan atas), lapisan metanol-asam (lapisan tengah), dan lapisan air-asam (lapisan bawah). Lapisan metanol-asam (lapisan tengah) dievaporasi diperoleh ekstrak metanol-asam sebanyak 80 g. Sejumlah 10 g dari ekstrak metanol-asam dilakukan kromatografi kolom dengan fasa diam sephadex LH-20 (100 g) dengan eluen metanol-diklorometan-asam asetat (1:1:0,01) diperoleh tiga fraksi, MF-1, MF-2, dan MF-3. Tahapan kromatografi selanjutnya dilakukan pada fraksi MF-2 (20 mg) karena menunjukkan pola nada yang relatif mudah untuk dipisahkan, menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel (20 g) dan eluen diklorometan-metanol (7:3), diperoleh empat fraksi yaitu MF-2A.1 (6 mg), MF-2A.2, MF-

2A.3, dan MF-2A.4. Fraksi MF-2A.1 (6 mg) selanjutnya dimurnikan dengan dua tahap kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik (lihat seksi eksperimen) diperoleh senyawa **6** sebanyak 1,1 mg.

Isolat murni alkaloid naftiridin (**6**) yang diperoleh diidentifikasi terlebih dahulu dengan cara membandingkan profil kromatogram cair kinerja tinggi (KCKT) dengan bisdemetilaaptamin standar hasil sintesis secara biomimetik [12]. Profil KCKT baik senyawa **6**, bisdemetilaaptamin standar, dan campuran senyawa **6** dengan bisdemetilaaptamin standar masing-masing menunjukkan satu puncak dengan waktu retensi ( $t_R$ ) 10,4 menit. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa **6** identik dengan bisdemetilaaptamin standar. Selanjutnya dilakukan penentuan struktur isolat tersebut dengan menganalisis data spektroskopi diantaranya spektrum massa dan spektrum resonansi magnetik inti proton dan karbon (RMI- $^1\text{H}$  dan RMI- $^{13}\text{C}$ ).

Spektrum massa ionisasi elektron (EI-MS) senyawa **6** menunjukkan adanya ion-ion pada  $m/z$  200 [ $\text{M}^+$ ], 171 [ $\text{M}^+-\text{H}-\text{CO}$ ], dan 143 [ $\text{M}^+-2\text{CO}-\text{H}$ ], sedangkan spektrum massa ionisasi elektro spray (ESI-MS) menunjukkan adanya ion-ion pada  $m/z$  329 [ $\text{M}^++\text{H}+2(\text{CH}_3\text{CN})+2\text{Na}$ ] dan 225 [ $\text{M}^++2\text{H}+\text{Na}$ ], mengindikasikan berat molekul senyawa **6** adalah 200 sma. Berat molekul 200 sma diindikasikan juga dimiliki oleh bisdemetilaaptamin standar berdasarkan data spektrum massa EI dan ESI-MS, sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa **6** dan bisdemetilaaptamin standar adalah identik. Berat molekul genap mengindikasikan adanya atom

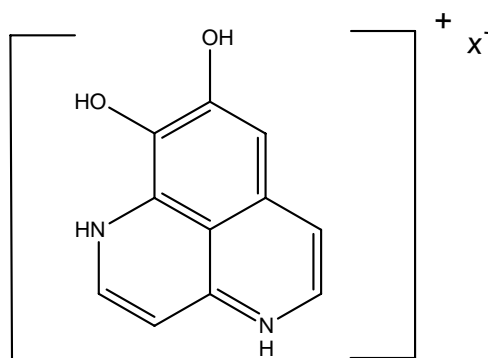
nitrogen yang berjumlah genap. Berdasarkan data berat molekul dan spektrum DEPT RMI- $^{13}\text{C}$  (Tabel 1) formula molekul senyawa **6** ditetapkan sebagai  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ .

Spektrum RMI- $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  senyawa **6** yang ditabulasikan pada Tabel 1 menunjukkan adanya sinyal-sinyal dari 2 proton amina aromatik pada pergeseran kimia ( $\delta$ , ppm) 12,07 (br d; 4,2 Hz) dan 11,89 (br d; 5,4 Hz), 2 proton hidroksi pada  $\delta$  11,10 (br s) dan 9,83 (br s), 5 proton aromatik pada  $\delta$  7,69 (t; 6,6 Hz), 7,16 (dd; 5,1 & 7,2 Hz), 6,80 (s), 6,71 (d, 6,3 Hz), dan 6,19 (d, 6,9 Hz), 11 karbon aromatik pada  $\delta$  150,9 (C), 149,8 (C), 141,7 (CH), 129,8 (C), 129,1 (C), 128,1 (C), 127,6 (CH), 115,9 (C), 112,3 (CH), 103,9 (CH), dan 97,3 (CH). Sinyal-sinyal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa **6** adalah kelompok alkaloid inti naftiridin yaitu 1H-benzo[d,e][1,6]naftiridin [13].

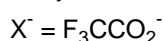
Adanya sinyal dua proton amina aromatik yang dapat ditukarkan (*exchangeable*) pada  $\delta$  (ppm) 12,07 (br d; 4,2 Hz; HN-1) dan 11,89 (br d; 5,4 Hz; HN-4) mengindikasikan bahwa senyawa **6** berada dalam bentuk terprotonasi pada N-4 (Gambar 2). Terprotonasinya N-4 disebabkan karena senyawa **6** dimurnikan dalam bentuk trifloroasetat-nya (lihat seksi eksperimen). Multiplisitas dublet dari kedua proton amina aromatik tersebut menunjukkan bahwa kedua proton tersebut bergandengan dengan masing-masing satu proton aromatik yang lain. Dua sinyal proton hidroksi masing-masing pada  $\delta$  11,10 (br s) dan 9,83 (br s) mengindikasikan bahwa senyawa **6** mengandung dua gugus hidroksi.

**Tabel 1** Tabulasi pergeseran kimia proton dan karbon dari spektrum RMI- $^1\text{H}$  dan RMI- $^{13}\text{C}$  senyawa **6** dan bisdemetilaaptamin standar (**a**) dalam  $\text{DMSO}-d_6$ .

Posisi C dan H	$\delta$ C (ppm)		DEPT	$\delta$ H (ppm) multiplisitas, J (Hz)	
	<b>6</b>	<b>a</b>		<b>6</b>	<b>a</b>
2	141,7	141,7	CH	7,69 (t; 6,6)	7,69 (t; 6,3)
3	97,3	97,8	CH	6,19 (d; 6,9)	6,19 (d; 6,9)
3a	149,8	149,8	C	-	-
5	127,6	127,6	CH	7,16 (dd; 5,1; 7,2)	7,16 (dd; 4,2; 7,2)
6	103,9	104,0	CH	6,71 (d; 6,3)	6,71 (d; 7,2)
6a	129,1	129,1	C	-	-
7	112,3	112,3	CH	6,80 (s)	6,80 (s)
8	150,9	151,0	C	-	-
9	128,1	128,1	C	-	-
9a	129,8	129,8	C	-	-
9b	115,9	115,9	C	-	-
8,9-OH	-	-		9,83 (br s) 11,10 (br s)	9,83 (br s) 11,16 (br s)
1-NH	-	-		11,89 (br d; 5,4)	11,90 (br d; 5,1)
4 -NH	-	-		12,07 (br d; 4,2)	12,14 (br s)



Senyawa 6, basa bebas

**Gambar 2** Senyawa 6 sebagai garam monotrifloroasetat

Proton yang terletak pada C-2 diindikasikan dengan adanya sinyal triplet pada  $\delta$  7.69 ppm ( $J = 6,6$  Hz) yang bergandengan dengan sebuah sinyal dublet dari H-3 pada 6,19 ppm ( $J = 6,9$  Hz). Sinyal dublet-dublet pada  $\delta$  7,16 ppm yang bergandengan dengan sinyal dublet pada  $\delta$  6,71 ppm (6,3 Hz) mengindikasikan berturut-turut sinyal proton yang terletak pada C-5 dan C-6. Selain itu, sinyal singlet terisolasi pada  $\delta$  6,80 ppm (s) mengindikasikan sinyal proton yang terletak pada C-7. Dengan demikian posisi dua gugus hidroksi ditetapkan terletak pada C-8 dan C-9.

Lebih lanjut, perbandingan data RMI senyawa 6 dan bisdemetilaaptamin standar yang ditunjukkan pada Tabel 1 mengindikasikan bahwa harga pergeseran kimia proton dan karbon kedua senyawa tersebut adalah identik, sehingga struktur senyawa 6 dapat ditetapkan sebagai 8,9-dihidroksi-1*H*-benzo[*d,e*][1,6]naftiridin-4-ium monotrifloroasetat atau bisdemetilaaptamin-4-ium mono-trifloroasetat yang selanjutnya disebut bisdemetilaaptamin. Untuk mendukung penetapan struktur tersebut, saat ini sedang dilakukan analisis spektrum RMI dua dimensi dari senyawa 6 dan bisdemetilaaptamin standar. Analisis data dua dimensi tersebut akan didiskusikan pada publikasi berikutnya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Rombang, W. A. R., Rumampuk, R. J.; Soemitro, S., Tarigan, P., 2001, *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Jurusan Kimia, Universitas Negeri Yogyakarta, 382-387.
- Rahmaniar, R.S., 2001, *Proceedings of the International Seminar on Natural Products Chemistry and Utilization Resources*, Universitas Indonesia – UNESCO, 86-88.
- Rombang, W. A. R., Rumampuk, R. J., Soemitro, S., Tarigan, P., 2001, *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Jurusan Kimia, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Rudi, A., Kashman, Y., 1993, *Tetrahedron lett.*, 34, 4683-4684.
- Granato, A.C., Berlinck, R.G.S., Magalhaes, A., Schefer, A.B., Ferreira, A.G., de Sanctis, B., de Freitas, Y.C., Migotto, E.H.A.E., 2000, *Quimica Nova*, 23, 594-599.
- Ohizumi, Y.; Kajiwara, A.; Nakamura, H.; Kobayashi, J., 1984, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 785-786.
- Shen, Y.C., Lin, T.T., Sheu, J.H., Duh, C.Y., 1999, *J. Nat. Prod.*, 62, 1264-1267.
- Coutinho, A.F., Chanas, B., e Souza, T.M.L., Frugrulhetti, I.C.P.P., Epifanio, R. de A., 2002, *Heterocycles*, 57, 1265-1272.
- Calcul, L., Longeon, A., Al Maurabit, A., Guyot, M., Bourguet-Kondracki, M.L., 2003, *Tetrahedron*. 59, 6539-6544.
- Takamatsu, S., Hodges, T., W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M.T., Nagle, D.G., 2003, *J. Nat. Prod.*, 66, 605-608.
- Rombang, W. A. R., Rumampuk, R. J., Safitri, R., Tarigan, P., 2003, Presentasi pada International Symposium on Biomedicines. Bogor Agriculture University, Bogor.
- von Nussbaum, F., Schumann, S., Steglich, W. 2001 *Tetrahedron*. 57, 2331-2335.
- Nakamura, H., Kobayashi, J., Ohizumi, Y., 1982, *Tetrahedron lett.*, 23, 5555-5558.