

LACTARAN SESQUITERPEN VELLERAL DARI KULIT BATANG TUMBUHAN DRYMIS BECCARIANA GIBBS. (WINTERACEAE) YANG BERSIFAT SITOTOKSIK DAN ANTIMIKROBA

(*Lactaran Sesquiterpen Velleral from Stem Bark of Drymis Beccariana Gibbs (Winteraceae) with Cytotoxicity and Antimicrobial Activity*)

Bimo Budi Santoso¹, Darma Santi², Markus H. Langsa³ dan Rina Moge⁴

^{1,2,3}Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Papua, Jl. Gunung Salju Amban Manokwari 98314 Indonesia

⁴Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Papua, Jl. Gunung Salju Amban Manokwari 98314 Indonesia

ABSTRACT

Isolation guided by brine-shrimp (*Artemia salina*) bioassay from the stem bark of *D. beccariana* Gibbs. led to isolate a bioactive compound called Velleral (**1**) ((3aS,8aS)-2,2,8-trimethyl-3,3a,6,8a-tetrahydro-1H-azulene-5,6-dicarbaldehyde). The structure of this compound was elucidated based on physical and spectroscopic data (UV, IR, ¹H NMR, ¹³C-NMR and GC-MS). This compound showed significant active in the *Artemia salina* bioassay with IC₅₀ 2.92 µg/mL and exhibited significant cytotoxicity against murine P-388 leukemia cells with IC₅₀ 3,39 µg/mL. Moreover, the compound exhibited antibacterial and antifungal activity especially against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* respectively. This result indicates that stem bark of *D. beccariana* is a potential source of bioactive compounds.

Keywords: *D. beccariana*, Velleral, *A. salina*, Sel murine P-388, *S.aureus*, *C. albicans*

PENDAHULUAN

Tumbuhan Akway (*Drymis beccariana*) didefinisikan sebagai tanaman perdu dari famili Winteraceae. Tumbuhan ini ditemukan di hutan tropis primer dan sekunder dan mudah tumbuh di daerah dataran tinggi. Tumbuhan yang termasuk famili Winteraceae sampai saat ini telah dikarakterisasi mencapai 120 spesies (Heywood, 1993). Terdapat 3 spesies di Pegunungan Arfak Kabupaten Manokwari ada tiga jenis yaitu *D. beccariana*, *D. arfakensis* dan *D. piperita*.

Tumbuhan *D. beccariana* termasuk tanaman perdu dengan tinggi kira-kira 1-4 m, batang berwarna coklat, daun berbentuk lonjong pada tepi daun licin lanset, pada bagian bawah permukaan daun terdapat spot dan mempunyai lilin, bunga berwarna krem – putih, ada 5-7 bunga pertangkai, tangkai berwarna merah, buah yang muda

berwarna hijau, sedangkan yang tua berwarna hitam mengkilap (Heywood, 1993)

Kulit batang tumbuhan ini secara turun temurun oleh masyarakat asli Manokwari (suku Arfak) digunakan untuk menambah stamina atau daya tahan tubuh (stimulan). Ada dua cara penggunaan oleh masyarakat setempat yaitu kulit kayu digigit pada saat mereka menempuh perjalanan jauh (berhari-hari). Penggunaan lainnya adalah kulit kayu ditumbuk, kemudian direbus dengan air dan air rebusan diminum sebelum mereka menempuh perjalanan jauh. Daunnya dimanfaatkan sebagai obat kudis dan juga obat pegal-pegal yaitu dengan cara daun dihaluskan dan ditempelkan pada daerah tubuh yang pegal atau yang sakit (Lense, 2002).

METODE

Umum. Analisis GC-MS dilakukan dengan alat GC-MS-QP201205 Merk Shimadzu. Spektrum IR diukur dengan Shimadzu 8300 FTIR, spektrum NMR ^1H dan ^{13}C spektrofotometer Jeol JNM A-500 yang bekerja pada 500 MHz (^1H) dan 125 MHz (^{13}C) menggunakan puncak residu dan pelarut terdeuterasi sebagai standar. MS spektrum didapatkan pada GC-MS-QP2010S SHIMADZU. Ultraviolet spektrum didapatkan dengan pelarut MeOH menggunakan Variant DMS-100 UV-Vis scanning spektrofotometer. Kromatografi vakum cair (KVC) dilakukan dengan menggunakan Si-gel Merck 60 GF₂₅₄ (230-400 mesh) dan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada plat aluminium berlapis Si-gel Merck Kiesegel 60 F₂₅₄ 0,25 mm dan KLT preparatif pada plat kaca berlapis Si-gel Merck Kiesegel 60 F₂₅₄ 1 mm. Pelarut yang digunakan adalah berkualitas pro analisis (p.a) Merck.

Bahan Tumbuhan. Bahan tumbuhan berupa kulit batang *D. Beccariana* dikumpulkan dari Distrik Anggi Kabupaten Manokwari pada bulan Maret 2009. Specimen tumbuhan ini telah diidentifikasi di Herbarium Manokwariense Universitas Negeri Papua dengan kode identifikasi NO. BW 278.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kulit batang *D. Beccariana* (2,2 kg) dimaserasi dengan etanol (EtOH) (3 X) dan setelah penguapan pelarut dengan tekanan rendah diperoleh ekstrak EtOH (309 g) berupa padatan kental berwarna hitam. Ekstrak EtOH kemudian dipartisi dengan CHCl_3 /air (1:1). Fraksi air kemudian dikeringkan dengan freeze dryer sehingga mendapatkan residu (25,4 g). Larutan CHCl_3 diuapkan dengan vacuum rotary evaporator sehingga mendapatkan fraksi CHCl_3 (166 g). Fraksi CHCl_3 kemudian dipartisi dengan heksana/MeOH (90%) (1:1). Larutan MeOH diuapkan sehingga mendapatkan fraksi MeOH (56 g). Recoveri larutan heksana mendapatkan fraksi heksana (86 g). Semua fraksi (5 fraksi) tersebut diuji aktivitasnya terhadap larva udang *A. salina* (brine shrimp bioassay). Fraksi heksana dengan aktivitas paling tinggi difraksinasi dengan KVC (\varnothing 5 cm) dielusi dengan campuran *n*-heksana:EtOAc yang meningkat kepolarannya dari perbandingan 9,5: 0,5 hingga EtOAc murni, menghasilkan tujuh fraksi utama A (2,1 g), B (3,2 g), C (3,9 g), D(3,4 g), E (4,3 g), F (3,6g) dan G(3,9). Semua fraksi diuji aktivitas dengan larva udang *A. salina*, fraksi F yang menunjukkan

aktivitas paling tinggi difraksinasi dengan KVC (\varnothing 3 cm) dielusi dengan *n*-heksana-EtOAc yang meningkat kepolarannya dari 9 : 1 hingga EtOAc murni diperoleh enam fraksi utama, A1-A6. Selanjutnya fraksi paling aktif A2 berdasarkan bioassay *A. salina* difraksinasi dengan KLT preparatif dengan eluen *n*-heksana:EtOAc (8:2) diperoleh dua fraksi utama B1 dan B2. Fraksi yang paling aktif B1 difraksinasi dengan KLT preparatif dengan eluen *n*-heksana:EtOAc (8:2) diperoleh tiga fraksi C1, C2 dan C3. Pemurnian fraksi paling aktif C1 menghasilkan senyawa **1**.

Analisis GC-MS. Parameter GC adalah sebagai berikut: suhu oven 60 °C, waktu keseimbangan oven 1 menit, suhu injeksi 300 °C, suhu *interface* 300 °C. panjang kolom 30 m, diameter kolom 0,25 mm, tekanan kolom 22 kPa, kecepatan alir di dalam kolom 0,5 mL/menit, kecepatan linier 26,3 cm./sec, *split ratio* 113, total aliran 60 mL/menit, 30 menit; parameter MS: awal *m/z* 33,00, akhir *m/z* 550,00, *scan interval* 0,5 detik, *scan speed* 1250 amu/detik.

Senyawa 1, Padatan berwarna kuning kecoklatan, t.l 114-118 °C, UV (MeOH) λ max, nm: 232 dan 202. IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2740, 2840, 2972, 1710, 1597; EIMS *m/z* 232 [M^+]; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} ppm: 9,40 (1H, s, H-5), 9,37 (1H, s, H-13), 6,58 (1H, *d*, 8,4 Hz, H-4), 6,48 (1H, *d*, 11 Hz, H-8), 2,70 (1H, *m*, H-9), 2,55 (1H, *m*, H-3), 2,09 (1H, *m*, H-2), 1,87 (1H, *ddd*, 1,9 Hz, 6,5 Hz, 12 Hz, H_a -10), 1,78 (1H, *ddd*, 1,9 Hz, 8 Hz, 12 Hz, H_a -1), 1,41 (1H, *dd*, 12 Hz, 12Hz, H_b -10), 1,36 (1H, *dd*, 12 Hz, 7,2 Hz, H_b -1), 1,16 (3H, s, H-12), 1,11 (3H, s, H-14) dan 0,98 (3 H, s, H-15); ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 196,1 (C-5), 194,2 (C-13) 164,1 (C-4), 163,0 (C-8), 140,1 (C-6), 142, 2 (C-7), 48,9 dan 46,0 (C-1 dan C-10), 44,4 dan 42,9 (C-2 dan C-9), 36,8 (C-11), 36,1 (C-3), 30,2 dan 28,0 (C-14 dan C-15), 22,2 (C-12).

Uji Aktivitas terhadap larva udang *Artemia salina*.

Penetasan telur. Telur udang mula-mula ditetaskan dalam air laut. Telur udang yang telah dimasukkan dalam media kemudian diberi aerasi udara dan disinari dengan cahaya lampu. Proses penetasan dibiarkan selama 48 jam.

Penyiapan larutan sampel untuk uji aktivitas. Vial (botol kecil) yang bersih diberi tanda

(dikalibrasi) yang menunjukkan volume 5 ml. Ekstrak kasar yaitu ethanol dan air diuji pada konsentrasi 500, 100 dan 50 ppm, sedang ekstrak kloroform, methanol dan heksana diuji pada konsentrasi 40, 25 dan 10 ppm. Untuk fraksi berikutnya diuji pada 40,20 dan 10 ppm dan fraksi murni diuji pada konsentrasi 20, 10 dan 5 ppm. Untuk uji fraksi-fraksi ditimbang sebanyak 20 mg dan ditambah DMSO 2 ml sebagai larutan induk dan untuk uji fraksi murni ditimbang 2 mg sampel dan dilarutkan dalam 2 ml DMSO. Dari larutan induk tersebut dapat dibuat konsentrasi yang diinginkan dengan cara mengencerkan larutan induk dengan air laut. Untuk kontrol digunakan air laut dan 2% DMSO dalam air laut. Setiap uji dilakukan secara triplo atau 3 x ulangan. Larutan sample dengan konsentrasi tertentu mula-mula dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi (5ml) setengah penuh, sebanyak 10 ekor anak udang dimasukkan dalam vial tersebut, kemudian ditambahkan lagi larutan sampel sampai tanda 5 ml. Assay ini dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah 24 jam dihitung berapa banyak larva udang yang mati dengan kaca pembesar.

Penentuan LC₅₀. Nilai LC₅₀ ditentukan dengan Program Finney (probit analisis) dengan nilai kepercayaan 95% (McLaughlin et al., 1991).

Uji Aktivitas antimikroba

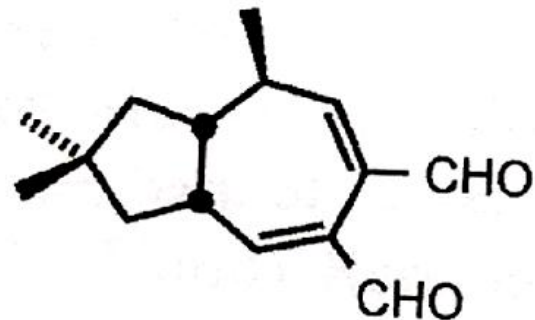
Pembuatan suspensi mikroba uji. Isolat bakteri uji yaitu bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) yang telah diremajakan pada medium NA, diambil sebanyak satu ose dan diinokulasi pada medium NB, selanjutnya diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ sampai media menjadi keruh. Jamur *Candida albicans* yang diremajakan pada media PDA, diambil sebanyak satu ose dan diinokulasi pada medium TSB, selanjutnya diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ sampai media menjadi keruh.

Persiapan sampel untuk uji. Kertas whatman steril dengan diameter 5 mm direndam dalam 0.5 ml 50 $\mu\text{g/mL}$ senyawa 1 dalam CHCl_3 dan diletakan dalam cawan petri steril. Cawan petri dikeringkan dalam vacuum oven pada 40°C selama 15 menit untuk menghilangkan pelarutnya. Prosedur yang sama digunakan kontrol negatif

(CHCl_3) dan kontrol positif erythromycin dan ampicilin.

Uji untuk aktivitas antimikroba. Kertas whatman steril yang telah diimpregnasi dengan sampel dimasukkan dalam suspensi mikroba uji (medium NB untuk bakteri dan medium TSB untuk jamur), kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu 30°C . Diameter zona bening dihitung dengan menggunakan kaliper.

Uji sitotoksitas. Sel P-388 dibiakan dalam media RPMI 1640 dilengkapi dengan 5% FBS (Fetal Bovine Serum) dan kanamisin (100 $\mu\text{g/mL}$). Sel (3×10^3 sel/serum) dikultur dalam microplate yang mengandung 100 μL media pertumbuhan per sumur dan diinkubasi pada 37°C dalam kelembaban atmosfer 5% CO_2 . Sampel (10 μL) dengan berbagai konsentrasi ditambahkan ke dalam tiap-tiap kultur. Setelah 4 jam inkubasi ditambahkan 100 μL larutan 10% SDS-0,01 N HCl ke dalam tiap sumur dan kristal formazan dalam tiap sumur dilarutkan dengan pengadukan menggunakan mikropipet. Pengukuran optical density dilakukan menggunakan mikroplate reader pada panjang gelombang (550 dan 700). Pada semua tahap dilakukan triplo.



Gambar 1. Senyawa 1

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa 1 diperoleh berupa padatan berwarna kuning kecoklatan, t.l 114-118 $^{\circ}\text{C}$. Spektrum UV dalam MeOH memperlihatkan serapan-serapan pada panjang gelombang maksimum 232 nm dan 202 nm. Spektrum IR dalam CHCl_3 menunjukkan serapan-serapan yang tajam pada daerah bilangan gelombang 2750 dan 2820, serapan pada daerah

tersebut adalah sangat khas untuk C-H stretching dari gugus aldehida, hal ini diperkuat dengan adanya serapan tajam dengan intensitas sangat kuat pada bilangan gelombang 1709 yang merupakan serapan dari gugus karbonil (C=O), sedang serapan pada bilangan gelombang 2920 diduga kuat serapan C-H stretching dari $-CH_2$ dan $-CH_3$ alifatik.

Spektrum 1H NMR senyawa **1** memperlihatkan sepasang sinyal gugus karbonil yang diduga kuat gugus aldehida yaitu pada δ_H 9,40 dan 9,37 ppm ini menunjukkan bahwa senyawa **1** mengandung dua gugus aldehida, ini didukung dengan sinyal pada δ_C pada daerah 196,1 dan 194,2 ppm dari NMR karbon-13. Serapan tajam dengan intensitas sangat kuat pada bilangan gelombang 1709 pada spektrum IR meperkuat adanya gugus aldehida dimana pada daerah tersebut adalah khas untuk serapan gugus karbonil C=O, ini juga didukung serapan-serapan tajam pada daerah bilangan gelombang 2750 dan 2820, serapan pada daerah tersebut sangat khas untuk C-H ulur dari gugus aldehida. Spektrum UV dalam MeOH memperlihatkan serapan-serapan pada panjang gelombang maksimum 232 nm dan 202 nm. Serapan pada panjang gelombang 232 nm tersebut sesuai dengan karakteristik spektrum UV yang disebabkan adanya kromofor gugus karbonil (C=O) yang terkonjugasi dengan α,β tidak jenuh yang merupakan hasil dari transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$. Adanya sepasang sinyal doublet pada δ_H 6,48 dan 6,58 ppm dengan konstanta kopling masing-masing 11 Hz dan 8,4 Hz yang diduga adalah proton vinyl yaitu H-4 dan H-8. Tiga sinyal multiplet pada δ_H 2,70, 2,55 dan 2,09 ppm masing-masing adalah sinyal dari H-9, H-3 dan H-2. Dua sinyal pada δ_H 1,87 ppm (1H, *ddd*, $J=$ 1,9 Hz, 6,5 Hz dan 12 Hz,) dan 1,78 ppm (1H, *ddd*, 1,9 Hz, 8 Hz, dan 12 Hz) masing-masing adalah H_a-10 dan H_a-1 . Sedangkan dua sinyal g sama pada δ_H 1.41 ppm (1H, *dd*, 12 Hz, 12Hz) dan 1,36 ppm (1H, *dd*, 12 Hz, 7,2 Hz,) adalah sinyal dari H_b-10 dan H_b-1 . Tiga sinyal singlet pada δ_H 1,16, 1,11 dan 0,98 ppm masing-masing adalah H-12, H-14 dan H-15. Spektrum ^{13}C -NMR memperlihatkan 15 sinyal untuk 15 atom karbon,. Berdasarkan nilai geseran kimianya, 9 atom karbon diantaranya merupakan $C-sp^3$, 4 atom karbon $C-sp^2$ dan 2 sisanya adalah atom karbon karbonil. Spektrum massa dari senyawa **1** menggunakan EIMS memperlihatkan ion $[M^+]$ pada m/z 232 dan

bersama-sama dengan data spektrum ^{13}C NMR senyawa ini, sesuai dengan rumus molekul $C_{15}H_{20}O_2$. Perbandingan pola fragmentasi spektrum massa dengan data base Wiley7. Library mempunyai kesamaan yang tinggi dengan senyawa *velleral*. Maka berdasarkan data fisika dan spektroskopi UV, IR, 1H NMR, ^{13}C NMR dan MS senyawa **1** diduga kuat adalah golongan sesquiterpen lactarane yaitu *velleral*, ((3a*S*,8a*S*)-2,2,8-trimethyl-3,3a,6,8a-tetrahydro-1*H*-azulene-5,6-dicarbaldehyde).

Senyawa 1 memperlihatkan aktivitas terhadap larva udang *A. salina* dengan $LC_{50} = 2,92$ g/mL. Senyawa **1** juga bersifat sitotoksik terhadap sel leukemia P-388 dengan $LC_{50} = 3,39$ g/mL. Hasil uji aktivitas senyawa **1** terhadap bakteri gram (+) *S.aureus*, bakteri gram (-) *E. coli* dan jamur *C.albicans* memperlihatkan bahwa senyawa **1** dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan jamur *C. albicans* tetapi tidak memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri gram (-) *E. coli*. Bahkan senyawa **1** memperlihatkan daya hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibiotik erythromycin terhadap bakteri *S. aureus*.

Tabel 1. Uji aktivitas antimikroba senyawa **1**.

Senyawa	Dosis (ug)	Diameter zona hambat (mm)		
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	25	9	16,6	-
Erythromycin	25	15	14	15
Ampisilin	25	18	22,5	7

Hasil uji aktivitas senyawa **1** tersebut di atas, semuanya sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya, dimana senyawa tidak jenuh α,β -1,4-dialdehida secara umum memang mempunyai aktivitas yang sangat luas yaitu bersifat sitotoksik, mutagenik, bakterisida, fungisida, antifeedant, algaesida, anti-hiperkolestrol, antiinflamatori, pestisida, antitumor, inhibitor kerusakan sel darah merah dan lain-lain (Jonansson et al, 1995). Bahkan sudah banyak senyawa tidak jenuh α,β -1,4-dialdehida yang sudah dipatenkan dan dikomersialkan sebagai obat modern, misalnya *afrodial* untuk mengurangi kolesterol dalam darah dan *warburganal* untuk inaktivator genome virus (Roel B.2000). Khususnya senyawa **1** *laktaran sesquiterpena velleral* yang merupakan

salah satu senyawa tidak jenuh α,β -1,4-dialdehida juga telah lama diakui mempunyai sifat aktivitas yang sangat luas seperti antifeedant, sitotoksik, antibakteri, antijamur (Roel B. 2000). Penemuan senyawa velleral (1) pada spesies *D. beccariana* dalam penelitian ini adalah untuk yang pertama kali. Pada umumnya senyawa golongan sesquiterpen lactarane dihasilkan dari tumbuhan jamur genus *Lactarius*. Senyawa golongan lactarane untuk pertamakali diisolasi dari *Lactarius vellerius*. Selain jamur dari genus *Lactarius* yang merupakan sumber utama dari senyawa lactarane, jamur lain yang dikenal menghasilkan sesquiterpene jenis ini adalah genus *Russula*, *Marasmius* dan *Lentinius*. Penemuan ini mengindikasikan bahwa keberadaan senyawa 1 pada kulit batang tumbuhan *D. beccariana* membuktikan bahwa tumbuhan tersebut berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang mempunyai sifat sitotoksik, antibakteri dan antijamur.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi senyawa bioaktif sesquiterpen lactarane yaitu velleral (1) ((3aS,8aS)-2,2,8-trimethyl-3,3a,6,8a-tetrahydro-1H-azulene-5,6-dicarbaldehyde dari kulit batang tumbuhan *D. beccariana*, yang mempunyai sifat sitotoksik, antibakteri dan antijamur.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Davies, A., Randall, S., and Skinner, G.R.B., 1996. Antiviral Properties of Extract of *Opuntia streptacanta*, *Antiviral Resource*, 30:75-85
- Borris, R. P. 1996. **Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company.** *Journal of Ethnopharmacology*, 51:29-38.
- Carlson, T.J. 1998. Ethnomedical field research, medical plants, and tropical public health. United States: Rainforest Medical, [Online]. Available from: <http://www.xs4all.nl/bulletin/carlso-e.html> [Accessed 21/08/2000].
- Hakim, E.H. 2003. **Bioassay Sebagai Salah Satu Teknik Yang Dikembangkan Dalam Kimia Bahan Alam.** Seminar Sehari Penyusunan Proposal Kimia Bahan Alam. ITB Bandung
- Hamilton, A. 1998. **Human life versus plant life [online].** United States: WWW Global Network, [Online]. Available from: <http://www.panda.org/news/features/06-98/story1.htm>. [Accessed 15/08/2005]
- Heywood, V.H., 1993. **Flowering Plants of The World.** Andromeda Oxford Ltd. London
- Jonassohn, M., Heidrun Anke., Morales, P. and Sterner O.1995. **Structure-Activity Relationship for Unsaturated Dialdehydes 10. Generation of Bioactive Products by Autooxidation of Isoveleral and Merulidial.** *Acta Chemica Scandinavica*, 49 (7), 530-535
- Lazaroff, C. 2000. **Rainforest plants help battle tuberculosis.** *Environment News Service*, August 4, 2000, [Online]. Available from: <http://www.ens.lycos.com/ens/aug2000/2000L-08-04-06.html>. [Accessed 29/08/2000.
- Lense, O.N. 2002. Ethnobotanical study of traditional medicinal plants from Manokwari Regency, West Papua, Indonesia (James Cook University)
- Lewis, W. H., and Elvin-Lewis, M.P. 1995. **Medicinal plants as sources of new therapeutics.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82:16-24.
- MacKinnon, K. 1991. **Economic Value of Biodiversity Conservation Indonesia.** News Letter of The www Indonesia Program, 7 (3): 4-6
- Manach, C., A. Scalbert., C. Moronel., C. Remesy and L. Jiminez. 2004., **Polyphenol: Food Source and Bioavailability.** *J. Am. Of Clinical Nutrition*. 79 (5) 727-747
- Martinez, M. J., Betancourt, J., Alonso-Gonzalez, N., and Jauregui, A. 1996. **Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity.** *Journal of Ethnopharmacology*, 52:171-174.
- McLaughlin, J.L., C.J. Chang and D.L.Smith 1991. **Bioassay for Discovery of Bioactive Natural Products: an update.** In: *Studies Natural Products Chemistry* (Attaur Rahman) (9) Elsevier, Amtersdam, 276-279.
- Price, M,E; Schore, N.E. *Tetrahedron Lett*, 1989, 5865

- Petocz, R.G. 1987. **Konservasi Alam dan Perkembangan di Irian Jaya**. Pustaka Grafitt Press. Jakarta.
- Purwanto, Y. and Waluyo, E.B. 1992. Etnobotani suku Dani di Lembah Baliem, Irian Jaya: suatu telaah tentang pengetahuan dan pemamfaatan sumberdaya alam tumbuhan (Prosiding seminar dan Lokakarya Nasional Ethnobotani I. Cisarua-Bogor). Indonesia Institute of Sciences, Jakarta.
- Roel P. L.Bell. Total Synthesis of Lactarane and Maramane Sesquiterpene, Ph.D thesis, Wageningen University, 2000
- Santoso, B.B., Hernandes, H., Capareda, E., Madamba, L., and Raymundo, L.C., 2000. Isolation and Structure Elucidation A Bioactive compound from The Leaves of *Orthosiphon aristatus*. *Proceeding Seminar Nasional Kimia II ITS Surabaya*
- Santoso, B.B. 2003. Isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif dari beberapa jenis Tumbuhan obat di Manokwari. *Proceeding Seminar Nasional Kimia VITS Surabaya*
- Santoso, B.B., M.J. Sadsoeitoeboen, O. Lensee, S.A. Achmad, dan Y. M. Syah. 2004. Pemberdayaan Keanekaragaman Hayati Tumbuhan Obat Kabupaten Manokwari; Kajian Etnobotani, Botani, Fitokimia dan Aktivitas Antimikroba. *Proceeding Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XIV ITB Bandung*.
- Santoso, B.B., M.J. Sadsoeitoeboen, O. Lensee, S.A. Achmad dan Y.M. Syah. 2005. Uji Aktivitas Antitumor Tumbuhan Obat Kabupaten Manokwari. Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia UPI Bandung.
- Santoso, B.B., M.J. Sadsoeitoeboen, dan O. Lensee.2006. Potensi Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenol Ekstrak Methanol dan Air dari 15 Tumbuhan Obat Kabupaten Manokwari. *Jurnal Natural* Vol.3. No. 1.
- Santoso, B.B., M.J. Sadsoeitoeboen, dan O. Lensee. 2007. Analisis Fitokimia, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antitumor 20 Tumbuhan Obat Kabupaten Manokwari Bagian I. *Seminar Ilmiah Bidang MIPA dan Hibah DIKTI UNIPA Manokwari*
- Santoso, B.B., M.J. sadsoeitoeboen dan O. Lensee. 2008. . Analisis Fitokimia, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antitumor 20 Tumbuhan Obat Kabupaten Manokwari Bagian II. *Seminar Hasil-Hasil Penelitian Yang didanai oleh DIKTI UNIPA Manokwari*.