

## Isolasi Steroid Dari Fraksi Etil Asetat *Hedyotis Philippensis*

Susilawati

Laboratorium Pendidikan Kimia Jurusan Pendidikan MIPA FKIP  
Universitas Riau Pekanbaru 28293

Diterima 7 April 2003    Disetujui 20 Juni 2003

### Abstract

Chemical constituent has been isolated from the dry aerial parts of *Hedyotis philippensis*. The finely chopped material was extracted with methanol then fractionated into different polarity of solvent; hexane, ethyl acetate and butanol. Needled colorless (Melting point 140-142<sup>o</sup>C) has been isolated from Ethyl acetate fraction and based on its spectroscopic data particularly IR (Infra red) and <sup>1</sup>H-NMR (Proton of Nuclear Magnetic Resonance), it is identified as stigmasterol.

Key words: *Hedyotis philippensis*, steroid, stigmasterol

### Pendahuluan

Senyawa hasil metabolisme sekunder dari berbagai jenis tumbuhan telah banyak diteliti dan sering senyawa kimia tersebut dapat memberikan efek fisiologis dan farmakologis. Senyawa kimia tersebut dikenal sebagai senyawa kimia aktif seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, dan lain-lain. (Rusdi, 1988)

Mengingat pentingnya senyawa-senyawa kimia aktif yang berasal dari tumbuhan dalam bidang pengobatan maka perlu dilakukan suatu penelitian yang sistematis untuk mendapatkan senyawa-senyawa dari tumbuhan-tumbuhan baru. Dalam penelitian ini akan diisolasi kandungan kimia dari *Hedyotis philippensis*, dimana berdasarkan penelusuran literatur dengan Nafralart dan Agricola belum ada informasi dilaporkan tentang tumbuhan ini walaupun untuk spesies lain yang satu genus sudah banyak diteliti. Sedangkan tumbuhan species ini telah digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat di Malaysia sebagai obat disentri, sakit perut dan gonorrhoea (Burkill, 1966) Satu-satunya penelitian tentang spesies ini dilakukan oleh Susanti, (2000), yang hanya menemukan satu senyawa yaitu asperulosida (iridoid glikosida) dari fraksi butanol *H. philippensis* yang berasal dari contoh tumbuhan yang dikumpulkan dari hutan

pulau Siberut di kepulauan Mentawai Sumatera Barat.

Uji bioaktivitas antimikroba yang dilakukan terhadap ekstrak metanol *H. philippensis* yang ditemukan di daerah geografis dan iklim berbeda yaitu hutan Kelok Sembilan kab. 50 Kota Sumatera Barat oleh Arbain, dkk ternyata memperlihatkan aktivitas antimikroba yang nyata. Dari uji fitokimia pendahuluan diketahui adanya senyawa terpenoid, steroid dan saponin dari ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol tumbuhan *H. philippensis* ini. Berdasarkan data diatas penulis tertarik untuk meneliti lebih lanjut yaitu mengisolasi senyawa steroid dari fraksi etil asetat *H. philippensis* ini.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa steroid dari fraksi etil asetat *H. philippensis* dan mengelusidasi struktur molekulnya dengan analisa spektroskopi UV, IR, <sup>1</sup>H-RMI.

Kontribusi penelitian adalah untuk memberi informasi tentang kandungan kimia tumbuhan *H. philippensis* dan diharapkan dapat memberikan sumbangan positif dalam pengembangan kimia organik bahan alam.

*Hedyotis philippensis* (Wild ex Spreng) Merr. ex C.B. Robinson tergolong kedalam famili Rubiaceae yang merupakan famili besar dan tersebar luas di seluruh kawasan terutama

kawasan tropika. Genus *Hedyotis* terdiri dari kira-kira 100 species, berupa tumbuhan herba, tumbuhan semak kecil yang kadang-kadang memanjat. *Hedyotis philippensis* merupakan herba besar yang bercabang lebar, penyebarannya dihutan rindang dengan ketinggian 150-600 m diatas permukaan laut (Backer, *et al.*, 1963)

*Hedyotis philippensis* mempunyai nama lain yaitu *Oldenlandia prostata* (Bl) O.K dan *Hedyotis prostata* Bl. (Backer, *et al.*, 1963), *Hedyotis congesta* dan *Hedyotis rigida*. Nama daerah dari tumbuhan ini di Indonesia khususnya di Sumatera Barat dan Riau tidak ditemukan, tetapi di Malaysia namanya adalah Sebueh (menunjukkan buih/busu), Lidah jin (Devil's tongue), Bunga kakarang (Syphilis flower) dan Ubat sumpu pucat/ sumpu puchut (obat anemia) (Burkill, 1966).

Sejarah penemuan steroid bermula dari penelitian terhadap sterol dan dilanjutkan dengan asam empedu. Pada waktu itu belum dimengerti kegunaan penelitian ini sampai akhirnya diketahui bahwa kebanyakan hormon dan beberapa vitamin berintikan kerangka steroid (Miller, 1973). Contoh stigmasterol merupakan materi pemula untuk sintesis hormon estrogen melalui koversi terlebih dahulu menjadi androstadienedion dan estron. Estrogen adalah hormon pada wanita yang mempengaruhi pertumbuhan dan sirkulasi darah dari uterus, vagina dan kelenjer air susu. Karena itu estrogen kemudian digunakan bersama dengan gestagen sebagai kombinasi agen kontrasepsi. (Elvers, 1989)

Steroid mempunyai kerangka dasar siklopentano perhidro fenantren. Klasifikasi steroid berdasarkan aktivitas fisiologisnya dapat dikelompokkan menjadi sterol, asam-asam empedu, hormon sex, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak dan sapogenin (Manitto, 1981). Sterol alam selalu mempunyai gugus hidroksi pada posisi C<sub>3</sub> pada cincin A dan rantai samping C<sub>17</sub> serta kadang-kadang berikatan rangkap pada posisi 5-6, contoh : stigmasterol,  $\alpha$ -sitosterol, dan lain-lain (Robinson, 1995)

Beberapa species dari *Hedyotis* telah diteliti kandungan kimianya maupun Bioaktivitasnya. Kandungan kimia dari genus

*Hedyotis* pada umumnya adalah monoterpenoid (iridoid), triterpenoid, steroid, saponin, flavonoid, alkaloid dan antrakuinon

Konstituen dari *Hedyotis diffusa* telah dilaporkan sebagai iridoid glikosida, asperulosida, 6-O-p kumaroil skandosida metil ester, 6-O-p metoksisinamoil skandosida metil ester, 6-O-p feruloil skandosida metil ester, 2-metil-3-hidroksi 9,10-antrakuinon, 2-metil-3-metoksi 9,10-antrakuinon, 2-metil-3-hidroksi-4-metoksi 9,10-antrakuinon dan kuersetin-3-soforosida (Nishihama *et al.*, 1981, Wu *et al.*, 1991, Kim *et al.*, 1998 dan Lu *et al.*, 2000). Tumbuhan ini dilaporkan mempunyai aktivitas immunopotensiasi dan telah digunakan di Cina untuk percobaan kanker (Nishihama *et al.*, 1981, Wu *et al.*, 1991). Sitotoksik membimbing fraksinasi ekstrak metanol dari *Hedyotis diffusa* ke isolasi asam ursolat. Asam ursolat menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap proliferasi kultur sel tumor seperti A-459 (paru-paru manusia), SK-OV-3 (ovarium), SK-MEL-2 (kulit), XF-498 (otak), HCT-15 (kolon), SNU-1 (perut), L-01210 (murina leukimia) dan B-16-F-0 (murina melanoma) (Kim *et al.*, 1998).

Dalam laporan lain, triterpenoid, saponin, alkaloid hediotin dan alkaloid bis indol, aurikularina telah diisolasi dari *Hedyotis auricularia*. Tumbuhan ini digunakan sebagai obat tradisional di India dan Srilanka untuk diare dan disentri (Purushothaman *et al.*, 1981 dan Bankum, 1971).

#### Bahan dan Metode

Bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini adalah : seluruh bagian tumbuhan *H. philippensis* (diambil di hutan cagar alam Kelok Sembilan kab. 50 Kota Sumatera Barat), aquades, metanol, heksana, etil asetat, butanol, natrium sulfat, logam magnesium, asam klorida pekat (Merck), pereaksi Dragendorf, asetat anhidrida, asam sulfat pekat (Merck), besi(III) klorida, plat KLT Kieselgel GF<sub>254</sub> (Merck), silika gel 60 (Merck) (230-400 mesh), Iodium. alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, seperangkat alat destilasi biasa dan vakum dengan berbagai ukuran, rotari evaporator, timbangan analitik, oven listrik, kolom kromatografi dengan berbagai

ukuran, kertas saring, camber KLT, lampu UV<sub>254</sub> model UVGL-54, Fisher Johns melting point apparatus, Spektrofotometer UV<sub>vis</sub> Secoman. S 1000, Spektrofotometer IR Perkin Elmer dan lain-lain.

### Prosedur Kerja

#### 1. Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa

Sebanyak 2,2 kg sampel tumbuhan *H. philippensis* yang telah dikeringkan selama beberapa hari dipotong kecil-kecil dan dimaserasi dengan metanol kemudian disimpan ditempat yang terlindung cahaya matahari selama 5 hari sambil sekali-sekali dikocok. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan sari metanol dari ampasnya. Perlakuan ini diulangi sampai 4 kali dan filtratnya digabung menjadi satu.

Sari metanol yang terkumpul diuapkan pelarutnya *in vacuo* sehingga diperoleh 2 L sari metanol kental, kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotari evaporator sehingga diperoleh 90 gram ekstrak metanol kering.

Ekstrak kering metanol dilarutkan dengan 300 ml metanol dan ditambahkan aquades 700 ml sambil dikocok. Selanjutnya difraksinasi berturut-turut dengan heksana 4 x 400 ml, dengan etil asetat 4 x 400 ml dan dengan butanol 8 x 400 ml untuk memisahkan fraksi-fraksi yang non polar, semi polar dan polar.

#### 2. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Penentuan jumlah komponen senyawa dalam setiap fraksi dapat dilakukan dengan cara melarutkannya dengan pelarut yang cocok kemudian di KLT dengan beberapa pelarut (heksana, etil asetat dan metanol dengan beberapa perbandingan). Kromatogram hasil elusi dilihat dibawah lampu UV/ uap Iodium. Fraksi etil asetat seberat 7,4 gram dilanjutkan ke kromatografi kolom dengan mensuspensikan 150 gram silika gel dengan heksana, kemudian dimasukkan kedalam kolom yang bagian bawahnya telah diberi kapas. Pelarut yang ada dalam kolom dibiarkan mengalir perlahan-lahan sambil diketok sehingga diperoleh massa yang homogen.

Fraksi etil asetat dipreabsorpsi dengan cara menambahkan etil asetat sampai semua sampel larut, lalu ditambahkan silika gel 7,4 gram kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotari evaporator sampai kering. Hasil preabsorpsi dimasukkan kedalam kolom, selanjutnya dielusi dengan pelarut heksana yang kemudian dinaikkan kepolarannya dengan menambahkan etil asetat sampai metanol secara bertahap (sistem SGP) dengan volume setiap perbandingan 300 ml

Fraksi yang turun ( $\pm 15$  ml) ditampung dengan vial-vial kosong. Eluat kromatografi kolom didapatkan 344 vial yang kemudian dimonitor dengan KLT dengan eluen yang sesuai. Vial 10-15 setelah kering mengkrystal seperti jarum, setelah dicek dengan KLT dengan eluen heksana etil 8 : 2 ternyata memberikan Rf yang sama. Kemudian digabung dan diuapkan pelarutnya dan didapat kembali kristal jarum pada dinding dan dasar vial. Selanjutnya dilakukan rekristalisasi dengan khloroform heksana. Kemudian di KLT dengan beberapa eluen nodanya tetap 1, maka didapat senyawa murni.

Kristal ini diuji dengan berbagai pereaksi untuk menentukan golongan senyawa seperti pereaksi Dragendorff untuk alkaloid, pereaksi Lieberman-Burchard untuk triterpenoid/steroid, pereaksi Mg/HCl untuk flavonoid dan pereaksi FeCl<sub>3</sub> untuk fenolik.

Terhadap kristal hasil isolasi dilakukan pengukuran titik leleh dan pengambilan spektrum UV(Ultra Violet), IR (Infra Merah) dan <sup>1</sup>H-RMI (Resonansi Magnet Inti Proton).

### Hasil dan Pembahasan

Isolasi senyawa metabolit sekunder dari *H. philippensis* ini menggunakan sampel kering agar kadar airnya seminimal mungkin. Pada penelitian ini ekstraksi terhadap sampel dilakukan secara maserasi (perendaman) dengan metanol pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Ini dilakukan karena sifat senyawa yang akan diisolasi belum diketahui sehingga dapat menghindari kemungkinan terjadinya penguraian zat aktif oleh pemanasan.

Hasil pemeriksaan metabolit sekunder dari *Hedyotis philippensis* memperlihatkan adanya senyawa-senyawa yang positif dengan pereaksi Lieberman Burchard, yaitu triterpenoid (violet), steroid (biru) dan adanya busa setelah dikocok dengan air yaitu saponin (glikosida triterpenoid dan steroid).

Fraksinasi dengan pelarut berdasarkan kepolarannya seperti dengan heksana, etil asetat dan butanol adalah untuk memperoleh fraksi yang non polar, semi polar dan polar. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dari sampel tumbuhan *H. philippensis* seberat 2,2 kg diperoleh fraksi heksana berwarna hijau kehitaman seberat 25,816 g, fraksi etilasetat berwarna coklat kehitaman seberat 12,65 g dan fraksi butanol berwarna coklat kemerahan seberat 20,315 g. Fraksi heksana tidak dilanjutkan ke kromatografi kolom karena banyak mengandung klorofil yang sulit dipisahkan.

Hasil isolasi dari 7,4 gram fraksi etilasetat diperoleh senyawa murni sebanyak 22,5 mg berupa kristal jarum berwarna putih dengan titik leleh 140-142°C. Kristal hasil isolasi ini dengan KLT silika gel memberikan noda tunggal dengan eluen heksana : etil asetat (9:1) Rf 0,35, dengan heksana : etil asetat (8:2) Rf 0,61 dan heksana : etil asetat (1:1) Rf 0,73. Sedangkan dengan heksana : diklorometan (4:6) Rf 0,46, heksana : diklorometan (3,5:6,5) Rf 0,5 dan heksana : diklorometan (2:8) Rf 0,82. Noda ini tidak nampak dibawah lampu UV. Uji kristal ini dengan pereaksi Lieberman Burchard menunjukkan warna biru muda yang merupakan uji positif terhadap steroid.

Pemurnian senyawa organik dilakukan dengan teknik rekristalisasi karena senyawa organik yang diperoleh membentuk zat padat (kristal/amorf) jika pelarutnya telah menguap. Cara mencek kemurnian kristal setelah rekristalisasi adalah jika memberikan noda tunggal dengan KLT dengan beberapa eluen dan titik lelehnya mempunyai range yang sempit. Senyawa hasil isolasi memberikan noda tunggal dengan KLT dengan beberapa eluen. Senyawa hasil isolasi mempunyai titik leleh 140-142°C, berarti senyawa tersebut telah murni.

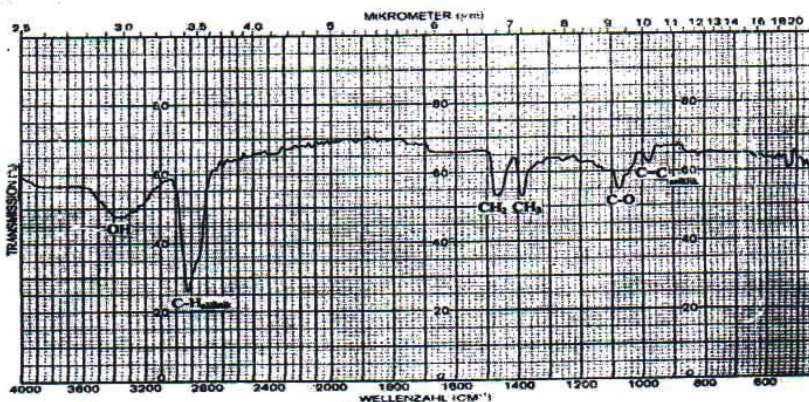
Spektrum IR<sub>(KBr)</sub> senyawa hasil isolasi (Gambar 1.) memberikan serapan pada bilangan

gelombang 3365, 2925, 1470, 1390, 1075 dan 980 cm<sup>-1</sup>. Spektrum <sup>1</sup>H-RMI (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Gambar 2.) memperlihatkan adanya pergeseran kimia pada  $\delta$  5,36 (d, 1H, J=5), 5,18 (dd, 1H), 5,04 (dd, 1H), 3,53 (m, 1H) dan pada  $\delta$  0,69-2,30 ppm, termasuk didalamnya pada 1,01 ppm (s, 6 H)

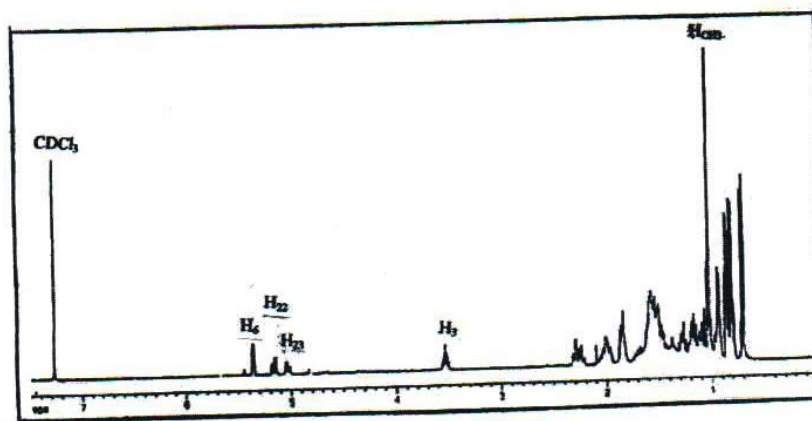
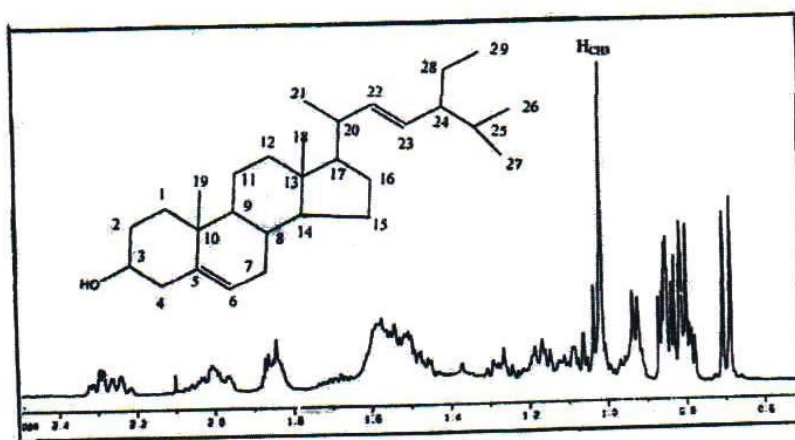
Spektrum IR dapat menentukan gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik yang mempunyai bilangan frekuensi spesifik. Analisis spektrum IR<sub>(KBr)</sub> senyawa hasil isolasi memperlihatkan adanya serapan pada angka gelombang 3365 cm<sup>-1</sup> yang merupakan regang OH, didukung oleh munculnya pita serapan pada 1075 cm<sup>-1</sup> yang merupakan pita serapan C-O. Adanya serapan pada 2925 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya regang C-H alifatik yang diperkuat oleh vibrasi ulur C-H dari CH<sub>2</sub> pada 1470 cm<sup>-1</sup> dan vibrasi ulur C-H dari CH<sub>3</sub> pada 1390 cm<sup>-1</sup> yang juga merupakan ciri khas adanya gugus metil. Serapan pada 980 cm<sup>-1</sup> merupakan pita serapan dari ikatan rangkap 2 disubstitusi asiklik.

Analisis spektrum <sup>1</sup>H-RMI (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) senyawa A adalah : sinyal singlet pada  $\delta$  7,27 ppm berasal dari proton pelarut CDCl<sub>3</sub>, sinyal doublet pada  $\delta$  5,36 ppm (J = 5 Hz) berasal dari proton H<sub>6</sub> yang dikoupling oleh proton H<sub>7</sub>. Sinyal doublet ganda (dd) pada  $\delta$  5,18 ppm berasal dari H<sub>22</sub> yang dikoupling oleh 2 proton dengan lingkungan kimia yang berbeda yaitu H<sub>20</sub> dan H<sub>23</sub> vinilik. Sinyal doublet ganda pada  $\delta$  5,04 ppm berasal dari H<sub>23</sub> yang dikoupling oleh H<sub>22</sub> dan H<sub>24</sub>. Sinyal multiplet pada  $\delta$  3,53 ppm berasal dari H<sub>3</sub> yang dikoupling oleh H<sub>2</sub> dan H<sub>4</sub>. Sinyal singlet yang paling tinggi pada  $\delta$  1,01 ppm berasal dari proton 2 gugus CH<sub>3</sub> yang merupakan ciri khas senyawa steroid dimana mempunyai 2 gugus metil pada C<sub>18</sub> dan C<sub>19</sub>. Proton metil tersier ini biasanya memberikan sinyal di daerah  $\delta$  0,83-1,15 ppm. Analisis spektrum <sup>1</sup>H-RMI diatas memperlihatkan bahwa spektrum tersebut sama dengan spektrum <sup>1</sup>H-RMI senyawa stigmasterol standar (Aldrich), khususnya sinyal pada  $\delta$  5,18 ppm dan 5,04 ppm yang muncul sebagai sinyal doublet ganda (dd), yang berasal dari H<sub>22</sub> dan H<sub>23</sub> vinilik.

Lampiran 5. Spektrum Infra merah (IR<sub>(KBr)</sub>) senyawa A



Gambar 1. Spektrum Infra Merah (IR<sub>(KBr)</sub>) Senyawa Hasil Isolasi

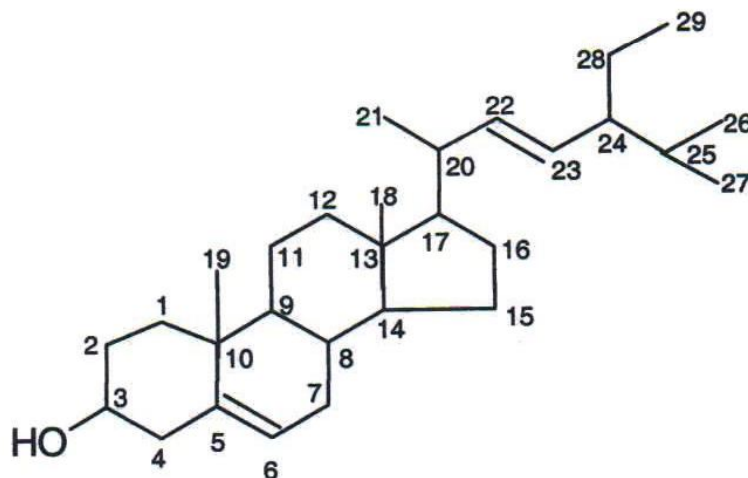


Gambar 2. Spektrum <sup>1</sup>H-RMI (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Senyawa Hasil Isolasi

Dengan membandingkan data spektrum IR dan  $^1\text{H-NMR}$  senyawa hasil isolasi dengan senyawa stigmasterol standar (Aldrich) diatas maka dapat dinyatakan bahwa senyawa hasil isolasi adalah golongan steroid yaitu stigmasterol dengan rumus molekul  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ . (gambar 3).

Spektrum UV memberikan informasi tentang adanya ikatan rangkap yang berkonjugasi dan membedakan senyawa aromatik dengan

senyawa alifatik rantai jenuh. Spektrum UV senyawa hasil isolasi (stigmasterol) tidak dapat diperlihatkan disini karena serapannya terlalu rendah/kecil. Berdasarkan literatur diperoleh data bahwa  $\lambda_{(\text{EtOH max})}$  nya = 204 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,58$ ). Stigmasterol mempunyai 2 ikatan rangkap yang terisolasi sehingga serapan UV jauh tidak bisa diukur dengan spektrofotometer biasa. (Ikan, 1969)



Gambar 3. Struktur molekul stigmasterol

## Kesimpulan dan Saran

### Kesimpulan

Berdasarkan analisa data yang diperoleh dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut :

1. Dari hasil pemeriksaan metabolit sekunder *H. philippensis* ditemukan adanya senyawa terpenoid, steroid dan saponin
2. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dari 2,2 kg tumbuhan *H. philippensis* diperoleh fraksi heksana (hijau kehitaman) 25,816 g, fraksi etilasetat (coklat kehitaman) 12,65 g dan fraksi butanol (coklat kemerahan) 20,315 g
3. Dari fraksi etil asetat *H. philippensis* diperoleh senyawa steroid yaitu stigmasterol berupa kristal jarum berwarna putih dengan Tl 140-142°C berdasarkan data IR dan  $^1\text{H-NMR}$

RMI yang dibandingkan dengan standar (Aldrich)

### Saran

Disarankan untuk melanjutkan penelitian ini :

- Menguji aktivitas antimikroba senyawa hasil isolasi dari *Hedyotis philippensis* dan menentukan konsentrasi hambat minimumnya (KHM)nya.
- Melakukan uji aktivitas farmakologi terhadap senyawa hasil isolasi, karena berdasarkan kontak person, ternyata ekstrak metanol *H. philippensis* ini mempunyai aktivitas parasimpatomimetik, penekanan susunan syaraf pusat, simpatolitik dan relaksasi otot
- Melakukan hidrogenasi selektif terhadap stigmasterol hasil isolasi menjadi  $\alpha$ -sitosterol

( $\beta$ -sitosterin, sito-lande<sup>R</sup>) untuk menurunkan kolesterol dalam darah.

### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Dayar Arbain, Apt yang telah ikut mendanai penelitian ini dengan proyek Hibah WaPres RI 2001, kepada Drs. Rusdi Tamin atas bantuan identifikasi tumbuhan dan literatur, kepada Drs. Hilwan Yuda Teruna, MSi dan Prof. Peter Waterman yang telah membantu pengambilan spektrum di Southern Cross University, Australia.

### Daftar Pustaka

- Backer, C. A. and Bachuizen Van Den Brink, R. C., 1963, *Flora of Java*, vol 1, N. V. P. Noordhoff, Netherlands, 284-288
- Bankum, D. S., Gupta, N. C., Satish, S., Sharma, S.C., Shunkla, Y. N., Tandon, J. S., 1971, Steroid and Triterpenoid from *Hedyotis auricularia* Linn, *Phytochem.*, 10, 2247
- Burkill, I. H., 1966, A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula, Crown Agents, London Vol 1 and 2, 1148-1150
- Corner, E. J. H., 1988, *Wayside Trees of Malaya*, vol 2, ed 3, Kuala Lumpur, 621-622, 641-643
- Elvers, B., Hawkins, S., Ravenscroft, M., Sculz, G., 1989, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chem., vol A<sub>3</sub>, VCH Publisher, Wenheim, Germany, 108-119
- Hamzah, A. S., Aimi, N. and Lajis, N. H., 1996, Constituent of *Hedyotis herbacea*, *Biochem. Systematics and Ecol.*, 24, 273
- Ho, T. L., Gen, P. C., Yuan, C. L., Yuh, M. L. and Chen, F. C., 1986, An Antraquinone from *Hedyotis diffusa*, *Phytochem.*, 25, 1988-1989
- Ikan, R., 1969, *Nat. Prod. A Laboratory Guide*, Academic Press, London, New York, San Fransisco, 104-114
- Kim, S. H., Ahn, B. Z and Ryu, S. Y., 1998, Antitumor Effect of Ursolic Acid Isolated from *Oldenlandia diffusa*, *Phytotherapy Research*, 12, 553-556
- Lu, C. M., Yang, J. J., Wang, P. Y. and Lin, C. C., 2000, A New Acylated Flavonol Glycoside and Antioxidant Effects of *Hedyotis diffusa*, *Planta Med.*, 66, 374-376
- Manitto, P., 1980, *Biosynthesis of Natural Products*, John Wiley & Sons, New York, 316-323
- Miller, L. P., 1973, *Phytochemistry, Organic Metabolit*, Vol 2, Van Nostrand Reinhold Company, New York
- Nishihama, Y., Masuda, K., Yamaki, M., Takagi, S. and Sakina, K., 1981, Three New Iridoid Glucosides from *Hedyotis diffusa*, *Planta Med.*, 43, 28-33
- Puroshothaman, K. K. and Sarada, A., 1981, Structure of Auricularine, A Bis-indole Alkaloid from *Hedyotis auricularia*, *Phytochemistry*, 20, 351-352
- Rusdi, 1988, *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*, Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang, hal 3-19
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, ed 6, ITB, Bandung, 154-158
- Silverstein, R. M., 1993, *Spectrometric Identificatin Organic Compounds*, John Wiley and Sons, Inc, ed 5, 85-89, 158-164, 262-264
- Susanti, D., 2000, *Kajian Kimia dan Bioaktivitas 3 Spesies Tumbuhan Rubiaceae*, MSc Thesis, Fak. Sains, UTM, Malaysia, 11-108
- Wu, H., Tao, X., Chen, Q. and Lao, X., 1991, Iridoids from *Hedyotis diffusa*, *J. Nat. Products*, 54, 254-256