

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA STEROID DARI DAUN CEMARA NATAL (*Cupressus funebris* Endl.)

Suryelita^{1)*}, Sri Benti Etika²⁾, Nivi Suci Kurnia³

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Padang

email :suryelita@yahoo.com, sribentietika67@gmail.com, nivisucikurnia15@gmail.com

ABSTRACT

The aims of this research is to isolate and characterize steroids from cemara natal leafs (*Cupressus funebris* Endl). Isolation of this leafswas done by using colum chromatography with Step Gradient Polarity (SGP) on n-hexsane fraction. The characterization of the isolation compound results were melting point, Liberman Burchard reagent (LB), Br₂/CCl₄ reagent, UV spectroscopy, and IR spectroscopy. The isolation results from 4 Kg leafs was obtained 0.3726 gram (0.01% ^{w/w}) of pure white needle-shaped crystalline with the melting point of 139,4°C. This pure crystalline was identified as steroids compound by *Lieberman-Burchard* (LB) reagentgives greenish-blue color indicates (+) steroids. By using /CCl₄ reagent this steroids showed double bond character. This double bond character was identified non conjugated double bond (max 203 nm) by using UV spectroscopy. IR spectroscopy results showed of fungsional groups O-H, C=C, and C-H.

Keywords : *Isolation, characterization, steroids*

PENDAHULUAN

Cupressus funebris Endl.(*C. funebris* Endl.)dikenal di Indonesia dengan nama cemara natal. Tanaman ini merupakan salah satu varietas dari genus cemara (*Cupressus*) yang keberadaannya tersebar luas.Di Indonesia tanaman ini dimanfaatkan sebagai tanaman hias, namun di Cina tanaman ini telah digunakan sebagai salah satu bahan obat tradisional.Bagian buah dan kulit batang dimanfaatkan untuk menghasilkan minyak esensial yang berfungsi sebagai pestisida, antijamur, antiinflamasi dan antibakteri

[1].Daun tanaman dimanfaatkan untuk membantu menghentikan pendarahan, disentri dan mengobati luka bakar [2].

Tumbuhan yang digunakan sebagai bahan baku obat berkaitan erat dengan kandungan kimia yang terdapat di dalamnya terutama senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan umumnya merupakan senyawa metabolit sekunder [3].Metabolit sekunder adalah senyawa-senyawa hasil biosintetik turunan dari metabolit primer yang diproduksi oleh organisme melalui metabolisme sekunder.Contoh dari metabolit sekunder adalah flavonoid,

alkaloid, terpenoid, steroid, danlain-lain [4].

Beberapa fungsi senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid pada tanaman kebanyakan berperan dalam memberi warna daun dan bunga. Alkaloid pada tumbuhan berfungsi untuk melindungi diri karena bersifat racun bagi organisme lain. Minyak atsiri yang tergolong senyawa terpenoid berfungsi memberi aroma khas pada tumbuhan. Steroid pada tumbuhan ada yang memiliki fungsi untuk menghambat penuaan daun sehingga daun tidak cepat gugur, sedangkan steroid pada hewan pada umumnya dijumpai dalam bentuk hormon yang salah satu fungsinya berpengaruh dalam pertumbuhan dan perkembangbiakan [5].

Penelitian yang telah dilakukan terhadap tanaman *C. funebris* Endl. yaitu pada bagian kulit batang dan buahnya. Pada bagian tanaman tersebut mengandung minyak esensial berupa senyawa *-cedrene, cuparene, cerdinol* dan *β -cedrene* yang merupakan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid (6). Berdasarkan studi literatur yang penulis lakukan belum ada penelitian mengenai kandungan metabolit sekunder dari daun *C. funebris* Endl.

Hasil identifikasi pendahuluan (uji fitokimia) yang telah dilakukan terhadap daun *C. funebris* Endl. diketahui bahwa daun tersebut positif mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder salah satunya adalah senyawa steroid. Steroid merupakan senyawa turunan dari hidrokarbon 1,2-Siklopentenoperhidrofenantrena [7]. Steroid di alam terdapat pada hewan dan tumbuhan. Senyawa steroid pada hewan berhubungan erat dengan beberapa

hormon dan keaktifan biologis lainnya, sedangkan pada tumbuhan steroid banyak terdapat baik pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tumbuhan tingkat rendah. Steroid pada tumbuh-tumbuhan secara umum terdapat dalam bentuk sterol. Tumbuhan tingkat tinggi biasanya mengandung fitosterol seperti: sitosterol (β -sitosterol), stigmasterol, dan kompesterol [5].

Kandungan senyawa steroid dalam tanaman obat telah banyak diteliti oleh para ahli. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) mengandung senyawa steroid golongan sterol berupa senyawa ergost-5en-3 β -ol [8]. Tanaman sidawayah (*Woodfordia floribunda* Salisb.) telah diketahui mengandung steroid jenis stigmasta-7,22-dien-3-ol [9]. Referensi [10] mengisolasi senyawa steroid berupa β -sitosterol dari daun tanaman gedih (*Abelmoschus manihot* L. Mendik).

Steroid merupakan salah satu golongan senyawa yang cukup penting dalam bidang medis. Lebih dari 150 jenis golongan steroid telah terdaftar sebagai obat [11]. Steroid dalam dunia medis digunakan sebagai bahan obat dan kontrasepsi, misalnya: androgen merupakan hormon steroid yang dapat menstimulasi organ seksual jantan, estrogen dapat menstimulasi organ seksual betina, adrenokortikoid dapat mencegah peradangan dan rematik [12]. Senyawa stigmasterol dapat menurunkan kolesterol darah, menghambat penyerapan kolesterol usus sehingga dapat menghambat perkembangan kanker usus besar dan menekan kolesterol hati [13]. Selain senyawa-senyawa steroid tersebut masih banyak senyawa lain yang golongan steroid dimanfaatkan dalam dunia medis.

Penelitian isolasi dan karakterisasi steroid dari daun *C. funebris* Endl. bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi steroid dari daun tanaman cemara natal (*C. funebris* Endl). Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam perkembangan kimia bahan alam tentang tanaman yang mengandung steroid serta memberikan informasi karakterisasi senyawa steroid yang dikandung daun *C. funebris* Endl.

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, alat *rotary evaporator* (*Heidolph Laborota* 4000), neraca analitik, standar klem, bola hisap, plat KLT, dan Lampu UV (254 dan 356 nm) sebagai *melting point* (*Gallenkamp melting point apparatus*, spektrofotometer ultraviolet visible (*Agilant* 8453) dan spektrofotometer inframerah (*Perkin Elmer universal ATR Sampling Accessor* 735 B). Bahan-bahan yang digunakan antara lain sampel daun cemara (*Cupressus funebris* Endl.), pelarut metanol destilat, n-heksana p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), Kloroform p.a (Merck), metanol p.a (Merck), air brom (Br_2/CCl_4) (Merck), dan kertas saring, silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), Plat KLT DC-Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, glass woll, aluminium voil, pereaksi *Lieberman-Burchrd* (LB) yaitu asam asetat anhidrat p.a (Merck) dan asam sulfat p.a (Merck), dan aquades.

B. Prosedur Penelitian

Penelitian diawali dengan melakukan uji pendahuluan terhadap kandungan alkaloid (metoda *Culvenor-Fitzgeraid*), flavonoid (metoda *Shinoda Test*), saponin (uji busa), terpenoid dan steroid (metoda *Lieberman-Burchead*) di dalam sampel daun cemara natal/*Cupressus funebri* Endl. (*C. funebri* Endl.). Hasil yang diperoleh, sampel mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, dan steroid. Senyawa steroid yang terkandung di dalam sampel lebih banyak dibandingkan kedua senyawa lainnya.

1. Ekstraksi

Sampel segar daun *C. funebris* Endl. yang telah bersih ditimbang sebanyak 4 Kg, kemudian dimaserasi (direndam) dengan 9 liter pelarut metanol. Sampel yang telah dirajang halus dan sedikit ditumbuk dimasukkan ke dalam maserator (wadah botol kaca gelap). Pelarut kemudian dimasukkan ke dalam maserator tersebut hingga semua sampel terendam (selama proses perendaman, sampel di dalam maserator sesekali dikocok). Ekstrak maserasi dipisahkan dari ampas dengan cara penyaringan. Maserasi dilakukan hingga sampel menunjukkan hasil negatif steroid dengan pereaksi LB. Semua filtrat hasil maserasi dipekatkan (diuapkan pelarutnya) dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak metanol kental sebanyak 1,36 Kg.

2. Fraksinasi

Ekstrak pekat metanol difraksinasi menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana. Fraksinasi dilakukan sampai ekstrak n-heksana yang digunakan menunjukkan hasil uji negatif steroid

dengan pereaksi LB. Ekstrak fraksi n-heksana yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat n-heksana diperoleh sebanyak 103,5 gram.

3. Pemisahan

Ekstrak n-heksana terlebih dahulu dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Hal ini dilakukan untuk mendapatkan kondisi pemisahan pada kromatografi kolom sehingga eluen yang digunakan dapat ditentukan. Eluen yang digunakan berupa senyawa tunggal dan campuran beberapa senyawa tunggal. Fraksi n-heksana di elusi dengan eluen n-heksana:etil asetat dengan beberapa perbandingan. Noda yang timbul pada plat (kromatogram) diamati menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 245-366 nm.

Pemisahan komponen dari fraksi n-heksana selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom. Fasa diam yang digunakan yaitu silika gel 60 (70-230 mesh). Fasa gerak yang digunakan yaitu campuran n-heksana dan etil asetat. Ekstrak fraksi n-heksana di elusi secara SGP (*Step Gradien Polarity*).

Eluat dari kromatografi kolom ditampung dengan vial-vial kecil dan diberi nomor. Eluat di dalam vial dimonitoring dengan KLT, kemudian eluat yang memiliki R_f yang sama digabung dalam satu vial. Hasil penggabungan diperoleh 12 kelompok. Pelarut kelompok senyawa tersebut diuapkan, kelompok 5 dan 6 yang berupa kristal diuji LB. Kelompok 5 yang positif mengandung steroid dilanjutkan pemurnian.

4. Pemurnian dan Uji Kemurnian

Kristal fraksi 5 diuji kemurniannya dengan KLT, dari uji tersebut diketahui kristal masih ada pengotor. Kristal dicuci dengan pelarut metanol p.a dan n-heksana p.a. Selanjutnya dilakukan rekristalisasi dengan menggunakan pelarut kloroform.

Uji kemurnian kristal dengan KLT menggunakan beberapa eluen dari campuran n-heksana : etil asetat (8:2, 7:3, 1:1, 3:7, dan 2:8). Kristal yang diperoleh telah murni jika noda pada kromatogram telah tunggal.

Titik leleh digunakan untuk memastikan kristal telah murni. Titik leleh kristal diuji dengan alat *melting point* merk *gallenkamp apparatus*. Pengamatan dilakukan saat kristal mulai meleleh hingga semua kristal dalam pipa kapiler meleleh seluruhnya. Kristal hasil rekristalisasi sudah murni jika memiliki range titik leleh $< 2^{\circ}\text{C}$. Kristal murni lalu dilakukan uji LB sebelum dikarakterisasi untuk memastikan kristal adalah senyawa steroid.

5. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Karakterisasi kristal murni dilakukan dengan pereaksi dan alat. Pereaksi yang digunakan adalah Br_2/CCl_4 , sedangkan alat yang digunakan untuk karakterisasi adalah *melting point*, spektrofotometer inframerah, dan spektrofotometer UV-Vis.

Karakterisasi kristal steroid murni hasil isolasi dengan menentukan titik leleh dilakukan dengan alat *melting point* merk *gallenkamp apparatus*. Prosedur kerja penentuannya sama dengan uji kemurnian menggunakan titik leleh. Suhu awal kristal mulai meleleh dijumlahkan dengan suhu kristal meleleh seluruhnya kemudian dirata-ratakan. Suhu rata-rata tersebut

merupakan titik leleh kristal steroid murni hasil isolasi [14].

Karakterisasi untuk mengidentifikasi ikatan rangkap menggunakan pereaksi kimia Br_2/CCl_4 (air brom). Pengujian dilakukan dengan cara melarutkan sedikit kristal murni dengan pelarut n-heksana p.a di dalam tabung reaksi. Larutan kristal tersebut kemudian ditambahkan beberapa tetes Br_2/CCl_4 . Hilangnya warna pink tua dari air brom saat ditambahkan menandakan terdapat ikatan rangkap pada senyawa tersebut.

Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menguji ikatan rangkap terkonjugasi atau tidak terkonjugasi pada suatu senyawa organik. Pengujian Kristal hasil isolasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis merek Agilent 8453. Kristal murni hasil isolasi diambil sedikit kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. Spektrofotometer UV-Vis yang distandarkan dengan metanol p.a. kemudian larutan kristal dimasukkan kedalam kuvet dan diukur. Pengukuran spektrum dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm.

Gugus fungsi dari senyawa hasil isolasi diketahui dengan menggunakan spektrofotometer inframerah. Spektrofotometer inframerah yang digunakan pada karakterisasi senyawa ini yaitu *Perkin Elmer universal ATR Sampling Accessor 735 B*. Kristal hasil isolasi diambil sedikit menggunakan spatula kemudian dimasukkan ke dalam lubang sampel pada alat (wadah sampel pada alat dibersihkan dengan alkohol terlebih dahulu sebelum dimasukkan sampel). Intensitas serapan senyawa hasil isolasi diukur pada bilangan gelombang 4.000 cm^{-1} sampai 600 cm^{-1} , dari hasil

pengukuran akan diperoleh puncak-puncak spesifik dari gugus fungsi yang terdapat dari senyawa hasil isolasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel daun *Cupressus funebris* Endl. sebanyak 4 Kg dimaserasi dengan pelarut metanol destilat. Pelarut ini dipilih karena dapat melarutkan hampir semua senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan, baik yang bersifat polar maupun non polar. Metanol juga memiliki titik didih relatif rendah yaitu 65°C yang memudahkan penguapan pada saat memisahkannya dari senyawa ekstrak [15].

Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak pekat yang berwarna hijau tua sebanyak 1,36 Kg. Ekstrak pekat kemudian difraksinasi menggunakan pelarut n-heksana lalu masing-masing fraksi dipekatkan, sehingga diperoleh ekstrak pekat fraksi metanol 1,192 Kg berwarna hijau tua dan ekstrak pekat fraksi n-heksana sebanyak 103,5 gram berwarna hijau kehitaman. Hasil uji LB dari fraksi-fraksi tersebut menunjukkan bahwa keduanya positif mengandung steroid. Pada fraksi n-heksana warna hasil uji steroid yang terbentuk lebih tajam dari fraksi metanol.

Pemisahan komponen selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom. Sebelum pengoloman dilakukan monitoring eluen menggunakan KLT. Eluen untuk pemisahan adalah n-heksana : etil asetat. Pengoloman dilakukan menggunakan metode SGP. Metoda SGP digunakan untuk memperoleh pemisahan yang baik antara senyawa polar, semi polar, dan non polar yang terdapat dalam

ekstrak fraksi n-heksana sehingga terjadi pemisahan secara bertahap berdasarkan sifat kepolarannya [16]. Ekstrak sampel yang dipisahkan pada kromatografi kolom yaitu ekstrak pekat fraksi n-heksana.

Kromatografi kolom yang dilakukan menghasilkan 245 vial. Vial-vial yang memiliki Rf yang sama setelah diuji dengan KLT kemudian digabungkan sehingga diperoleh 12 kelompok. Pelarut kelompok-kelompok tersebut dibiarkan mengering.

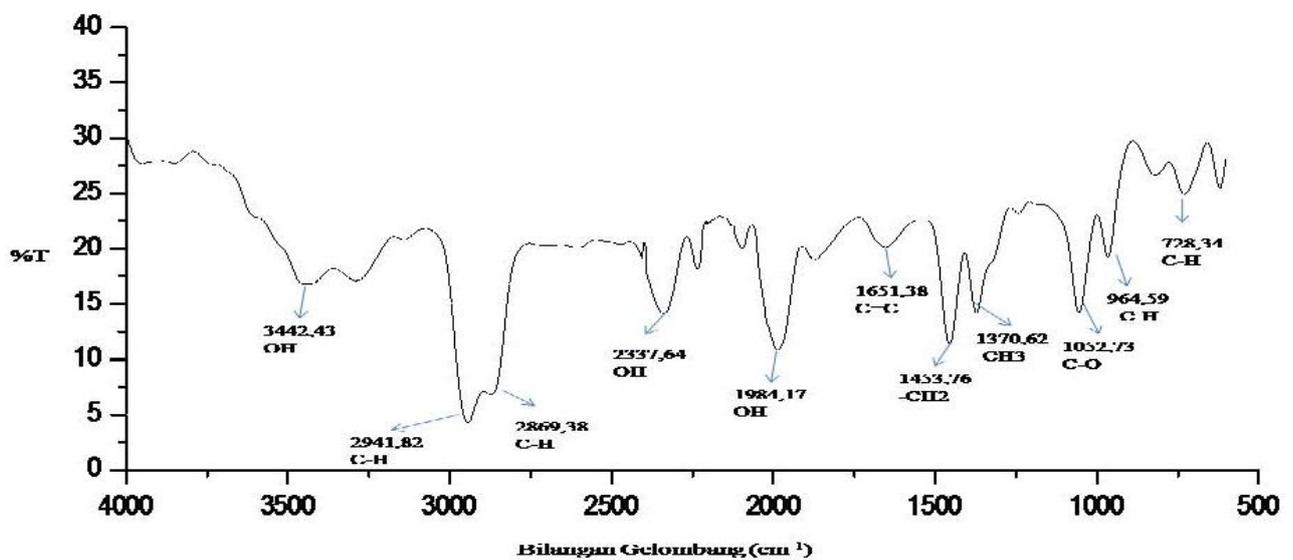
Kelompok 5 dan kelompok 6 membentuk kristal setelah pelarut dibiarkan menguap. Kedua kelompok tersebut diuji dengan pereaksi LB. Hasilnya hanya kelompok 5 yang positif steroid. Kristal kelompok 5 dilakukan pemurnian dengan melarutkan dalam metanol p.a dan n-heksana p.a berulang-ulang hingga kristal bersih dari pengotor. Kristal direkristalisasi dengan kloroform, diperoleh kristal berbentuk jarum berwarna putih sebanyak 0,3726 gram. Identifikasi kristal murni dengan

pereaksi LB memberikan hasil positif senyawa steroid yang ditandai terbentuknya warna biru kehijauan.

Kristal steroid yang telah direkristalisasi diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan beberapa eluen dari campuran n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8:2, 7:3, 1:1, 3:7, dan 2:8. Hasilnya diperoleh noda tunggal pada masing-masing kromatogram yang nilai Rf-nya dapat dilihat pada Tabel 2. Kemurnian kristal steroid juga diuji dengan uji titik leleh menggunakan alat *melting pointmerk gallenkamp apparatus*, hasilnya diperoleh *range* titik leleh kristal 137,7-139,4°C dengan selisih 1,7°C yang menandakan kristal steroid telah murni.

Hal ini sesuai dengan pendapat Referensi [17] yang menyatakan bahwa jika senyawa yang diuji dengan KLT memberikan noda tunggal dan *range* titik lelehnya $< 2^{\circ}\text{C}$ maka senyawa hasil isolasi sudah murni.

Gambar 1. Spektra inframerah senyawa steroid hasil isolasi



Tabel 2. Hasil uji kemurnian steroid hasil isolasi dengan klt

No	Eluen (n-heksana:etil asetat)	Harga R _f
1	8 : 2	0,35
2	7 : 3	0,58
3	5 : 5	0,62
4	3 : 7	0,67
5	2 : 2	0,75

Kristal murni dikarakterisasi dengan penentuan titik leleh, menggunakan pereaksi Br₂/CCl₄, spektrofotometer UV-Vis, dan spektrofotometer inframerah. Titik leleh kristal yang diperoleh adalah 138,6°C. Pengujian kristal steroid murni dengan pereaksi Br₂/CCl₄ memberikan

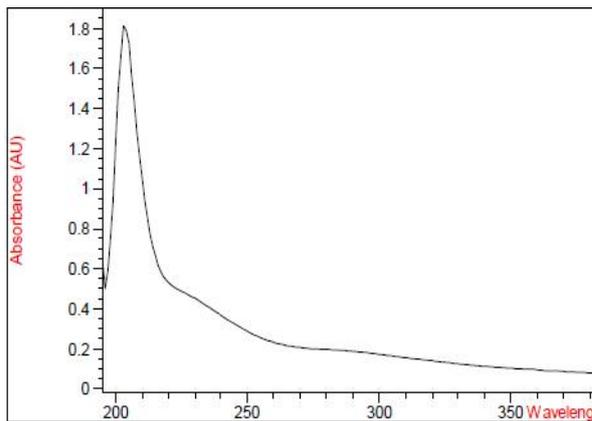
hasil positif terdapat ikatan rangkap yang ditandai dengan memudarnya warna pereaksi tersebut (18).

Karakterisasi menggunakan spektrofotometer inframerah dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada senyawa steroid. Hasil pengukuran yang dapat dilihat pada Gambar 1. Adanya serapan vibrasi regangan dari -OH pada daerah 3.442,43 cm⁻¹ pita yang melebar. Serapan ikatan -OH juga terjadi pada bilangan gelombang 2.337,64 cm⁻¹ dan 1.984,17 cm⁻¹. Gugus -OH yang muncul pada spektra diduga merupakan OH dari gugus alkohol. Munculnya serapan vibrasi pada 1.052,73 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi regangan dari C-O alkohol menguatkan dugaan bahwa senyawa steroid hasil isolasi merupakan senyawa steroid yang memiliki gugus fungsi hidroksi (OH). Vibrasi ikatan tunggal C-O

regangan gugus alkohol dalam senyawa steroid hanya memiliki intensitas menengah dan terletak di daerah sidik jari (1.060-1.000 cm⁻¹) [19].

Pita serapan penting lain terlihat pada daerah 1651,38 cm⁻¹, pita tersebut ditimbulkan oleh vibrasi gugus C=C regangan non konyugasi diikuti munculnya serapan vibrasi pada 964,59 cm⁻¹ tekukan dari =C-H alkana. Vibrasi C-H dari sistem alkana muncul pada bilangan gelombang 2.941,82 cm⁻¹ dan 2.869,38 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi regangan, dan C-H alkana juga muncul pada 728,34 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi berayun. Pita serapan tekukan CH₂ muncul pada bilangan gelombang 1.453,76 cm⁻¹ dan pada bilangan gelombang 1.370,62 cm⁻¹ muncul vibrasi berayun dari CH₃, data yang diperoleh sesuai dengan literatur [20].

Pengujian selanjutnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui terdapatnya ikatan rangkap terkonyugasi kristal tersebut. Hasil karakterisasi pada Gambar 2 memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm. Pita serapan tersebut lebih rendah dari pada serapan diena terkonyugasi pada transisi * di daerah 270 nm. Hal tersebut menunjukkan ikatan rangkap pada kristal steroid tidak terkonyugasi [19].



Gambar 1. Spektra UV Senyawa Steroid Hasil Isolasi

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa steroid hasil isolasi dari 4 Kg sampel adalah berupa kristal berbentuk jarum berwarna putih dengan massa 0,3726 gram.
2. Kadar senyawa steroid dari daun cemara natal (*Cupressus funebris* Endl.) adalah 0,01 %^{w/w}.
3. Titik leleh kristal steroid murni hasil isolasi adalah 138,6°C.
4. Karakterisasi struktur senyawa steroid hasil isolasi dengan pereaksi kimia, spektrofotometer UV-Vis, dan spektrofotometer inframerah menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi mengandung gugus OH, gugus metil, dan memiliki ikatan rangkap yang tidak terkonyugasi.

REFERENSI

[1] Weckerle CS, et al, 2006. Plant Knowledge of the Shuhi in the

Hengduan Mountains, Southwest China. *Economic Botany*. 60; 3-32.

[2] Xinrong, Y. 2003. *Traditional Chinese Medicine*. New York : Springer –Verlag Berlin Heidelberg. ISB 3-540-42846-1.

[3] Kusuma, T. S. 1988. *Kimia dan Lingkungan*. Padang: Pusat Penelitian Universitas Andalas Padang.

[4] Murniasih, T, et al. 2003. *Metabolit Sekunder dari Spons sebagai Bahan Obat-obatan*. Jakarta: bidang Produk Alam Laut, Pusat Penelitian Oseanografi- LIPI. XXVIII, Nomor 3. 27-33. ISSN 0216-1877.

[5] Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia* “diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro”. Bandung: Penerbit ITB.

[6] Carroll, J. F, et al. 2011. “*Essential oils of Cupressus funebris, Juniperus communis, and J. chinensis (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes*” *Journal of Vector Ecology*. Vol.36. no.2.258-268.

[7] Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Terbuka.

[8] Suryelita. 2000. *Steroid Isolation from Papaya Leaf*. Vol.14. Padang: UNP.

[9] Saleh, C. 2009. Senyawa Steroid Tumbuhan Sidaway (Woodfordia floribunda Salisb). *Jurnal Kimia Mulawarman* Vol. 6. No 2.

[10] Mamahit, L. 2009. Satu Senyawa steroid dari Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik)

- Adal Sulawesi Utara. *Jurnal Teknologi Pertanian Universitas Sam Ratulangi*. Vol. 2.No. 1.
- [11] National Nutritional Food Association. 2001. *Plants Sterol and Stanols*.
www.nnfa.org/services/science.
[19 Februari 2015].
- [12] Nogrady, T. 1992. *Kimia Medisinal*. Edisi II Alih Bahasa Raslim Rasyid. ITB. Bandung.
- [13] Jones, at al. 2000. *Modulation of Plasma Lipid Levels and Cholesterol Kinetics by Phytosterol Versus Phytostanol Ester*. *J Lipid Res*. 41: 297-705.
- [14] Martin, A. 1990. *Farmasil Fisika Edisi III*. Jakarta : UI-Press.
- [15] Djamal, R. 1988. *Tumbuhan Sebagai Bahan Obat*. Padang: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI, Pusat Penelitian Unviversitas Andalas.
- [16] Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung : ITB. 11a. 166h. 615.18.
- [17] Fessenden, R. J dan Fessenden J. S. 1997. *Kimia Organik*. Terjemahan oleh A. Hadatana P. Jilid I, Edisi Ketiga. Jakarta: Erlangga.
- [18] Kasel, A, et al. 2010. *Steroid Analysis*. London New York: Spinger Dordrecht Heidelberg. ISBN 9781-1-4020-9774-4.
- [19] Kasel, A, et al. 2010. *Steroid Analysis*. London New York: Spinger Dordrecht Heidelberg. ISBN 9781-1-4020-9774-4.
- [20] Silverstein, R. M. 1986. *Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik, Edisi IV*. Erlangga. Jakarta.