

Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Heksana Batang Kelakai (*Stenochlaena palustris*)

Antoni Pardede^{1*}, Raden Roro Ariessanty Alicia Kusuma Wardhani¹

¹Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Islam Kalimantan MAB, Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia

Corresponding Author:

Antoni Pardede

antonipardede@uniska-bjm.ac.id

Received: March 2024

Accepted: July 2024

Published: September 2024

©Antoni Pardede et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Isolation is a method of obtaining pure secondary metabolite compounds from plant extracts, which provide benefits such as health, medicine, cosmetics, and agriculture. This research has been carried out and aims to isolate the secondary metabolite compound from the hexane extract of the kelakai stems (*Stenochlaena palustris*). Phytochemical screening of that extract resulted in a positive-containing steroid. The isolation method includes the separation of hexane extract with column chromatography using silica gel as the stationary phase and eluted successively with hexane, chloroform, and ethyl acetate (step gradient polarity). The column chromatography of the hexane extract resulted in five fractions (H₁–H₅). Furthermore, fraction H₃ was purified to obtain a white needle crystal. The isolated compound spot is invisible in thin-layer chromatography (KLT) under an ultraviolet lamp at 254 nm and 365 nm wavelengths. The isolated compound structure was elucidated by proton and carbon nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectroscopy (MS), as well as comparisons with literature data. The isolated compound is a group of steroids identified as β -sitosterol with the molecular formula C₂₉H₅₀O.

Keywords: *Stenochlaena palustris*; kelakai; hexane extract; steroid; β -sitosterol

Pendahuluan

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan yang difungsikan untuk eksistensi bagi tumbuhan tersebut. Eksistensi diartikan bahwa tumbuhan tersebut mampu untuk bertahap hidup dari segala bentuk yang dapat mengancam keberlangsungan hidup serta regenerasinya^[1], oleh karena hal tersebutlah tumbuhan memiliki warna, rasa, aroma tertentu serta proteksi diri seperti duri dan toksin (racun).

Eksplorasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan telah dilakukan dalam bidang

penelitian kimia bahan alam dengan mengisolasi serta mengelucidasi struktur senyawa metabolit sekunder tersebut, akhirnya senyawa metabolit sekunder dapat diketahui struktur dan nama serta bioaktivitasnya, memberikan manfaat bagi manusia seperti antikanker, hepatoprotektif, antioksidan, antibakteri dan antiinflamasi ataupun dalam bidang pertanian seperti antirayap, anti serangga dan lain sebagainya^{[2],[3]}.

Kelakai begitu mudah dijumpai dan melimpah pada daerah rawa seperti di Banjarmasin (Kalimantan Selatan), kelakai terdiri dari bagian daun, batang dan akar. Karena mudah

dijumpai dan melimpah serta diyakini menyehatkan bagi masyarakat setempat sehingga kelakai dijadikan sampel dalam penelitian. Dari bagian daun eksplorasi senyawa metabolit sekunder telah selesai dilakukan dan dilaporkan penelitiannya pada semua tingkat kepolaran ekstrak. Laporan ilmiah tersebut mengungkapkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun kelakai memiliki manfaat yang sangat baik bagi manusia jika dikonsumsi, hal ini dikarenakan memiliki aktivitas penghambatan cholinesterase sehingga dapat menurunkan gejala demensia seperti alzheimer, selain hal tersebut daun kelakai juga memiliki potensi aktivitas penghambatan α -glucosidase (menurunkan atau menghambat kadar gula darah yang tinggi) serta dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri serta antioksidan^{[4]-[8]}.

Berdasarkan temuan dari bagian daun tersebut maka kuat diduga pada bagian lain dari tumbuhan kelakai juga memiliki potensi senyawa metabolit sekunder dan aktivitas biologi yang baik dan bermanfaat bagi manusia. Oleh karenanya peneliti menggunakan bagian batang tumbuhan kelakai. Senyawa metabolit sekunder dari bagian batang kelakai telah peneliti laporkan menggunakan ekstrak etil asetat (semipolar)^[9]. Elusidasi struktur senyawa hasil isolasi menggunakan spektroskopi resonansi magnet inti (NMR) dan spektroskopi massa menunjukkan senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari ekstrak etil asetat batang kelakai adalah golongan flavonoid (*Stenopalustroside A*) dan ecdysteroid (*20-hydroxyecdysone* dan *ajugasteron C*). Senyawa hasil isolasi ini menyebabkan rendahnya daya makan serta mortalitas hama pengganggu tanaman^{[9],[10]}. Penelitian peneliti sebelumnya ini hanya menggunakan ekstrak etil asetat (semipolar) saja sedangkan ekstrak lainnya sama sekali belum diungkapkan ataupun dilaporkan secara ilmiah sehingga peneliti melanjutkan penelitian menggunakan ekstrak heksana (nonpolar) dari batang kelakai.

Laporan ilmiah penelitian-penelitian menggunakan ekstrak heksana memberikan petunjuk kepada peneliti yaitu langkah atau

teknik yang dipilih agar isolasi senyawa metabolit sekunder menggunakan ekstrak heksana batang kelakai dilakukan lebih tepat, cepat dan efisien. Laporan ilmiah tersebut antara lain yaitu senyawa metabolit sekunder dari ekstrak heksana batang tumbuhan *Coreopsis lanceolata*^[11], dari tumbuhan ini berhasil mengisolasi senyawa 5-phenyl-2-(1-propynyl)-thiophene dan 1-phenylhepta-1,3,5-tryne dan β -sitosterol, aktivitas antirayap dilaporkan dari senyawa tersebut. Senyawa β -sitosterol telah berhasil diisolasi dari ekstrak heksana batang *Mangifera casturi*^[12]. Selanjutnya senyawa lantadene A telah diisolasi dari ekstrak heksana tumbuhan *Lantana camara* Linn dengan pemisahan dan pemurnian menggunakan kombinasi dan perbandingan berbagai jenis kepolaran pelarut^{[13],[14]}.

Uji awal kandungan (skrining fitokimia) senyawa metabolit sekunder dari ekstrak nonpolar (heksana) batang kelakai telah peneliti teliti^[15] yang menunjukkan uji positif mengandung senyawa terpenoid dan steroid, akan tetapi penelitian ini hanya sebatas uji pendahuluan untuk identifikasi jenis golongan senyawa metabolit sekunder saja, sedangkan isolasi untuk mengetahui struktur dan nama senyawa metabolit sekunder belum dilakukan. Berdasarkan penelusuran literatur teknik isolasi senyawa metabolit sekunder ekstrak heksana dan tujuan peneliti untuk mengungkap kandungan senyawa metabolit sekunder batang kelakai dari ekstrak heksana, maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak heksana batang kelakai (*Stenochlaena palustris*).

Metodologi Penelitian

Bahan Kimia

Tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris*) diperoleh di lahan rawa Banjarmasin, Kalimantan Selatan (Kalsel), bagian tumbuhan yang digunakan sebagai sampel adalah bagian batang sebanyak 1 Kg, dikeringanginkan dan dihaluskan. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini yaitu silika gel (0,0063 – 0,200 mm, merck KGaA Darmstadt Germany), pelarut teknis (heksana, kloroform dan etil

asetat) serta kombinasi pelarut dengan perbandingan heksana: kloroform (9 : 1), (8 : 2) hingga (1 : 9), kloroform: etil asetat (9 : 1), (8 : 2) hingga (1 : 9).

Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas yang umum dipakai pada penelitian kimia bahan alam seperti meserator, corong kaca, kolom kromatografi, plat KLT (silica gel 60 F₂₅₄, merck KGaA Darmstadt Germany), batang pengaduk, pipet tetes, lampu Ultraviolet, spektrofotometer NMR JEOL ECA 400 dan spektrofotometer massa JEOL JMS-700/GI dengan electron ionization (EI).

Prosedur penelitian

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder dari batang kelakai (*Stenochlaena palustris*) mengadopsi metode kerja serta data hasil skrining fitokimia yang telah peneliti laporkan^[15].

Ekstraksi dan Isolasi

Proses ekstraksi diawali dengan persiapan sebanyak 1 kg sampel yang telah halus dan kering dari batang kelakai (*Stenochlaena palustris*), selanjutnya dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan pelarut heksana sampai dengan sampel seluruhnya terendam, dimaserasi selama tujuh hari, diaduk sekali setiap harinya. Selanjutnya dipisahkan antara sampel dan larutannya, proses ini dilakukan dua kali pengulangan. Larutan dikumpulkan dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental dari sampel tumbuhan yang digunakan^[12]. Profil pola pemisahan dari komponen yang terkandung dalam ekstrak heksana dilihat menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) pada berbagai kombinasi fasa gerak yaitu heksana 100%, heksana: kloroform (8 : 2), kloroform 100%, dan kloroform: etil asetat (9 : 1). Berdasarkan profil KLT dilakukan prosedur kromatografi kolom untuk pemisahan dan pemurnian dengan fasa diam silika gel serta fasa gerak dengan elusi gradien yaitu menggunakan pelarut yang dikombinasikan tingkat kepolarannya dimulai dari heksana

100%, heksana: kloroform (9 : 1), (8 : 2) diteruskan hingga (1 : 9), kloroform 100%, kloroform: etil asetat (9 : 1), (8 : 2) diteruskan hingga (1 : 9) dan etil asetat 100%. Dari kromatografi kolom didapatkan fraksi-fraksi heksana dan selanjutnya dimurnikan^{[11],[12]}. Senyawa murni yang didapatkan dianalisa menggunakan spektroskopi NMR dan spektroskopi massa untuk mengetahui struktur dari senyawa metabolit sekunder hasil isolasi tersebut.

Hasil dan Diskusi

Bahan Tumbuhan

Batang dari tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris*) sebanyak 1 kg yang telah dikumpulkan dikeringanginkan dan dihaluskan. Perlakuan ini berfungsi untuk memperluas permukaan sampel batang kelakai sehingga proses ekstraksi berjalan dengan baik untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder^[2].

Ekstraksi dan Isolasi

Proses ekstraksi telah dilakukan dengan maserasi (perendaman) karena tidak memerlukan peralatan yang banyak, cukup dengan bejana atau maserator^[2], selain hal tersebut juga berdasarkan pertimbangan waktu dan pembiayaan jika menggunakan teknik ekstraksi lainnya.

Ekstraksi dimulai dengan dimasukkan sampel ke dalam maserator, ditambahkan pelarut heksana hingga sampel terendam sempurna, dimaserasi selama tujuh hari dan diaduk setiap harinya sehingga tumbukan antara pelarut dan sampel dapat maksimal. Hasil meserasi dari dua minggu dikumpulkan dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental heksana batang kelakai sebanyak 64,05 gram.

Dari ekstrak heksana yang dihasilkan dalam proses ekstraksi, 20,46 gramnya digunakan untuk untuk pemisahan dan pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom, fasa diam silika gel serta fasa gerak dengan elusi gradien menggunakan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya secara perlahan

dimulai dari heksana 100%, heksana: kloroform (9 : 1), (8 : 2) diteruskan hingga (1 : 9), kloroform 100%, kloroform: etil asetat (9 : 1), (8 : 2) diteruskan hingga (1 : 9) dan diakhiri etil asetat 100%. Hasil kromatografi kolom ditampung pada vial, setiap vial dimonitor dengan KLT, pola KLT memiliki kemiripan maka vial tersebut digabungkan, hingga didapatkan 5 fraksi heksana (H₁-H₅). Pada seluruh bagian vial fraksi H₃ (8,32 gr) terlihat kristal jarum namun berwarna hijau pekat. Pelarut heksana dengan hati-hati diteteskan secara perlahan pada sekeliling dinding dalam vial fraksi H₃, bagian larut heksana yang berwarna hijau diambil menggunakan pipet, proses ini diulangi beberapa kali hingga kristal warna hijau pekat berubah menjadi putih kehijauan pada sekeliling dinding vial fraksi H₃. Proses dan cara yang sama diulangi kembali namun menggunakan pelarut yang berbeda yaitu kombinasi antara heksana dengan kloroform (9,5 : 0,5) sehingga didapatkan kristal jarum berwarna putih sebanyak 20,3 mg. Selanjutnya kristal dimonitor dengan KLT dan dianalisa dengan spektroskopi proton dan karbon NMR serta spektroskopi massa (MS).

Elusidasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi dari ekstrak heksana batang kelakai (*Stenochlaena palustris*) diduga senyawa golongan steroid, hal ini berdasarkan dari hasil penelitian peneliti sebelumnya yaitu skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder dari ekstrak heksana batang kelakai, dimana ekstrak heksana batang kelakai positif mengandung senyawa steroid^[15]. Selanjutnya dugaan awal tersebut diperkuat dengan tidak terdeteksinya noda atau spot pada kromatografi lapis tipis (KLT) dari senyawa isolasi yang telah dielusi dengan heksana : kloroform (9,5 : 0,5), dimonitor menggunakan lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Noda atau spot yang tidak terdeteksi pada plat KLT adalah ciri khas dari senyawa golongan steroid^[3]. Selanjutnya plat KLT disemprot dengan pereaksi phosphomolybdic acid yang dapat mendeteksi senyawa metabolit sekunder golongan steroid^[16], setelah penyemprotan terlihat noda

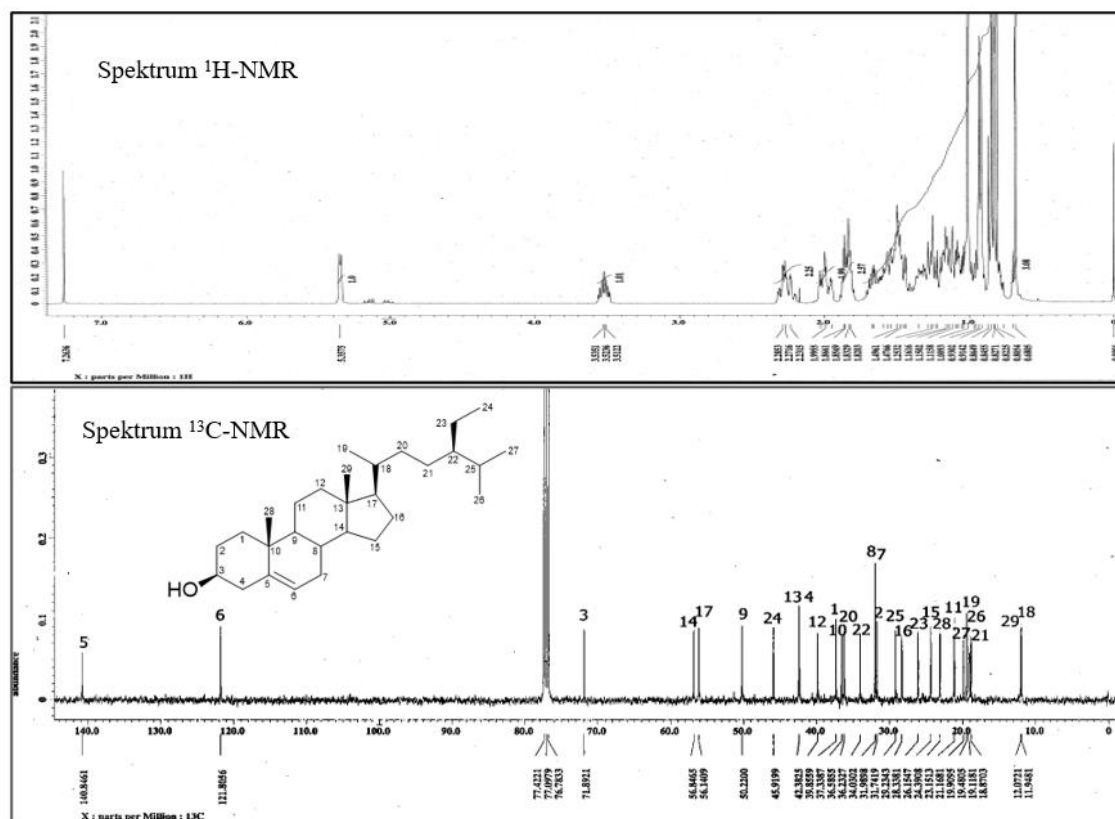
tunggal berbentuk bulat yang menjadi indikasi bahwa senyawa hasil isolasi adalah senyawa murni dan termasuk golongan steroid.

Elusidasi struktur senyawa isolasi menggunakan analisa spektrum dari spektroskopi proton (¹H-NMR) dan karbon (¹³C-NMR) yang mengindikasikan berapa jumlah proton dan jumlah karbon pada senyawa hasil isolasi^{[17],[18]}. Pengukuran proton NMR menggunakan 400 MHz, pelarut kloroform deuterasi (kloroform-D atau CDCl₃), hasil dari pengukuran memberikan pergeseran kimia dari ¹H-NMR (gambar 1) yaitu δ 5,35 (1H, H-6) merupakan signal untuk proton olefinik yang mengindikasikan bahwa adanya ikatan rangkap antara C-5 dan C-6 dari struktur senyawa hasil isolasi. Selanjutnya terdapat satu proton dengan pergeseran kimia pada δ 3,48 - 3,59 (1H, H-3) yang berkorelasi terhadap adanya gugus hidroksil pada C-3 diketahui berdasarkan 2D NMR literatur^[19]. Terdapat tiga metilen signal pada δ 1,07 - 1,44 (6H, H-20, H-21 dan H-23), dua metil pada pergeseran kimia δ 0,91 - 1,06 (6H, H-19 dan H-29) dan tiga metil pada δ 0,86 (9H, H-24, H-26 dan H-27), serta satu metil pada δ 0,67 (3H, H-28). Pada literatur^[20] terdapat signal pada δ 1,68 - 2,28 untuk 21 signal proton dari cincin *cyclopentaphenanthrene*, pada senyawa hasil isolasi signal tersebut muncul pada δ 1,71 - 2,06. Data ¹H-NMR senyawa hasil isolasi dibandingkan dengan data literatur (tabel 1)^{[19]-[23]}, data menunjukkan pola pergeseran kimia yang mirip. Keseluruhan terdapat 49 proton dan satu gugus hidroksil yang sesuai untuk senyawa steroid yaitu β-sitosterol.

Pengukuran karbon NMR menggunakan 100 MHz, kloroform deuterasi (kloroform-D atau CDCl₃) sebagai pelarutnya, hasil dari pengukuran memberikan pergeseran kimia dari ¹³C-NMR (gambar 1), yaitu terdapat sebelas karbon metilen (CH₂) pada δ 39,8 (C-1), 31,7 (C-2), 42,4 (C-4), 31,9 (C-7), 21,1 (C-11), 42,3 (C-12), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 36,2 (C-20), 26,1 (C-21), dan 23,1 (C-23), kesebelas karbon metilen ini terkonfirmasi dari kesesuaian data karbon NMR senyawa isolasi dengan 2D NMR (DEPT) senyawa β-sitosterol yang telah dilaporkan pada literatur^[21].

Tabel 1. Perbandingan Proton dan Karbon NMR Dari Senyawa Hasil Isolasi Dengan Literatur

No	β -sitosterol (CDCl ₃) ^{[19]-[22]}		Senyawa Hasil Isolasi (CDCl ₃)	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	37,5		39,8	
2	31,9		31,7	
3	72,0	3,49 -3,54, 3H	71,8	3.48 - 3.59, 3H
4	42,5		42,4	
5	140,9		140,8	
6	121,9	5,36, 1H	121,8	5.35, 1H
7	321		31,9	
8	32,1		34,0	
9	50,3		50,3	
10	36,7		37,3	
11	21,3		21,1	
12	39,9		42,3	
13	42,6		45,9	
14	56,9		56,8	
15	26,3		24,3	
16	28,5		28,3	
17	56,3		56,1	
18	36,3		36,5	
19	19,2	0,93, 3H	19,1	0.91, 3H
20	34,2	1,46, 2H	36,2	1,44, 2H
21	26,3	1,39, 2H	26,1	1,43, 2H
22	46,1		50,2	
23	23,3	1,16, 2H	23,1	1,07, 2H
24	12,2	0,84, 3H	12,0	0.86, 3H
25	29,4		29,2	
26	20,1	0,84, 3H	19,9	0.86, 3H
27	19,6	0,81, 3H	19,4	0.86, 3H
28	19,0	0,68, 3H	18,8	0.67, 3H
29	12,0	1,01, 3H	11,9	1,06, 3H



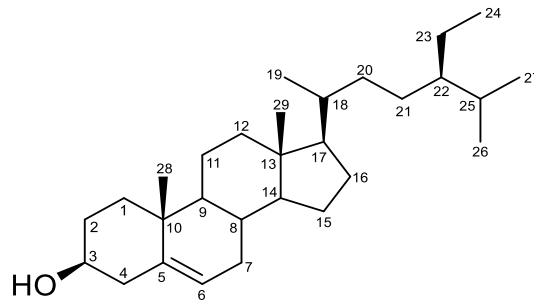
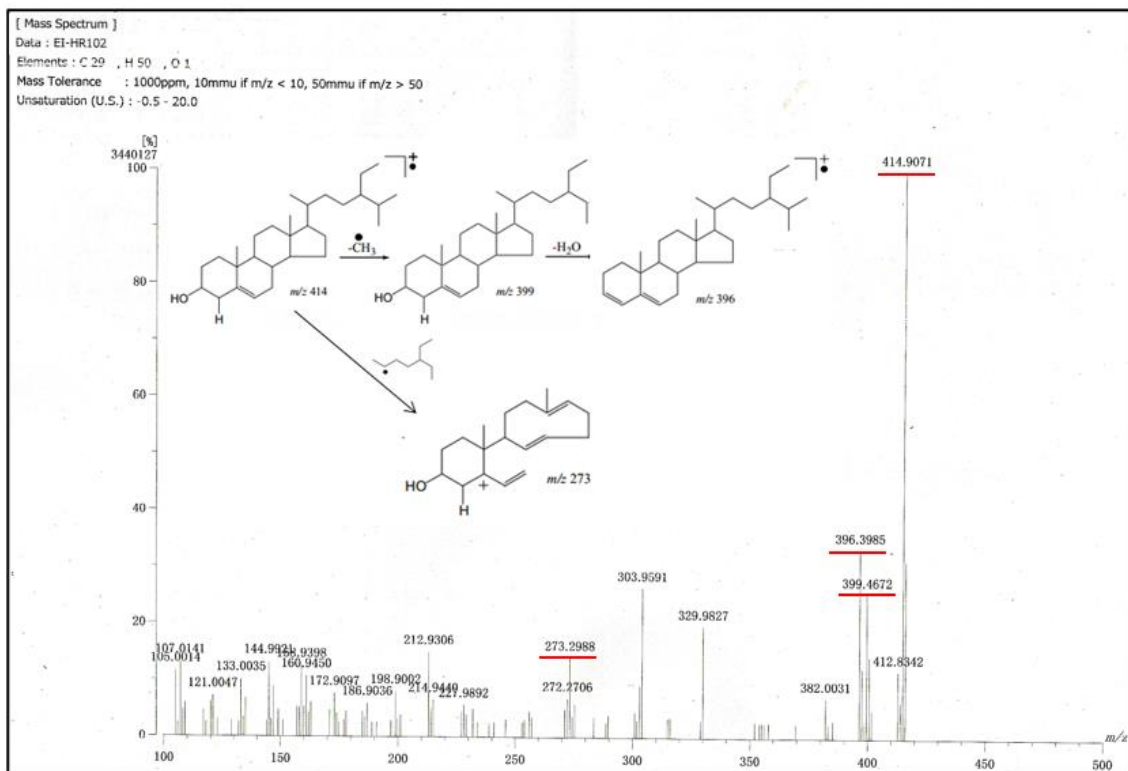
Gambar 1. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Dari Senyawa Hasil Isolasi

Karbon pada posisi C-20 dan C-21 menjadi kunci penting dalam penentuan struktur senyawa isolasi yaitu antara senyawa β -sitosterol atau stigmasterol, karena kedua senyawa ini secara struktur sangatlah mirip. Stigmasterol memiliki signal proton olefinik pada δ 5,12 - 4,99 yang menandakan bahwa adanya ikatan rangkap antara C-20 pada δ 138,7 dengan C-21 pada δ 129,6^{[19],[24]}. Hal ini sangat kontras berbeda terhadap senyawa hasil isolasi dari ekstrak heksana batang kelakai, tidak terdapat signal proton olefinik tersebut dan pergeseran kimia pada senyawa hasil isolasi untuk C-20 yaitu δ 36,2 dan C-21 adalah δ 26,1. Data ini menguatkan kembali bahwa senyawa hasil isolasi adalah β -sitosterol.

Senyawa hasil isolasi memiliki sembilan karbon metin (CH) pada δ 71,8 (C-3), 121,8 (C-6), 34,0 (C-8), 50,3 (C-9), 56,8 (C-14), 56,1 (C-17), 36,5 (C-18), 50,2 (C-22), dan 29,2 (C-25). Tiga karbon kuartener yang teridentifikasi pada δ 140,8 (C-

5), 37,3 (C-10), dan 45,9 (C-13). Enam karbon metil pada δ 19,1 (C-19), 12,0 (C-24), 19,9 (C-26), 19,4 (C-27), 18,8 (C-28), dan 11,9 (C-29). Data $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil isolasi dibandingkan dengan data literatur (tabel 1)^{[19]-[24]}. Berdasarkan data karbon NMR dan perbandingan literatur maka diketahui bahwa senyawa hasil isolasi memiliki 29 karbon yang terdiri dari 11 karbon metilen, 9 karbon metin, 3 karbon kuartener dan 6 karbon metil.

Dari analisa proton dan karbon NMR maka diketahui bahwa senyawa hasil isolasi memiliki 49 proton dengan satu gugus hidroksil dan terdapat 29 karbon, yang dikonfirmasi dari perbandingan data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ antara senyawa hasil isolasi terhadap literatur yang memiliki data 2D NMR dalam penentuan posisi proton dan karbon pada struktur senyawa isolasi^{[11],[19]-[23]}. Sehingga senyawa hasil isolasi adalah senyawa golongan steroid yaitu β -sitosterol (gambar 2).

Gambar 2. β -sitosterol

Gambar 3. Spektrum Massa Senyawa Hasil Isolasi

Untuk mendukung dan memperkuat data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ bahwa senyawa hasil isolasi adalah β -sitosterol maka dilakukan pengukuran menggunakan spektroskopi massa. Spektrum massa senyawa hasil isolasi dengan fragmentasinya dapat dilihat pada gambar 3. Data spektroskopi massa menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi memiliki HREIMS m/z 414.9 $[\text{M}]^+$ dengan rumus molekul dari senyawa hasil isolasi ekstrak heksana batang kelakai adalah $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. Data m/z dan rumus molekul tersebut sesuai untuk β -sitosterol^{[11],[20]-[22],[24]}. Dengan demikian data proton dan karbon NMR serta

spektroskopi massa sama-sama saling mendukung dan diperkuat dengan perbandingan data literatur, maka senyawa hasil isolasi dari ekstrak heksana batang kelakai (*Stenochlaena palustris*) dikonfirmasi senyawa metabolit sekunder golongan steroid dengan nama β -sitosterol.

Kesimpulan

Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak heksana batang kelakai (*Stenochlaena palustris*) yang telah berhasil diisolasi adalah senyawa golongan steroid dengan nama β -Sitosterol.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini terutama kepada LP2M Uniska MAB yang telah memberikan pendanaan penelitian dengan skema kompetitif hibah internal Uniska MAB.

Daftar Pustaka

1. Mazid, M., Khan, T. A. & Mohammad, F., Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. (2011).
2. Santoni, A., Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Kulit Batang Surian (*Toona sinensis*) Meliaceae dan Uji Aktivitas Insektisida. *Disertasi. Progr. Pascasarj. Univ. Andalas. Padang*, (2009).
3. Pardede, A., Isolation of secondary metabolites from medicinal plants and invasive alien species and their biological activities. (2018).
4. Zuraini, Z., Sasidharan, S., Kaur, S. R. & Nithiyayini, M., Antimicrobial and antifungal activities of local edible fern *Stenochlaena palustris* (Burm. F.) Bedd. *Pharmacologyonline*, **1(23)**: 233–237 (2010).
5. Chai, T.-T., Panirchellvum, E., Ong, H.-C. & Wong, F.-C., Phenolic contents and antioxidant properties of *Stenochlaena palustris*, an edible medicinal fern. *Bot. Stud.*, **53(4)**: 439–446 (2012).
6. Ponnusamy, Y., Chear, N. J. Y., Ramanathan, S., Murugaiyah, V. & Lai, C.-S., Antioxidant and antibacterial properties of Malaysian ferns used traditionally against infection. *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, **3(6)**: 14–18 (2013).
7. Chai, T.-T., Kwek, M.-T., Ong, H.-C. & Wong, F.-C., Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent α -glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity. *Food Chem.*, **186**: 26–31 (2015).
8. Chear, N. J.-Y., Khaw, K.-Y., Murugaiyah, V. & Lai, C.-S., Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *J. food drug Anal.*, **24(2)**: 358–366 (2016).
9. Pardede, A., Koketsu, M., Adfa, M., Kusnanda, A. J. & Ninomiya, M., Isolation of secondary metabolites from *Stenochlaena palustris* stems and structure-activity relationships of 20-hydroxyecdysone derivatives on antitermite activity. *Holzforchung*, **72(10)**: 899–904 (2018).
10. Xu, D., Ali, S. & Huang, Z., Insecticidal activity influence of 20-Hydroxyecdysone on the pathogenicity of *Isaria fumosorosea* against *Plutella xylostella*. *Biol. Control*, **56(3)**: 239–244 (2011).
11. Pardede, A., Adfa, M., Kusnanda, A. J., Ninomiya, M. & Koketsu, M., Chemical Constituents of *Coreopsis lanceolata* Stems and Their Antitermitic Activity Against the Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus*. *J. Econ. Entomol.*, **111(2)**: (2018).
12. Pardede, A. & Koketsu, M., Antioxidant and antileukemic activity of chemical components from bark of *Mangifera casturi*. *Comp. Clin. Pathol.*, **26(3)**: (2017).
13. Yuni, M. S., Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Triterpenoid dari Fraksi Heksana Daun *Lantana camara* Linn dan Uji Aktivitas Sitotoksinya. (2019).
14. Suthar, S. K., Hooda, A., Sharma, A., Bansal, S., Monga, J., Chauhan, M. & Sharma, M., Isolation optimisation, synthesis, molecular docking and in silico ADMET studies of lantadene a and its derivatives. *Nat. Prod. Res.*, **35(21)**: 3939–3944 (2021).
15. Pardede, A. & Wardhani, R. R. A. A. K., Skrining Fitokimia dan Perbandingan Uji Aktifitas Antirayap Ekstrak Heksana dan Etil Asetat Batang Kelakai (*Stenochlaena palustris*). *Dalt. J. Pendidik. Kim. dan Ilmu Kim.*, **4(1)**: (2021).

16. Zarzycki, P. K., Baran, M., Włodarczyk, E. & Bartoszek, M. A., Improved detection of ergosterol, stigmasterol, and selected steroids on silica coated TLC plates using phosphomolybdic acid staining. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30(17)**: 2629–2634 (2007).
17. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. A., *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning, (2008).
18. Sitorus, M., Spektroskopi elusidasi struktur molekul organik. *Graha Ilmu, Yogyakarta*, 29–39 (2009).
19. Chaturvedula, V. S. P. & Prakash, I., Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.*, **1(9)**: 239–242 (2012).
20. Badea Albadri, H. M., Saleh, I. & Mohammed Hasan, Z. Y., Isolation, identification, and structure elucidation of Beta-sitosterol from Iraqi *Plantago major* using GC-MS, HPTLC, NMR, and FTIR. *F1000Research*, **12**: 1349 (2023).
21. Sanjaya, A., Adfa, M., Pardede, A. & Gustian, I., Isolation and structure elucidation of steroid from methanol extract of Sentang (*Azadirachta excelsa* (Jack.) Jacobs) stem. in *Proceeding of The 1st International Conference on Chemistry, Pharmacy and Medical Sciences (ICCPM)*, (2018).
22. Riky, R., Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Sitosterol dan Flavonoid Dari Kulit Batang *Aglaia Odorata* L. *J. Borneo Cendekia Vol. 1 No. 1 Maret 2017*, **1(1)**: 29–36 (2017).
23. Erwin, E., Pusparohmana, W. R., Safitry, R. D., Marlina, E., Usman, E. & Kusuma, I. W., Isolation and characterization of stigmasterol and β -sitosterol from wood bark extract of *Baccaurea macrocarpa* Miq. *Mull. Arg. Rasayan J. Chem.*, **13**: 2552–2558 (2020).
24. Okoro, I., Tor-Anyiin, T., Igoli, J., Noundou, X. & Krause, R., Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β -Sitosterol from *Anthocleista djalensis* A. Chev. *Asian J. Chem. Sci.*, **3(4)**: 1–5 (2018).