

## ISOLASI SENYAWA STEROID DARI KUKIT AKAR SENGGUGU (*Clerodendrum serratum* L.Moon)

Nasrudin<sup>1,2)</sup>, Wahyono<sup>3)</sup>, Mustofa<sup>4)</sup> dan Ratna Asmah Susidarti<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Mahasiswa Program Studi S3 Ilmu Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281;

<sup>2)</sup>Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawesi Tenggara, 93232; <sup>3)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281; <sup>4)</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

### ABSTRACT

*Steroid is a very important compound in medicine. Its occurrence as a secondary metabolite compound which is expected to be the chemical constituent that gives medicinal value to certain plant. Senggugu have been use as medicine for a long time and have been reported to contain steroid. Because of that, this study's objective is to isolate steroid compounds from Senggugu's roots bark. Senggugu's roots bark powder is extracted using fractional maceration using n-hexane, ethyl acetate and methanol to obtain ethyl acetate fraction of senggugu's roots bark extract. The extract then fractionated further using Vacuum Liquid Chromatography (VLC) with n-hexane-ethyl acetate-methanol gradient eluents to obtain ten fractions. Further purification is performed on fraction D using Gravity Column Chromatography with n-hexane-ethyl acetate gradient eluents producing eight fractions that's monitored using Thin Layer Chromatography (TLC). Purification that was performed on fraction D7 by recrystallization yielding 17 mg isolate. That isolate then tested for purity and spectroscopic analysis using GC-MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. Isolate N1 spectral data then compared against reference  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol followed by TLC analysis on the same system using anisaldehyde as stain marker. Isolation procedure yielding in isolate N1 which is white powder with melting point 138-141<sup>0</sup>C and chemical formula C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O. In accordance to the spectral analysis of isolate N1 and comparison against existing data base, we propose that isolate N1 is Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol which is a new steroid from *Clerodendrum serratum* that have yet to be reported.*

**Keywords :** Steroid, (3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 24S)-Stigmastan-3-ol dan *Clerodendrum serratum*

### ABSTRAK

Steroid merupakan senyawa penting dalam pengobatan. Keberadaannya sebagai salah satu diantara golongan senyawa metabolit sekunder diharapkan menjadi konstituen kimia yang memberi nilai pengobatan pada suatu tumbuhan. Senggugu telah lama dimanfaatkan sebagai obat secara tradisional dan dilaporkan mengandung steroid. Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa steroid dari kulit akar senggugu. Sebuk kulit akar senggugu diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat mulai n-heksan, etil asetat hingga metanol, sehingga diperoleh ekstrak fraksi etil asetat kulit akar senggugu. Ekstrak tersebut kemudian difraksinasi menggunakan KCV (Kromatografi Cair Vakum) eluen n-heksan-etil asetat-metanol secara bergradien, diperoleh sepuluh fraksi. Selanjutnya pada fraksi D dilakukan isolasi senyawa menggunakan KKG (Kromatografi Kolaom Grafitasi) eluen n-heksan-etil asetat secara bergradien pula, dihasilkan delapan fraksi yang dipantau dengan KLT. Pemurnian isolat dilakukan pada fraksi D7 dengan cara rekristalisasi, diperoleh isolat N1 sebanyak 17 mg. Isolat tersebut di uji kemurniannya dan dilakukan analisis spektroskopi GC-MS, <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR. Data spektra isolat N1 dibandingkan dengan  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol serta dilakukan analisis KLT dalam sistem yang sama dengan penampak noda anisaldehyda. Hasil isolasi yang diperoleh adalah isolat N1 berbentuk serbuk putih dengan titik lebur 138-141<sup>0</sup>C dan rumus molekul C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O. Berdasarkan analisis data spektra isolat N1 yang dibandingkan dengan data terdahulu, maka kami mengusulkan bahwa isolat N1 adalah Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol yang merupakan steroid baru dari *Clerodendrum serratum* yang belum pernah dilaporkan.

**Kata Kunci :** Steroid, Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol dan *Clerodendrum serratum*

## **PENDAHULUAN**

Steroid merupakan terpenoid lipid yang dikenal dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Struktur senyawanya pun cukup beragam. Perbedaan tersebut disebabkan karena adanya gugus fungsi teroksidasi yang terikat pada cincin dan terjadinya oksidasi cincin karbonnya (Samejo dkk., 2013). Steroid berperan penting bagi tubuh dalam menjaga keseimbangan garam, mengendalikan metabolisme dan meningkatkan fungsi organ seksual serta perbedaan fungsi biologis lainnya antara jenis kelamin. Tubuh manusia memproduksi steroid secara alami yang terlibat dalam berbagai proses metabolisme. Sebagai contoh steroid dari garam empedu, seperti garam deoksikolik, asam kholik dan glisin serta konjugat taurin yang berfungsi memperlancar proses pencernaan (Bhawani dkk., 2011).

Berdasarkan sumbernya steroid dibedakan atas steroid sintesis dan alami. Steroid sintesis yang umum digunakan adalah glukokortikosteroid, estrogen, metilprednisolon, kortikosteroid, androgen, squalamine dan hydrocortisone. Senyawa ini juga digunakan untuk pengobatan penyakit akibat kelebihan atau kekurangan hormon, penyakit berbahaya serta penyakit lainnya seperti radang sendi dan alergi (Bhawani dkk., 2011). Sterol tumbuhan yang telah lama dikenal adalah campesterol, stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol. Sterol ini menunjukkan efek menurunkan kolesterol dan antikarsinogenik. Efek antiangiogenik diduga melibatkan aksi senyawa tersebut sebagai antikanker (Choi dkk., 2007). Stigmasterol dimungkinkan untuk mencegah penyakit kanker tertentu, misalnya kanker ovarium, prostat,

payudara dan kanker usus besar karena mempunyai potensi antioksidan, hipoglikemik dan mampu menghambat tiroid (Gabay dkk., 2010; Panda dkk., 2009).

Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian kami yang sebelumnya sudah kami laporkan baik aktivitas antioksidan maupun aktivitas hepatoprotektif fraksi etil asetat kulit akar senggugu (*Clerodendrum serratum*) (Nasrudin dkk., 2015; Nasrudin dkk., 2017). Isolasi senyawa steroid dari tumbuhan ini merupakan upayah dalam mencari senyawa antioksidan yang dapat memberikan efek hepatoprotektif. Sebagaimana diketahui bahwa senggugu secara tradisional telah lama digunakan untuk asma, bronkitis, peluruh air seni, obat batuk dan untuk memperoleh suara yang jernih (Heyne, 1950). Selain itu, senggugu dilaporkan mengandung beberapa jenis steroid, diantaranya  $\gamma$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol, spinasterol, spinasteril- $\beta$ -D-glucoporanoside,  $\alpha$ -spinasterol, campesterol, cholestanol, cloresterol, 24-etil kolesterol dan stigmasterol (Banerjee S.K. dkk., 1969; Nair dkk., 1976; Bonsri, 2003; Fan dkk., 2007 dan Singh dkk., 2012). Dimana steroid merupakan salah satu diantara golongan senyawa metabolit sekunder yang kehadirannya diharapkan sebagai konstituen kimia yang memberi nilai pengobatan pada suatu tumbuhan (Kardong dkk., 2012; Sasidharan dkk., 2011). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa steroid dari kulit akar senggugu.

## **METODOLOGI**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat penggiling simplisia mesin merk *Retsch Muhle*, alat maserasi (maserator), ayakan, corong kaca, gelas beker, gelas ukur, spatula, kolom kromatografi cair vakum diameter 8 cm dan tinggi 42 cm, kolom kromatografi gravitasi diameter 2 cm dan tinggi 50 cm, statif, botol vial, *Chamber*, lampu UV  $\lambda$  254 nm dan 366 nm, oven (Finco Inc), pipet ukur, pipet tetes, *rotary evaporator* (Buchi), Fisher melting Point, spektrofotometer  $^1\text{H}$  dan  $^{12}\text{C}$ -NMR (JEOL type JNM-ECA 500) spektrofotometer GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010SE), timbangan analitik, dan *waterbath* (Memmert).

Bahan tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit akar senggugu yang diperoleh dari daerah Imogiri, Bantul Yogyakarta. Determinasi tumbuhan dilakukan oleh bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Bahan lainnya adalah pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol kualitas p.a., silika gel GF<sup>254</sup>, silika gel G 60 (70-230 mesh), plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dan stigmasterol standar 3 mg.

## Prosedur Penelitian

### Pembuatan serbuk dan ekstraksi

Kulit akar senggugu yang diperoleh dikeringkan pada suhu kamar (25-30°C) di ruang tertutup. Kulit akar kering dicacah sehingga diperoleh ukuran yang kecil-kecil. Selanjutnya digiling menggunakan mesin merk *Retsch Muhle* dan diayak dengan ayakan serbuk (4/18) di Laboratorium Biologi Farmasi UGM.

Serbuk kering kulit akar senggugu sebanyak 3 kg diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat mulai *n*-heksan, etil

asetat hingga metanol, masing-masing selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental secara berurutan disebut sebagai fraksi *n*-heksan 7,68 gram, fraksi etil asetat 52,20 gram dan fraksi metanol 523,92 gram. Pada fraksi etil asetat tersebut selanjutnya dilakukan fraksinasi.

### Fraksinasi

Fraksi etil asetat kulit akar senggugu sebanyak 30 gram difraksinasi menggunakan KCV dengan eluen *n*-heksan, etil asetat dan metanol secara bergradien untuk menyederhanakan pola noda pada hasil KLT fraksi etil asetat yang dilakukan sebelumnya. Hasil fraksinasi dikelompokkan sesuai dengan urutan kepolarannya berdasarkan hasil KLT dengan eluen *n*-heksan-etil asetat (8 : 2) menghasilkan 10 fraksi. Pada fraksi D sebanyak 1,33 gram yang diperoleh selanjutnya dilakukan isolasi senyawa menggunakan KKG (Kromatografi Kolom Garvitasi) dengan eluen *n*-heksan dan etil asetat secara bergradien.

### Isolasi dan pemurnian

Isolasi senyawa pada Fraksi D dilakukan menggunakan KKG dengan eluen *n*-heksan dan etil asetat secara bergradien pula. Hasil eluasi dari KKG ditampung dalam *vial* kemudian dipantau dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksan-etil asetat (9 : 1). Hasil isolasi dengan pola/nilai R<sub>f</sub> yang sama digabungkan sehingga diperoleh 8 fraksi, yaitu fraksi D1 (5 mg), D2 (6 mg), D3 (8 mg), D4 (7 mg), D5 (19 mg), D6 (18 mg), D7 (35 mg) dan D8 (902 mg). Fraksi D7 dimurnikan dengan cara rekristalisasi

menggunakan dua pelarut yang berbeda jauh kepolarannya dan tidak bercampur yaitu *n*-heksan dan metanol. Isolat murni dalam metanol selanjutnya disebut N1 diperoleh sebanyak 17 mg, sedangkan dalam heksan disebut N2 sebanyak 18 mg. Isolat tersebut diuji kemurniannya secara KLT dengan eluen *n*-heksan-etil asetat (7 : 3) dan *n*-heksan-kloroform (6 : 4) serta ditentukan titik leburnya. Selanjutnya identifikasi dan penentuan struktur senyawa hanya dilakukan pada isolat N1, karena isolat N2 tampak belum murni pada uji KLT.

### Identifikasi dan penentuan struktur senyawa

Identifikasi isolat N1 dilakukan dengan menggunakan teknik analisis spektroskopi yaitu analisis spektra  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ -NMR serta analisis spektrum GC-MS dibandingkan dengan data literatur. Selain itu, identifikasi senyawa isolat juga dilakukan dengan analisis KLT dalam sistem yang sama baik isolat N1 maupun isolat N2 dan senyawa steroid pembanding menggunakan stigmasterol standar.

Struktur senyawa ditentukan berdasarkan hasil analisis data spektra  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ -NMR serta data spektrum GC-MS. Kombinasi pembacaan dari seluruh hasil analisis data spektra yang ada kemudian dibuatlah rangkaian sebuah struktur senyawa yang utuh.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi dan penentuan struktur senyawa

Isolat N1 yang diperoleh berbentuk serbuk putih dengan titik lebur  $279\text{-}285^\circ\text{C}$ . Identifikasi isolat berdasarkan data spektra  $^1\text{H}$ -NMR menunjukkan adanya signal-signal proton yang khas pada kerangka

dasar karbon senyawa steroid. Proton H-3 cincin A steroid pada  $\delta\text{H}$  3,59 ppm (1H; *m*; 4,5 Hz) memperlihatkan adanya gugus -OH juga terikat pada C-3. Proton H-7 pada cincin B daerah  $\delta\text{H}$  5,15 ppm (1H; *q*; 5, 10 Hz) menunjukkan adanya ikatan rangkap dua pada C-7. Proton H-9 dan H-14 pada cincin C dan D masing-masing  $\delta\text{H}$  2,01 (1H; *t*; 5 Hz) dan  $\delta\text{H}$  2,02 (1H; *t*; 5 Hz) menunjukkan bahwa kedua proton tersebut *dicoupling* oleh dua proton yang berbeda pada karbon tetangga terdekat.

Selain itu, signal proton gugus metil dengan intensitas kuat diperlihatkan pada daerah alifatik yaitu proton H-18 dan H-19 menunjukkan pita *singlet* masing-masing pada  $\delta\text{H}$  0,53 ppm (3H; *s*) dan 0,55 ppm (3H; *s*). Proton lain adalah proton H-21 pada  $\delta\text{H}$  0,80 ppm (3H; *d*) dan proton gem dimetil H-26 dan H-27 pada pergeseran kimia yang sama yaitu  $\delta\text{H}$  0,79 ppm (3H; *d*; 5 Hz), memperlihatkan pita *doublet* dengan intensitas kuat menunjukkan adanya proton metil pada gugus alkil rantai samping pada senyawa steroid.

Spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR menunjukkan adanya signal C-3 pada  $\delta\text{C}$  71,27 ppm yang mengikat gugus hidroksil, memperlihatkan pergeseran kimia yang lebih tinggi dibandingkan karbon lainnya pada cincin A kerangka dasar steroid. Adanya karbon *olefin* (C=C) yaitu C-7 dan C-8 masing-masing pada  $\delta\text{C}$  130,23 ppm dan 139,76 ppm, memperlihatkan pergeseran kimia pada daerah yang jauh lebih *deshielded* dibandingkan karbon lainnya pada cincin B steroid. Data spektra karbon juga memperlihatkan adanya karbon *gem-dimetil* pada C-26 dan C-27 yang keduanya mempunyai pergeseran kimia yang sama yaitu  $\delta\text{C}$  19,18 ppm. Data ini memperkuat dugaan adanya gugus

alkil pada rantai samping senyawa steroid. Berdasarkan data spektra <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C-NMR yang diperoleh tersebut selanjutnya dilakukan perbandingan dengan data literatur yaitu β-sitosterol (Patra dkk., 2010; Kuncoro dkk., 2015) dan

stigmasterol (Raphael, 1991). Perbandingan data spektra proton dan karbon antara senyawa pembanding stigmasterol dan isolat N1 dapat dilihat pada tabel 1.

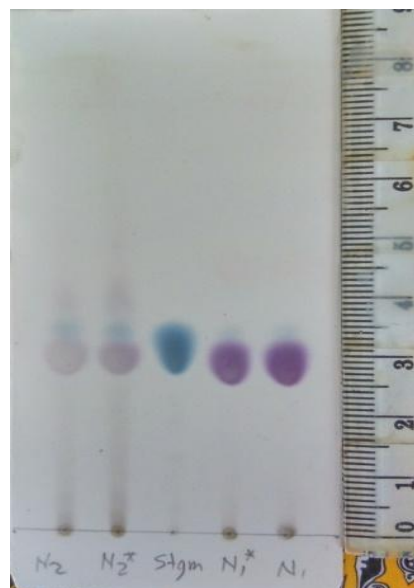
Tabel 1. Data spektra <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C-NMR Senyawa Pembanding Stigmasterol (Raphael, 1991) dan β-sitosterol (Patra dkk., 2010; Kuncoro dkk., 2015)

No C	δ <sup>13</sup> C (ppm)			δ <sup>1</sup> H (ppm)		
	Stigmasterol	Isolat N1	β-sitosterol	Stigmasterol	Isolat N1	β-sitosterol
1	37,31	37,32	37.28	1,29		1.47
2	31,69	31,65	31.69	1,69		1.56
3	71,81	71,27	71.82	3,71	3,59 (1H; <i>m</i> ; 4,5)	3.52
4	42,35	41,03	42.33	2,40		2.28
5	140,50	32,12	140.70	-	1,77 (1H; <i>m</i> ; 10)	-
6	121,69	32,06	121.72	5,30	1,74 (2H; <i>t</i> ; 5)	5.36
7	31,94	130,23	31.69	2,20	5,15 (1H; <i>q</i> ; 5;10)	2.03
8	31,94	139,76	31.93	1,56	-	1.67
9	50,20	51,43	50.17	0,96	2,01 (1H; <i>t</i> ; 5)	1.48
10	36,56	38,16	36.52	-	-	-
11	21,11	21,73	21.10	1,52		1.52
12	39,74	39,64	39.80	1,40		1.49
13	42,35	43,47	42.33	-	-	-
14	56,91	56,07	56.79	1,05	2,02 (1H; <i>t</i> ; 5)	1.50
15	24,39	23,21	24.37	1,56		1.60
16	28,96	28,70	28.25	1,69		1.84
17	56,06	55,31	56.09	1,53		1.49
18	12,07	12,2	11.86	1,02	0,53 (3H; <i>s</i> )	0.68
19	19,42	13,24	19.40	0,99	0,55 (3H; <i>s</i> )	1.02
20	40,54	40,44	36.52	2,22		1.64
21	21,11	21,29	18.79	0,89	0,80 (3H; <i>d</i> ; 5)	0.94
22	138,37	34,41	33.98	5,16	1,58 (2H; <i>m</i> ; 5)	0.88
23	129,32	26,40	26.14	5,10	1,39 (2H; <i>m</i> ; 5)	1.04
24	51,29	49,62	45.88	2,10		1.50
25	31,94	28,95	28.91	1,73		1.65
26	21,26	19,18	19.80	0,80	0,79 (3H; <i>d</i> ; 5)	0.83
27	19,02	19,18	18.79	0,80	0,79 (3H; <i>d</i> ; 5)	0.85
28	25,44	12,44	23.10	1,44		1.04
29	12,27	12,20	11.99	0,87	0,85 (3H; <i>t</i> ; 5)	0.88
30		OH(pada posisi C-3)		2,42	2,05 (1H; <i>s</i> )	2,00

\*

Data spektra  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ -NMR pada tabel 1 memperlihatkan bahwa isolat N1 menunjukkan data pergeseran kimia yang mirip dengan data literatur baik  $\beta$ -sitosterol maupun stigmasterol. Namun, beberapa pergeseran kimia proton dan karbon tertentu berbeda karena posisi ikatan rangkapnya yang berbeda antara kedua senyawa tersebut. Senyawa isolat N1 mempunyai karbon *olefin* ( $\text{C}=\text{C}$ ) pada posisi C-7 dan C-8, sedangkan  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol masing-masing pada C-5 dan C-6 serta C-22 dan C-23 pada stigmasterol. Karena itu, menyebabkan perbedaan pergeseran kimia proton yang terikat pada tiap karbon tersebut sebagaimana ditunjukkan tabel 1. Menurut Manitto (1980), bahwa perbedaan diantara senyawa steroid ditentukan oleh panjang rantai karbon R pada C-17, gugus fungsi yang terdapat pada substituen R serta jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap.

Analisis data spektra proton dan karbon antara senyawa perbandingan dan senyawa isolat N1 membuktikan bahwa keduanya merupakan senyawa steroid, meskipun diduga kuat jenisnya berbeda. Hal ini karena beragamnya variasi struktur senyawa steroid dari bahan alam. Perbedaan jenis steroid pada senyawa perbandingan dan isolat juga dibuktikan dari hasil analisis KLT eluen *n*-heksan-etil asetat (7 : 3) dan penampak noda *anisaldehida* seperti ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. KLT isolat N1, N1\*(*recovery* NMR), Stgm (stigmasterol), N2\*(*recovery* NMR) dan N2, eluen *n*-heksan-etil asetat (7 : 3) dan penampak noda *anisaldehida*

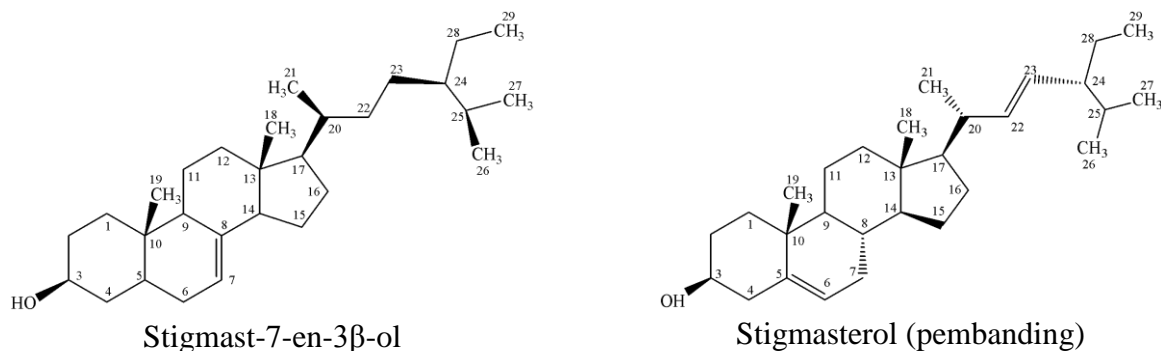
Hasil KLT pada gambar 1 memperlihatkan bahwa isolat N1 dan senyawa perbandingan stigmasterol mempunyai pola noda dan  $R_f$  yang sama yaitu 0,33. Namun, respon warna yang diberikan oleh keduanya dengan penggunaan penampak noda *anisaldehida* menunjukkan warna yang berbeda. Isolat N1 berwarna ungu, sedangkan perbandingan stigmasterol berwarna biru. Hal ini menunjukkan bahwa isolat N1 dan stigmasterol keduanya merupakan senyawa golongan steroid, tetapi jenis steroidnya yang berbeda. Isolat N1 larut sempurna dalam kloroform dengan titik lebur  $138-141^\circ\text{C}$ .

Analisis data GC-MS isolat N1 menunjukkan bahwa massa ion molekuler isolat N1 pada spektrum MS adalah 414 dengan rumus molekul  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ . Fragmentasi massa isolat ( $m/z$ ) adalah 414, 314, 271, 255, 231, 207, 173, 147,



107, 91 dan 55. Data GC-MS senyawa pembandingan stigmasterol (m/z) adalah 412 (Raphael, 1991). Oleh karena itu, berdasarkan hasil analisis data spektra proton dan karbon serta spektrum massa menunjukkan bahwa isolat N1 merupakan senyawa Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol. Hasil penelusuran literatur khususnya steroid

dari *C. Serratum* yang sudah dilaporkan menunjukkan bahwa Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol adalah jenis steroid baru yang dilaporkan dari *C. Serratum* pada penelitian ini. Struktur senyawa Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol dan senyawa stigmasterol sebagai pembandingan ditunjukkan pada gambar 2 berikut.



Gambar 2. Struktur Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol dan Stigmasterol (Pembandingan)

## KESIMPULAN

Senyawa steroid yang dapat diisolasi dari kulit akar senggugu asal imogiri Yogyakarta merupakan jenis steroid baru yang dilaporkan dari tumbuhan ini adalah Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol. Untuk mengetahui efek farmakologi senyawa tersebut sehingga bisa dimanfaatkan dalam pengobatan, selanjutnya perlu dilakukan pengembangan uji aktivitas senyawa yang sesuai.

## Ucapan Terima Kasih (Acknowledgment)

Ucapan terima kasih kepada Dirjend Dikti Kemenristek RI yang telah memberikan biaya berupa BPPDN dalam mengikuti program pascasarjana S3 Ilmu Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

## DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee, S.K., Chakravarti, R.N., Sachdev, K.S., dan Vasavada, S.A., 1969, Constituents of root bark of *Clerodendrum serratum*, *Phytochemistry*, 8, 515.
- Bhawani, S.A., Sulaiman, O., Hashim, R., dan Ibrahim, M.N.M., 2011, Thinlayer chromatographic analysis of steroids., *Trop J Pharm Res.*, 9, 301-313.
- Boonsri, S., 2003, Chemical Constituents from *Clerodendrum serratum* and *Mesua kunstleri*.
- Choi, J.M., Lee, E.O., Lee, H.Y., dkk., 2007, Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities., *Phytother Res.*, 21, 954-959.
- Fan, Ju-di., Long, Qing-de., Yang, J., Luo, dan Xi-rong., 2007, Studies on the chemical constituents of

- Clerodendrum serratum* (L.) Moon., *Medical Journal of Chinese People's Health*, 19, 423.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., *dkk.*, 2010, Stigmasterol: a phytosterol with potential anti osteoarthritic properties., *Am J Clin Nutr.*, 18, 106-116.
- Heyne, K., 1950, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Jilid III Ed. I, 1686, Penerbit Yayasan Sarana Wanarja, Jakarta.
- Kardong, D., Upadhyaya, S., dan Saikia, L.R., 2012, Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial Activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn., *J Pharm Res.*, 5(11), 5194-5196.
- Kuncoro, H., Farabi, K, Julaeha, E., Rijai, L., dan Supratman, U., 2015, Stigmast-5(6)-en-3-ol dari herba tumbuhan krokot (*Lygodium microphyllum*), *Jurnal Kimia VALENSI*, 1(1), 50-54.
- Manitto, P., 1981, *Biosynthesis of natural products*, Terjemahan Dra. Koensoemardiyah Apt, SU., Penerbit IKIP Semarang Press. Semarang-Indonesia.
- Nair, A.G.R., Vedantham, T.N.C., dan Subramanian, S.S., 1976, Crystalline components of *Clerodendrum serratum*, *Current Science*, 45, 391.
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, dan Asmah, R., 2015, Uji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kulit akar senggugu (*Clerodendrum serratum* L. Moon) asal Imogiri Yogyakarta, *Prosiding Semnas Peluang Herbal Sebagai Alternatif Medicine Fak. Farmasi Univ. Wahid Hasyim*, ISBN: 978-602-19556-2-8, 12-117.
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, dan Asmah, R., 2015, Hepatoprotective activity of ethyl acetate fraction of senggugu's root bark (*Clerodendrum serratum* L. Moon) on rats induced by carbon tetrachloride, *Indonesian J. Pharm.*, 28(1), 10-18.
- Panda, S., Jafri, M., Kar, A., dan Meheta, B.K., 2009, Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma.*, *Fitoterapia*, 80, 123-126.
- Patra, A., Jha, S., Murthy, P.N., Manik, dan Sharone, A., 2010, Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders., *Int. J. of Pharma Sci. and Res.*, 1(2), 95-100.
- Samejo, M.Q., Memon, S., Bhangar, M.I., dan Khan, K. M., 2013, Isolation and characterization of steroids from *Calligonum polygonoides.*, *J. Pharmacy Res.*, 6, 346-349.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., dan Latha, L.Y., 2011, Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts., *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 8(1), 1-10.
- Singh, M.Kr., Khare, G., Iyer, S.Kr., Sharwan, G., dan Tripathi, D.K., 2012, *Chelerodendrum serratum*: A clinical aproach, *J. Aplied Pharmaceutical Sci.*, 2(2), 11-15.



Raphael, I., 1991, *Natural Products: A laboratory guide*, second edition,

Academic Press Limited, United States of America.