

## PEMISAHAN DAN PENCIRIAN SEBATIAN SEMULA JADI DARIPADA KAYU

### *Vitex vestita* (VERBENACEAE)

M.A. Siti Aishah<sup>1</sup> & W.A. Yaacob<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Sains dan Teknologi,  
Universiti Malaysia Sabah, 88999 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

<sup>2</sup>Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan  
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia  
43650 Bangi, Selangor, Malaysia

**ABSTRAK.** Sampel kayu *Vitex vestita* (Verbenaceae) telah dikutip dari Hutan Simpan Bukit Belata, Hulu Selangor, Selangor. Kajian ini melibatkan penyaringan fitokimia, keaktifan biologi dan pemencilan komponen kimia dalam ekstrak metanol kayu. Penyaringan fitokimia dijalankan bagi menentukan kehadiran alkaloid, flavonoid, triterpena/steroid dan saponin manakala ujian biologi dijalankan bagi menilai ketoksikan ekstrak tersebut menggunakan ujian kematian anak udang (UKAU). Ujian awal fitokimia mendapati hanya sebatian steroid hadir dalam ekstrak manakala UKAU memberi  $LC_{50} > 1000$  ppm. Pemisahan komponen kimia ekstrak dilakukan dengan menggunakan kromatografi cecair vakum, kromatografi radial dan lapisan nipis penyediaan. Dua sebatian telah dipencilkan dan dikenalpasti sebagai 3-epi-20-hidroksiendison dan 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena. Struktur kedua-dua sebatian dielusidasi dengan pelbagai kaedah spektroskopi seperti spektroskopi ultralembayung (UL), inframerah (IM), jisim dan resonans magnet nukleus (RMN) serta secara perbandingan data spektrum diperolehi dengan data spektrum kepustakaan.

**KATAKUNCI.** *Vitex vestita*, ecdisteroid, sterol, 3-epi-20-hidroksiendison, 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.

**ABSTRACT.** Wood sample of *Vitex vestita* (Verbenaceae) was collected from Bukit Belata Forest Reserve, Hulu Selangor, Selangor. This study involved phytochemical screening, biological activity and isolation of chemical components on the wood methanol extract. Phytochemical screening was carried out to determine the presence of alkaloids, flavonoids, triterpenes/steroids and saponins while biological test was done to evaluate the toxicity of the extract using brine shrimp lethality test (BSLT). The preliminary chemical tests showed the presence of steroids in the extract while the BSLT gave  $LC_{50} > 1000$  ppm. Isolation of chemical components on the extract was done using vacuum liquid, radial and preparative thin layer chromatographies. Two compounds were isolated and identified as 3-epi-20-hydroxyecdysone and 2,3,14,20,22,25-hexahydroxycholesta-4,6-diene. The structures of both compounds were elucidated using several spectroscopic methods such as ultraviolet (UV), infrared (IR), mass and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies and also by comparing the obtained spectral data with literature.

**KEYWORDS.** *Vitex vestita*, ecdysteroids, sterols, 3-epi-20-hydroxyecdysone, 2,3,14,20,22,25-hexahydroxycholesta-4,6-diene.

## PENGENALAN

Tumbuhan Verbenaceae kaya dengan iridoid glikosida di samping itu juga mengandungi sebatian seperti steroid, alkaloid, minyak pati, asid lemak, tanin dan flavanoid. *Vitex* atau 'Chaste Tree @ Chasteberry' mengandungi 250 spesies kebanyakannya tumbuhan herba renek 1- 35 m tinggi yang tumbuh di kawasan tropika dan sub-tropika di seluruh dunia (Jarvie & Ermayanti 1996). Di Asia, beberapa spesies *Vitex* digunakan dalam perubatan tradisional terutamanya *V. agnus-castus*, *V. negundo* dan *V. trifolia*. *Vitex vestita* Wall. atau di Malaysia dipanggil Nyarang Songsang, Halban, Haleban, Leban Tanduk, Leban Hitam, Leban Bunga, Leban Nasi atau Leban Nasi-nasi juga tumbuh di Brunei, Indonesia, Thailand dan Burma. Burkill (1935) pernah melaporkan kewujudannya di Pulau Pinang dan selatan Semenanjung Malaysia. Jika *Vitex vestita* diambil oleh ibu-ibu sedang mengandung, ia mungkin boleh menyebabkan keguguran. Ia merupakan pokok kecil setinggi 1–8 m, tumbuh di hutan tanah rendah, mempunyai daun muda berbentuk eliptik, akuminat panjang, membran trifoliat, pangkal kuneat, urat daun timbul di atas, pubesen di bawah serta mempunyai batang kuning kecoklatan. Ia mempunyai korola seperti silinder kekuningan dengan tiub halus (1- 1.2 cm) dan apeks ovari berinding kelenjar tebal. Stamen mengarah ke dalam dan kalikisnya kampanulat berbentuk piring. Buahnya drup hitam berbentuk oblong (Burkill, 1935).

Kajian terdahulu mendapati kebanyakan *Vitex* mengandungi steroid jenis ekdisteroid contohnya seperti 20-hidroksiekdison dalam *V. rehmanni*, *V. sereti*, *V. madiensis*, *V. thyrsoiflora*, *V. glabrata*, *V. megapotamica*, *V. pinnata* dan *V. canescens* (Suksamrarn & Sommechai 1993) selain juga mengandungi C-glukosilflavon, diterpena dan iridoid (Sridhar *et al.* 2005, Kuruuzum-Uz *et al.* 2003, Hoberg *et al.* 1999). Ekdisteroid diletakkan di bawah triterpenoid yang terdiri daripada triterpena saponin, fitosterol dan fitoekdisteroid. Ia hadir sama ada dalam tumbuhan (fitoekdisteroid), invertebrata (zooekdisteroid) atau kedua-duanya. Ekdisteroid dan terbitannya terkenal sebagai hormon bersalin kulit serangga yang biasanya hadir pada kepekatan rendah sekitar 0.1% atau kurang daripada berat kering tumbuhan (Dinan, 2001). Ekdisteroid adalah steroid polar, kelarutannya seperti gula, serta hadir secara bebas atau berkonjugat dengan berat molekul antara 464 (ekdison dan ponasteron A) ke 480 (20-hidroksiekdison) serta mempunyai antara 19 ke 30 bilangan atom karbon (Lafont, 1997). Walaupun variasi struktur gelang steroid ini agak terhad tetapi variasi utamanya terletak pada bilangan atom karbon, kedudukan serta orientasi kumpulan hidroksi dan tahap konjugatan yang wujud. Kumpulan hidroksi biasanya berada pada C-2, C-3, C-14, C-20R dan C-22R (Dinan, 2001).

Sehingga kini, belum ada sebarang laporan yang diterbitkan mengenai sebatian yang dipisahkan daripada *Vitex vestita*. Wong (2004) sekadar mengesan kewujudan sejumlah tujuh sebatian sterol dalam dua fraksi separa tulen ekstrak daun *Vitex vestita* iaitu kolest-5-en-3-ol, etilkolest-5-en-3-ol, ergost-5-en-3-ol, stigmasta-5,22-dien-3-ol, stigmasta-5,23-dien-3-ol, stigmast-5-en-3-ol dan stigmast-4-en-3-on. Sehubungan itu, ujian fitokimia dan kematian anak udang dijalankan terhadap ekstrak metanol kayu *Vitex vestita*. Pemencilan sebatian kimia tulen dan mengenalpasti struktur komponen juga dijalankan dengan kaedah kromatografi serta alatan spektroskopi inframerah, resonans magnet nukleus proton (RMN <sup>1</sup>H) dan karbon-13 (RMN <sup>13</sup>C), ultra lembayung dan jisim.

## BAHAN DAN KAEDAH

### Bahan Tumbuhan

Sampel kayu *Vitex vestita* dipungut dari Hutan Simpan Bukit Belata, Hulu Selangor, Selangor pada bulan Ogos 2005. Satu spesimen baucer (SK1080) disimpan di Institut Biosains, Universiti Putra Malaysia. Kayu *Vitex vestita* dipotong kecil dengan parang, dibiarkan kering di tempat terbuka dan teduh sebelum dikisar menjadi serbuk dengan mesin pengisar kayu mekanikal.

### Pengekstrakan

Kayu *Vitex vestita* yang telah dikisar halus, diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol selama 24 jam di dalam alat Soxhlet. Pelarut metanol digunakan untuk mengekstrak sebatian yang lebih polar. Hasil pengekstrakan dipekatkan dengan alat 'pengewap berputar' bagi mendapatkan ekstrak mentah. Sampel ekstrak berwarna hijau kehitaman ini digunakan untuk melakukan ujian fitokimia, ujian keaktifan biologi dan pemisahan sebatian.

### Ujian Fitokimia

Kehadiran alkaloid dalam ekstrak metanol kayu *Vitex vestita* ditentukan mengikut kaedah Culvenor dan Fitzgerald (1963) dengan reagen Mayer. Steroid atau triterpenoid dan saponin ditentukan dengan kaedah Simes *et al.* (1959) masing-masing berdasarkan ujian kimia Liebermann-Burchard yang melibatkan kemunculan warna dan ujian fizikal buih seperti sarang lebah yang terbentuk. Kehadiran flavonoid ditentukan menerusi perbandingan warna ekstrak yang mengandungi beberapa titis asid sulfurik pekat dengan ekstrak yang mengandungi asid sulfurik pekat dan pita kecil berkilat magnesium (Fasihuddin & Hasmah 1993).

### Ujian Kematian Anak Udang (UKAU)

Keaktifan biologi sampel diuji dengan ujian kematian anak udang *Artemia salina* menggunakan kaedah Meyer *et al.* (1982). Ujian UKAU di ulang sebanyak tiga kali di mana bilangan anak udang masih hidup selepas 24 jam di dalam larutan ekstrak pada kepekatan tertentu dianalisis menggunakan program komputer Finney (DOS).

### Pemisahan Sebatian Tulen

Ekstrak metanol kayu *Vitex vestita* (10 g) yang dipra-jerapkan pada gel silika 60 PF<sub>254</sub> 230-400 mesh (Merck) difraksikan dengan kromatografi cecair vakum menggunakan gel silika 60 7747 (Merck) bermula dengan heksana, kemudian kepolaran meningkat heksana-kloroform dan akhir sekali kloroform-metanol. Salah satu fraksi (0.24 g) dilakukan kromatografi radial menggunakan plat gel silika 60 PF<sub>254</sub> 7749 (Merck) setebal 0.5 mm bermula dengan heksana-etil asetat 5:5, diikuti kepolaran bertambah heksana-etil asetat tersebut, dan kemudian kepolaran meningkat etil asetat-metanol sehingga mencapai nisbah 5:5. Salah satu fraksi (64 mg) dilakukan kromatografi lapisan nipis penyediaan dengan gel silika siap-salut setebal 0.25 mm bagi plat plastik 60 PF<sub>254</sub> 5735 (Merck) bagi memisahkan dua sebatian tulen.

## Instrumentasi

Ultra-Lembayung (UL) yang digunakan adalah spektrometer UV-cahaya tampak daripada model UV-1650 PC. Bagi penggunaan spektroskopi jisim, FAB-MS di Universiti Chiba, Jepun telah digunakan bagi penentuan berat molekul serta formula struktur suatu sebatian organik yang ditemui. Inframerah (IM) yang digunakan untuk mengenalpasti kumpulan berfungsi pula adalah daripada model jenis GX jenama Perkin Elmer. Instrumen spektroskopi FT-NMR 400 dari model ECP 400 MHz jenama JEOL digunakan bagi menentukan RMN  $^1\text{H}$  - 1 dimensi, RMN  $^1\text{H}$  - 2 dimensi (COSY, NOESY), RMN  $^{13}\text{C}$  - 1 dimensi serta RMN  $^{13}\text{C}$  - 2 dimensi (HMBC, HMQC) dalam  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

## HASIL DAN PERBINCANGAN

### Ujian Fitokimia

Daripada ujian fitokimia yang dijalankan ke atas ekstrak metanol kayu *Vitex vestita*, ia didapati hanya positif terhadap kehadiran sebatian steroid. Ini selari dengan sebatian ekdisteroid 3-*epi*-20-hidroksiekdison dan sebatian sterol 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena yang dipisahkan daripada ekstrak tersebut.

### Ujian Kematian Anak Udang (UKAU)

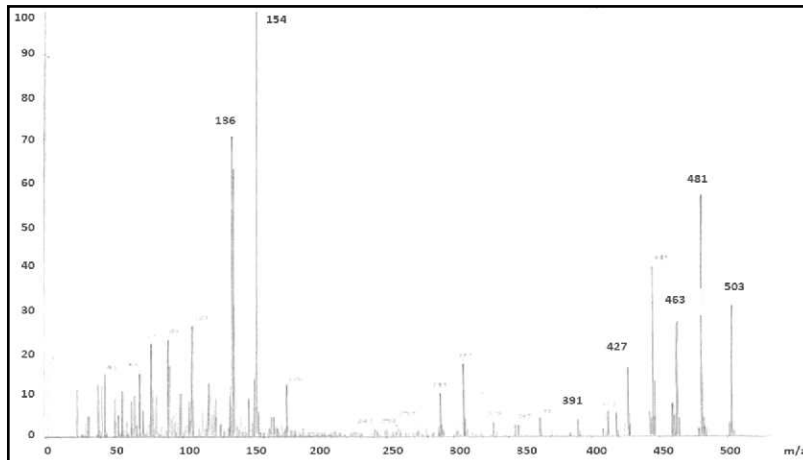
Setelah data kematian anak udang dianalisis menggunakan program Finney, didapati ekstrak adalah bersifat tidak toksik berdasarkan nilai  $\text{LC}_{50}$  yang melebihi 1000 ppm. Nilai  $\text{LC}_{50}$  kurang daripada 500 ppm bagi ekstrak menunjukkan bahawa ia adalah toksik atau bioaktif (Nik Idris *et al.*, 2001).

### Pemisahan sebatian Tulen

Bagi pemisahan kromatografi, dua sebatian tulen berjaya diasingkan iaitu 3-*epi*-20-hidroksiekdison dan 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.

**3-*epi*-20-hidroksiekdison.** (8 mg), hablur putih; IM  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3430 (OH), 2526, 2079, 1644 (enon C=C, C=O), 1448 (C-H bengkokan), 1114 (C-O), 1016, 970; UL  $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$  (log  $\epsilon$ ) 247 (0.74) (MeOH); RMN  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ : lihat Jadual 1; FAB-MS (mod ion positif)  $m/z$  (% kelimpahan): 481 (55)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 463 (26)  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 445 (40)  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ , 427 (26)  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ , 413 (6), 391(4)  $[\text{M}+\text{H}-6\text{H}_2\text{O}]^+$ , 307 (18), 289 (10).

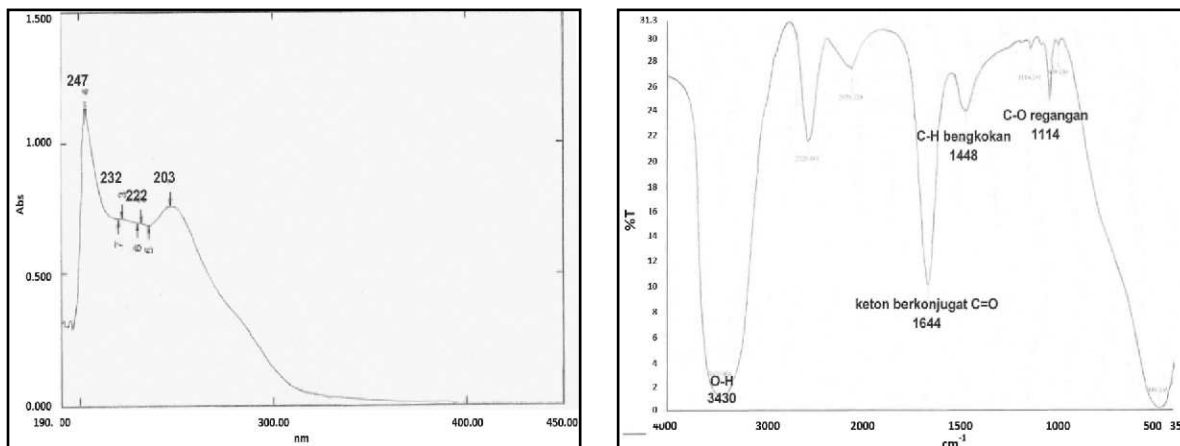
Ion molekul  $[\text{M}+\text{H}]^+$  481 dalam spektrum jisim FAB-MS datangnya daripada molekul berjisim molar 480 yang sepadan dengan 3-*epi*-20-hidroksiekdison dengan formula  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$ . Ion fragmen bagi ion molekul  $[\text{M}+\text{H}]^+$  selepas kesemua enam molekul air terkeluar pada  $m/z$  391  $[\text{M}+\text{H}-6\text{H}_2\text{O}]^+$  - di samping ion fragmen pada  $m/z$  463  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 445  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$  dan 427  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$  - mengesahkan kewujudan enam kumpulan hidroksi dalam 3-*epi*-20-hidroksiekdison.



**Rajah 1. Spektrum spektroskopi jisim bagi 3-epi-20-hidroksiiekdison.**

Serapan maksimum pada 247 nm dalam metanol dalam spektrum UL berpunca daripada rangkaian karbonil  $\alpha,\beta$ -tak tepu dalam 3-epi-20-hidroksiiekdison. Nilai ini hampir sama dengan apa yang dilaporkan oleh Cybersales (2005) untuk 3-epi-20-hidroksiiekdison dari spesies *Leuzea carthamoides* dalam pelarut sama iaitu pada 245 nm.

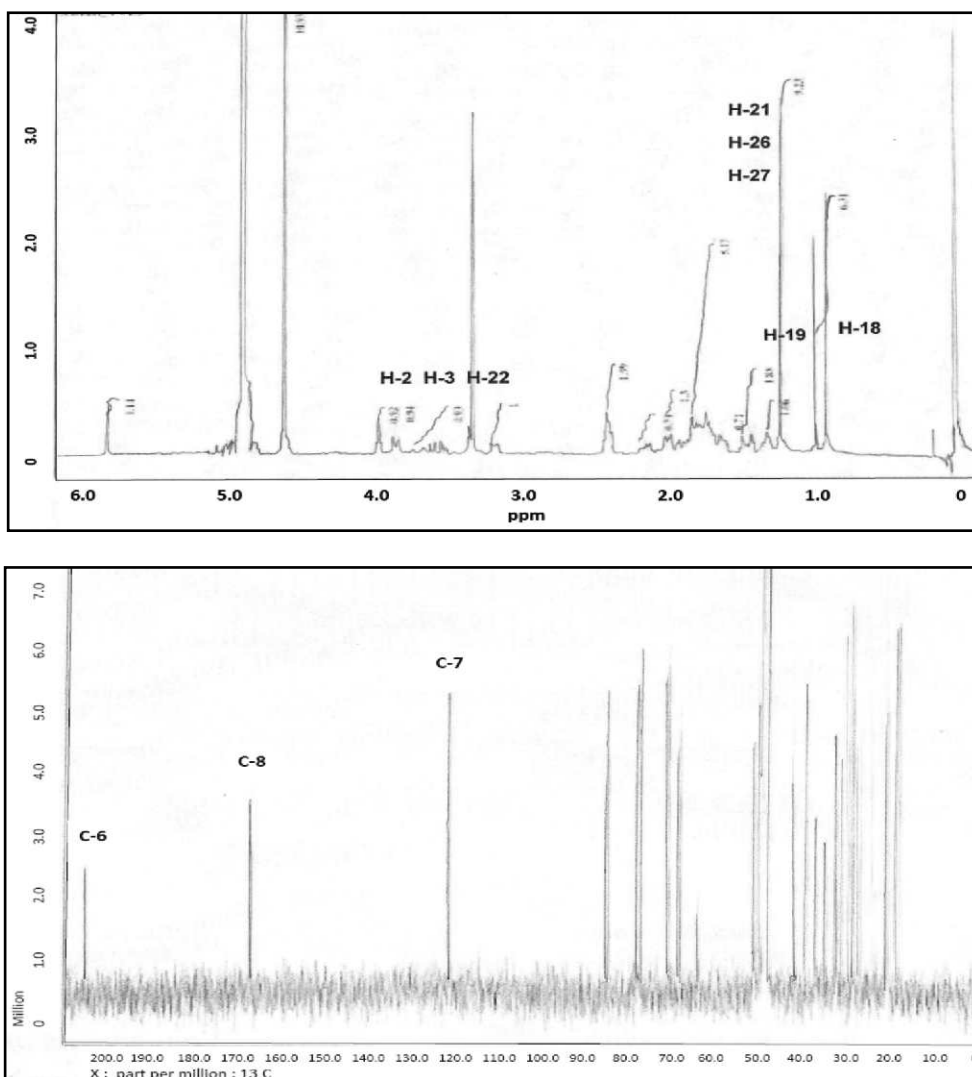
Puncak serapan IM pada  $3430\text{ cm}^{-1}$  oleh enam kumpulan hidroksi dan  $1644\text{ cm}^{-1}$  oleh kumpulan karbonil 2-sikloheksenon dalam 3-epi-20-hidroksiiekdison adalah sepadan dengan nilai yang dilaporkan oleh Cybersales (2005) pada  $3500$  dan  $1645\text{ cm}^{-1}$ .



**Rajah 2. Spektrum ultra-lembayung dan inframerah bagi 3-epi-20-hidroksiiekdison.**

Spektrum RMN- $^{13}\text{C}$  bagi 3-epi-20- hidroksiiekdison menunjukkan ia mempunyai 27 karbon. Kumpulan karbonil  $\alpha,\beta$ -tak tepu dalam 3-epi-20-hidroksiiekdison memberikan tiga isyarat dalam spektrum RMN- $^{13}\text{C}$  pada  $\delta$  205.0 (C-6), 120.8 (C-7), dan 166.6 (C-8) serta satu isyarat dalam spektrum RMN- $^1\text{H}$  pada  $\delta$  5.81 (H-7). Kehadiran kumpulan karbonil  $\alpha,\beta$ -tak tepu serta kemunculan isyarat RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  bagi H-3/C-3 pada  $\delta$  3.84/67.1, H-18/C-18 pada  $\delta$  0.89/16.7, H-19/C-19 pada  $\delta$  0.97/23.0 membuktikan bahawa 3-epi-20-hidroksiiekdison adalah suatu ekdisteroid. Puncak RMN- $^{13}\text{C}$  yang terpisah bagi karbon metilena C-11 pada  $\delta$  20.1 dan

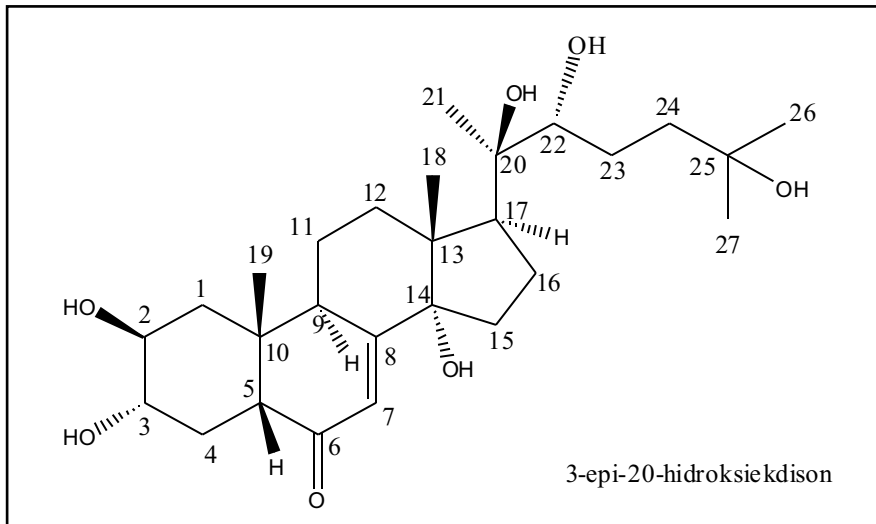
C-16 pada  $\delta$  19.7 adalah setanding dengan isyarat bertangkup pada  $\delta$  21.7 daripada kajian Parameswaran *et al.*, (2001). Proton bagi lima kumpulan metil dalam sebatian 3-*epi*-20-hidroksiekdison muncul sebagai singlet dalam spektrum RMN- $^1\text{H}$  pada  $\delta$  0.89 (H-18), 0.97 (H-19), 1.20 (H-21, H-27) dan 1.19 (H-26). Bagi proton metilena hanyalah H-1 ( $\delta$  1.71, t), H-4 ( $\delta$  1.43, t), yang berjaya ditentukan manakala bagi hidrogen tertier hanyalah H-5 ( $\delta$  1.80, m) dan H-9 ( $\delta$  3.12-3.17, br). Spektrum COSY bagi 3-*epi*-20-hidroksiekdison memperlihatkan berlakunya interaksi H-3 dengan H-2, H-4 dan H-5; H-9 dengan H-1, H-5 dan H-7; serta H-2 dengan H-1 dan H-3. Isyarat puncak proton dan karbon disokong oleh korelasi antara kedua-duanya secara dua, tiga, atau lebih ikatan dalam spektrum HMBC. Proton H-7 berganding dengan C-14; H-18 dengan C-12, C-14 dan C-17; H-19 dengan C-1, C-4, C-5 dan C-9; H-21 dengan C-17 dan C-20; H-26 dengan C-24, C-25 dan C-27; serta H-27 dengan C-24, C-25 dan C-26. Perbandingan nilai anjakan kimia dalam kajian ini dengan nilai daripada kajian yang dijalankan oleh Isaac *et al.*, (1983), Suksamrarn *et al.*, (1995), dan Cybersales (2005) mengesahkan bahawa sebatian yang diperolehi sememangnya 3-*epi*-20-hidroksiekdison.



**Rajah 3. Spektrum Resonans Magnet Nukleus Karbon-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) dan Proton (RMN  $^1\text{H}$ ) bagi 3-*epi*-20-hidroksiekdison.**

**Jadual 1. Data spektrum RMN-<sup>1</sup>H dan -<sup>13</sup>C, perkaitan HMBC serta data spektrum RMN-<sup>13</sup>C kepustakaan bagi 3-*epi*-20-hidroksiekdison.**

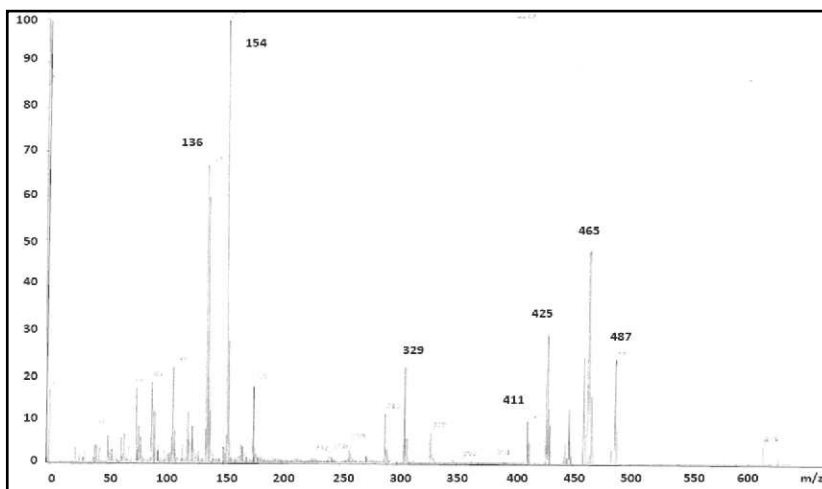
No. Karbon	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Perkaitan HMBC	Nilai Kepustakaan $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (Suksamrarn <i>et al.</i> 1995)
1	37.9	1.71 <i>t</i>	-	38.0
2	67.3	3.94-3.99 <i>m</i>	-	68.3
3	67.1	3.84 <i>dt</i> ( $J = 11.7$ ; 3.5 Hz)	-	68.2
4	33.7	1.43 <i>t</i>	-	32.5
5	50.4	1.80 <i>m</i>	-	51.4
6	205.0	-	-	203.5
7	120.8	5.81 <i>d</i> ( $J = 2.2$ Hz)	C-14	121.7
8	166.6	-	-	166.1
9	36.0	3.12-3.17 <i>br</i>	-	34.6
10	26.0	-	-	38.8
11	20.1	-	-	21.2
12	31.1	-	-	32.1
13	62.9	-	-	48.2
14	83.9	-	-	84.4
15	31.5	-	-	31.8
16	19.7	-	-	21.6
17	49.2	-	-	50.2
18	16.7	0.89 <i>s</i>	C-12, C-14, C-17	17.9
19	23.0	0.97 <i>s</i>	C-1, C-4, C-5, C-9	24.5
20	76.6	-	-	77.0
21	19.7	1.20 <i>s</i>	C-17, C-20	21.7
22	77.1	3.48-3.60 <i>m</i>	-	77.7
23	30.4	-	-	27.5
24	41.0	-	-	42.6
25	69.9	-	-	69.8
26	27.6	1.19 <i>s</i>	C-24, C-25, C-27	30.1
27	28.3	1.20 <i>s</i>	C-24, C-25, C-26	30.2



Rajah 4. Struktur kimia bagi 3-*epi*-20-hidroksiekdison

**2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.** (4 mg), hablur putih; IM  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3392 (OH), 2945, 2833, 2510, 2215, 2040, 1656 (diena C=C), 1451, 1114 (C-O), 1027; UL  $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$  ( $\log \epsilon$ ) 238 (1.88) (MeOH); RMN- $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ : lihat Jadual 2; FAB-MS (mod ion positif)  $m/z$  (% kelimpahan): 487 (23)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 465 (48)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 447 (12)  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 429 (28)  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ , 411 (10)  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ , 329 (7), 307 (21), 289 (11).

Spektrum jisim FAB-MS sebatian ini memberikan ion molekul  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  487 dan  $[\text{M}+\text{H}]^+$  465 dari molekul berjisim molar 464. Ion fragmen bagi ion molekul  $[\text{M}+\text{H}]^+$  pada  $m/z$  447  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 429  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$  dan 411  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$  - fragmen setara juga wujud dalam 3-*epi*-20-hidroksiekdison di atas - mencerminkan kehadiran beberapa kumpulan hidroksi dalam 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena. Berbeza dengan 3-*epi*-20-hidroksiekdison, 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena tidak menghasilkan puncak  $[\text{M}+\text{H}-6\text{H}_2\text{O}]^+$  pada  $m/z$  357 kemungkinan besar akibat kehadiran ikatan dubel eksosiklik C4-C5 yang menghalang pelenyapan air bagi kumpulan hidroksi pada C-3.

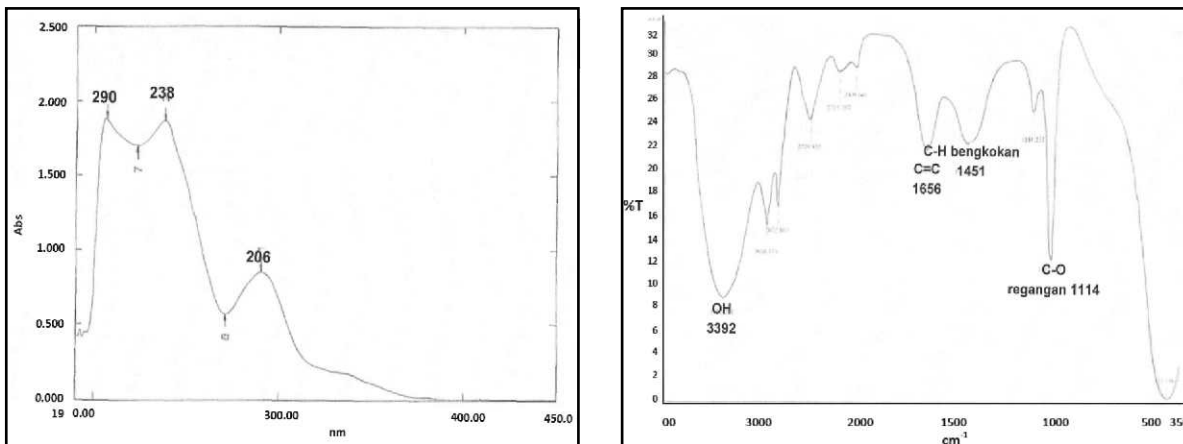


Rajah 5. Spektrum spektroskopi jisim bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.



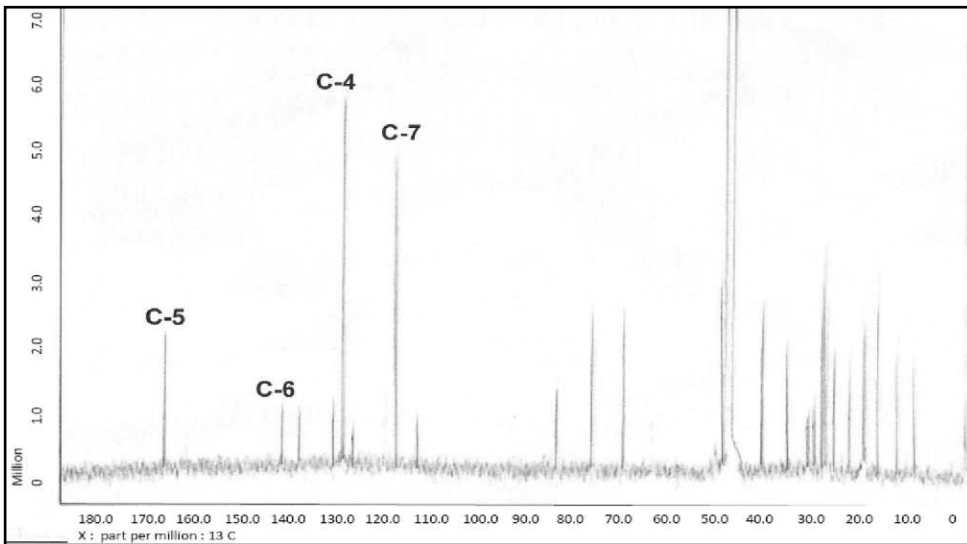
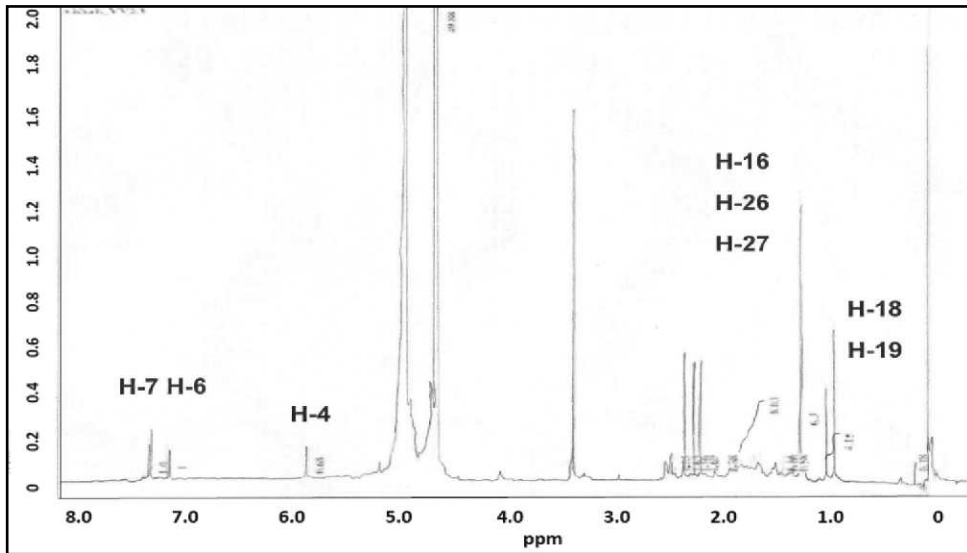
Sebatian ini memberikan serapan UL pada  $\lambda_{\max}$  238 nm dalam pelarut metanol yang menghampiri nilai jangkaan pada  $\lambda_{\max}$  234 nm mengikut petua Woodward-Fieser bagi diena transoid dengan tiga residu gelang dan satu ikatan dubel eksosiklik (Pavia *et al.*, 2001).

Analisis IM bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena pula menunjukkan puncak pada 3392, 1656, 1451, 1114 dan 1027  $\text{cm}^{-1}$ . Puncak pada 3392  $\text{cm}^{-1}$  menandakan kehadiran enam kumpulan hidroksi dalam 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena. Puncak pada 1656  $\text{cm}^{-1}$  dengan keamatan jauh lebih rendah berbanding puncak karbonil 3-*epi*-20-hidroksiekdison (pada 1644  $\text{cm}^{-1}$ ) menunjukkan kehadiran rangkaian diena berkonjugat dalam 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.



**Rajah 6. Spektrum ultra-lembayung dan inframerah bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.**

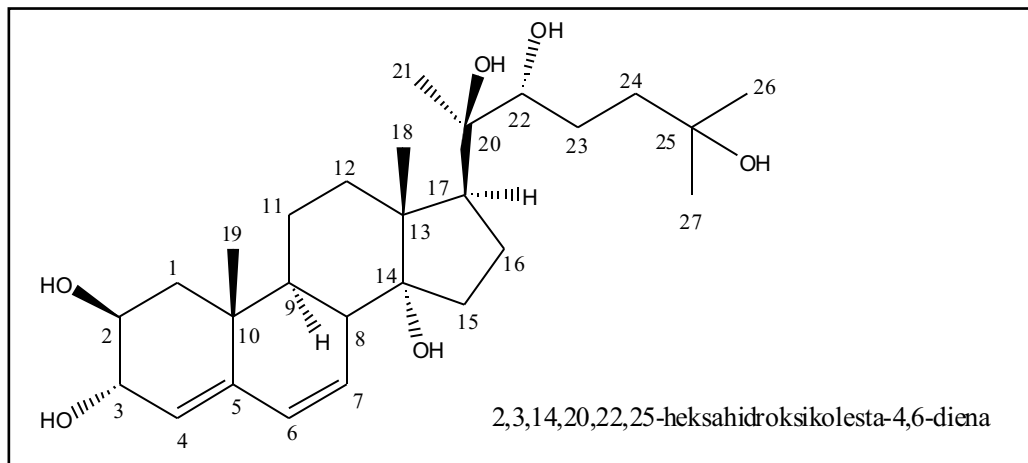
Spektrum RMN- $^{13}\text{C}$  menunjukkan bahawa sebatian 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena mempunyai 27 karbon. Kehadiran rangkaian diena dalam sebatian ditunjukkan oleh isyarat RMN- $^{13}\text{C}$  bagi C-5 pada  $\delta$  167.2 dan RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  bagi H-4/C-4 pada  $\delta$  5.81/120.6, H-6/C-6 pada  $\delta$  7.09/117.9, dan H-7/C-7 pada  $\delta$  7.26/129.2. Isyarat RMN- $^{13}\text{C}$  bagi C-3 pada 76.6, dan RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  H-18/C-18 pada  $\delta$  0.89/16.7 serta H-19/C-19 pada  $\delta$  0.97/23.0 serta kehadiran kumpulan diena menunjukkan bahawa 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena adalah suatu sterol. Proton bagi lima kumpulan metil dalam sebatian memberikan isyarat singlet RMN-1H pada  $\delta$  0.89 (H-18), 0.97 (H-19), 1.20 (H-21, H-27) dan 1.19 (H-26). Bagi proton metilena, hanya multiplet H-11 ( $\delta$  1.44), H-12 ( $\delta$  1.63), H-15 ( $\delta$  2.12) dan H-16 ( $\delta$  1.20) berjaya ditentukan manakala bagi hidrogen tertier pula adalah multiplet H-8 ( $\delta$  1.28), H-9 ( $\delta$  1.93) dan H-17 ( $\delta$  1.84). Dalam spektrum RMN- $^{13}\text{C}$ , puncak pada  $\delta$  69.96 dan 69.97 dijangka sebagai puncak bagi C-2 atau C-25 manakala puncak  $\delta$  76.60 dan 76.61 bagi C-3 atau C-20. Isyarat puncak proton dan karbon disokong oleh korelasi dua atau tiga ikatan dalam spektrum HMBC. Proton H-16 berkorelasi dengan C-17 dan C-20; H-18 dengan C-12, C-14 dan C-17; H-19 dengan C-9; H-26 dengan C-24, C-25 dan C-27; serta H-27 dengan C-24, C-25 dan C-26. Berdasarkan spektrum COSY bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena, berlaku interaksi H-9 dengan H-8, H-11 dan H-12; serta H-12 dengan H-8, H-9, H-11 dan H-17; serta H-17 dengan H-12 dan H-15.



**Rajah 7. Spektrum Resonans Magnet Nukleus Karbon-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) dan Proton (RMN  $^1\text{H}$ ) bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.**

**Jadual 2. Data spektrum RMN-<sup>1</sup>H dan -<sup>13</sup>C serta perkaitan HMBC bagi 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolesta-4,6-diena.**

No. Karbon	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Perkaitan HMBC
1	25.9	-	-
2	69.96	-	-
3	76.6	-	-
4	120.6	5.81 <i>d</i> ( <i>J</i> = 2.6 Hz)	-
5	167.2	-	-
6	117.9	7.09 <i>d</i> ( <i>J</i> = 8.8 Hz)	-
7	129.2	7.26 <i>d</i> ( <i>J</i> = 8.4 Hz)	-
8	64.0	1.28 <i>br</i>	-
9	36.2	1.83 <i>m</i>	-
10	51.0	-	-
11	20.1	1.44 <i>m</i>	-
12	31.9	1.63 <i>m</i>	-
13	47.9	-	-
14	84.1	-	-
15	31.3	2.12	-
16	19.6	1.20	C-17, C-20
17	49.0	1.86 <i>m</i>	-
18	16.7	0.89 <i>s</i>	C-12, C-14, C-17
19	23.0	0.97 <i>s</i>	C-9
20	76.61	-	-
21	19.4	1.20 <i>s</i>	-
22	77.1	3.48-3.60 <i>m</i>	-
23	30.2	-	-
24	41.0	-	-
25	69.97	-	-
26	27.6	1.19 <i>s</i>	C-24, C-25, C-27
27	28.3	1.20 <i>s</i>	C-24, C-25, C-26



**Rajah 8. Struktur kimia bagi 3-epi-20-hidroksiekdison**

## KESIMPULAN

Ekstrak kasar metanol sampel kayu *Vitex vestita* yang diperolehi dari pengekstrakan telah digunakan untuk ujian fitokimia, ujian keaktifan biologi dan pemisahan sebatian tulen. Ujian fitokimia menunjukkan bahawa ekstrak kasar mengandungi steroid. Bagi ujian keaktifan biologi, didapati bahawa ekstrak kasar sampel tidak bersifat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> lebih daripada 1000 ppm. Pemisahan sebatian pula berjaya memisahkan dua sebatian tulen iaitu 3-*epi*-20-hidroksiekdison (hablur putih) dan 2,3,14,20,22,25-heksahidroksikolest-4,6-diena (serbuk putih) yang ditentukan strukturnya menggunakan teknik spektroskopi iaitu spektroskopi ultralembayung (UL), spektroskopi resonans magnet nukleus proton (RMN <sup>1</sup>H) dan karbon-13 (RMN <sup>13</sup>C), spektroskopi jisim (SJ) dan inframerah (IM).

## PENGHARGAAN

Penulis ingin merakamkan penghargaan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana membiayai kajian ini menerusi dana penyelidikan fundamental dengan kod bernombor ST-018-2005. Pengecaman pokok dilakukan oleh ahli botani En. Shamsul Khamis dari Institut Biosains, Universiti Putra Malaysia.

## RUJUKAN

- Burkill, I.H. 1935. *A dictionary of economic products of the Malay Peninsula*. Jil. 2. London: Crown Agents for the Colonies.
- Culvenor, C.C.J. & Fitzgerald, J.S. 1963. A field method for alkaloid screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **52**: 303-304.
- Cybersales. 2005. Ecdybase. (atas talian) <http://ecdybase.org/index.php?&action=browse&row=167> (1 Disember 2006).
- Dinan, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* **57**: 325-339.
- Fasihuddin, A. & Hasmah, R. 1993. *Kimia hasilan semula jadi dan tumbuhan ubatan*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Hoberg, E., Orjala, J., Meier, B. & Sticher, O. 1999. Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus castus*. *Phytochemistry* **52(8)**: 1555-1558.
- Isaac, R.E., Rose, M.E., Rees, H.H. & Goodwin, T.W. 1983. Identification of the 22-phosphate esters of ecdysone, 2-deoxyecdysone, 20-hydroxyecdysone and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone from newly laid eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry Journal* **213**: 533-541.
- Jarvie, J.K. & Ermayanti. 1996. Tree genera of Borneo-descriptions and illustrations. (atas talian) [www.phylodiversity.net/.../Hemscan/Vitex.HTM](http://www.phylodiversity.net/.../Hemscan/Vitex.HTM) (31 Mei 2006).
- Kuruuzum-Uz, A., Stroch, K., Demirezer, L.O. & Zeeck, A. 2003. Glucosides from *Vitex agnus castus*. *Phytochemistry* **63(8)**: 959-964.
- Lafont, R. 1997. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**: 3-20.

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45(1)**: 31-34.
- Nik Idris Yusoff, Siti Zaiton Mat So'ad, Ujang Suki, A.Z. Ibrahim, A. Latif, Ikram M. Said. 2001. Phytochemical screening of Air Hitam Forest Reserve: isolation of ariskanin-A from *Thottea corymbosa* (Griff.) Ding Hou (Aristolochiaceae). *Journal of Tropical Agricultural of Science* **24(1)**: 53-55.
- Parameswaran, P.S., Naik, C.G., Gonsalves, C. & Achuthankutty, C.T. 2001. Isolation of 2-deoxyecdysterone, a novel oxytocic agent, from a marine *Zoanthus* sp. *Journal Indian Institute of Science* **81(3)**: 169-173.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M. & Kriz, G.S. 2001. *Introduction to spectroscopy*. Edisi ke-3. USA: Thomson Learning, Inc.
- Simes, J.J.H., Tracey, J.G., Webb, L.J. & Dunstan, W.J. 1959. An Australian phytochemical survey. III. Saponins in Eastern Australian flowering plants. *Australia, Commonwealth Sci. Ind. Research Organization, Bull.* No. **281**: 31pp.
- Sridhar, C., Rao, K.V. & Subbaraju, G.V. 2005. Flavanoids, triterpenoids and a lignan from *Vitex altissima*. *Phytochemistry* **66(14)**: 1707-1712.
- Suksamrarn, A. & Sommechai, C. 1993. Ecdysteroids from *Vitex pinnata*. *Phytochemistry* **32(2)**: 303-306.
- Suksamrarn, A., Somechai, C., Charulpong, P. & Chitkul, B. 1995. Ecdysteroids from *Vitex canescens*. *Phytochemistry* **38(2)**: 473-476.
- Wong, C.L. 2004. The chemicals constituents and bioactivity studies of four Vitex species and *Phyllanthus watsonii*. (atas talian) [www.sps.utm.my/abstracts/abstract.asp?nom=393&yearcode=2004&faculty=faculty%20of%20Science&item1=name](http://www.sps.utm.my/abstracts/abstract.asp?nom=393&yearcode=2004&faculty=faculty%20of%20Science&item1=name) (31 Mei 2006).

