

REVIEW: Ellagitannin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi

REVIEW: Ellagitannin; biosynthesis, isolation, and biological activities

UDHI EKO HERNAWAN*, AHMAD DWI SETYAWAN**

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

Korespondensi: *udhi_z@myquran.com, **biodiv@uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 14 Januari 2003. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. Ellagitannin is one of the bioactive groups produced by some medicinal plants. Ellagitannin is a hydrolyzable tannin compound biosynthesized via shikimic acid – gallic acid – pentagalloylglucose pathway. Ellagitannin can be isolated by cascade extraction procedures followed by column chromatography method and preparative HPLC method. The biological activities of ellagitannin are caused by the molecular bond between ellagitannin and some other compound, especially protein that makes complex compounds and changes physiological processes in cells or tissues of the living things. Ellagitannin's biological activities included anti-diabetic, anti-microbes, anti-viruses, anti-hypertension, anti-oxidative, and anti-cancer or anti-tumor.

Keywords: ellagitannin, biosynthesis, isolation, extraction, biological activities.

PENDAHULUAN

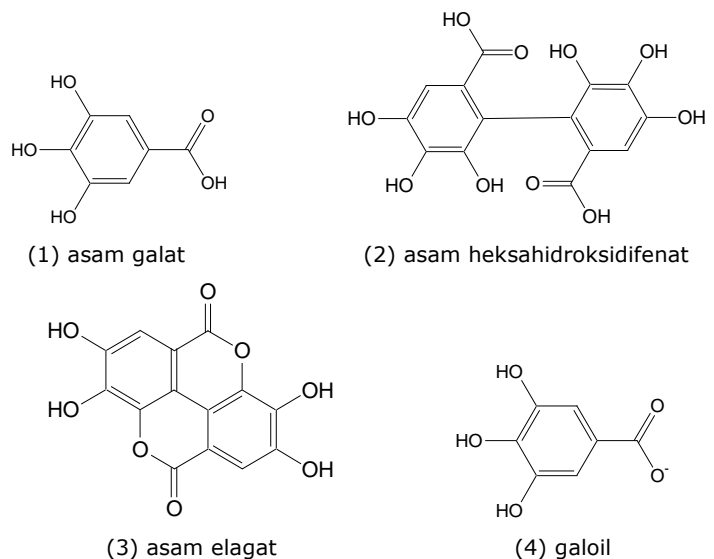
Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan utama dalam pengobatan telah menjadi bagian dari kebudayaan hampir setiap bangsa di dunia (Lee *et al.*, 2000). Sekitar 60% penduduk dunia hampir sepenuhnya menggantungkan diri pada tumbuhan untuk menjaga kesehatan (Farnsworth, 1994). Sedangkan menurut perkiraan WHO, lebih dari 80% penduduk negara-negara berkembang tergantung pada ramuan tradisional untuk mengatasi masalah kesehatan (Khan *et al.*, 2002). Peran tumbuhan sebagai bahan obat sama pentingnya dengan perannya sebagai makanan (Raskin *et al.*, 2002).

Tumbuhan menghasilkan berbagai macam senyawa aktif yang memberikan efek farmakologi. Umumnya, senyawa aktif tersebut tidak berperan penting dalam metabolisme tumbuhan, sehingga sering disebut sebagai metabolit sekunder (Stepp dan Moerman, 2001; Liu *et al.*, 1998). Metabolit sekunder telah lama diketahui sebagai sumber terapi medis yang efektif dan penting, misalnya sebagai obat anti-bakteri dan anti-kanker (Cragg, 1997). Senyawa ini secara terus menerus menjadi sumber utama berbagai obat berkehasiatan penting (Harvey, 2000). Dalam praktek pengobatan tradisional, masyarakat telah memanfaatkan senyawa aktif dari berbagai tumbuhan dalam bentuk ramuan obat, untuk menyembuhkan penyakit. Senyawa aktif dalam tumbuhan telah menjadi sumber inspirasi untuk terapi penyakit yang sulit atau mahal pengobatannya (Raskin *et al.*, 2002).

Senyawa aktif tumbuhan dapat dikelompokkan dalam empat golongan, yaitu: fenol, alkaloid, terpenoid, dan asam amino non protein. Penggolongan tersebut

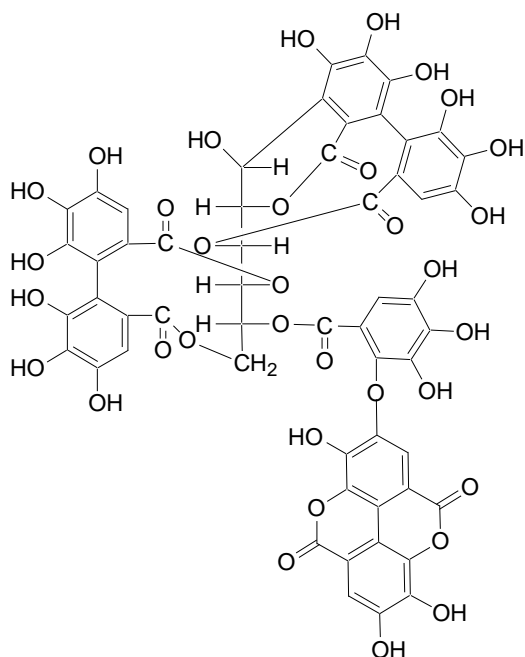
didasarkan atas prekursor, struktur dasar dan jalur biosintesisnya (Edwards dan Gatehouse, 1999; Smith, 1976). Senyawa-senyawa tersebut memiliki variasi yang luas dalam diversitas kimia, distribusi dan fungsinya (Smith, 1976). Golongan fenol dicirikan oleh adanya cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil. Kelompok fenol terdiri dari ribuan senyawa, meliputi flavonoid, fenilpropanoid, asam fenolat, antosianin, pigmen kuinon, melanin, lignin, dan tanin, yang tersebar luas di berbagai jenis tumbuhan (Harbone, 1996).

Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu taninterkondensasi (*condensed tannins*) dan tanin-terhidrolisis (*hydrolysable tannins*)

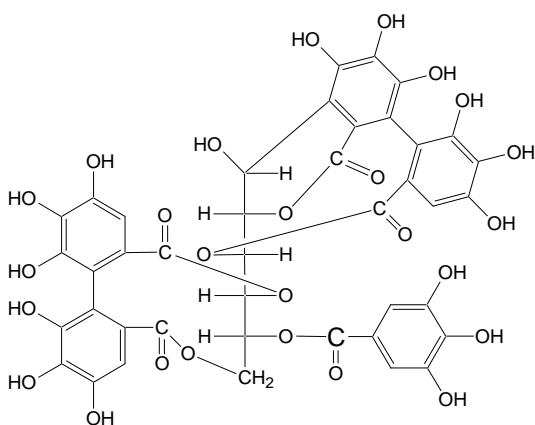


(Hagerman *et al.*, 1992; Harbone, 1996).

Tanin-terhidrolisiskan merupakan derivat dari asam galat (1) yang teresterkan (Xu, 1991). Berdasarkan strukturnya, tanin ini dibedakan menjadi dua kelas yaitu, gallotanin dan ellagitanin. Perbedaan struktur keduanya adalah adanya ester asam heksahidroksidifenat (HHDP) (2) pada ellagitanin. Kedua ester asam tersebut berikatan dengan glukosa. Ellagitanin yang dihidrolisis akan menghasilkan asam elagat (3) (Harbone, 1996). Oksidasi perangkaian (*oxidative coupling*) pada gugus galoil (4) dari gallotanin akan menghasilkan ellagitanin (Gross, 1992).



(5) lagerstroemin

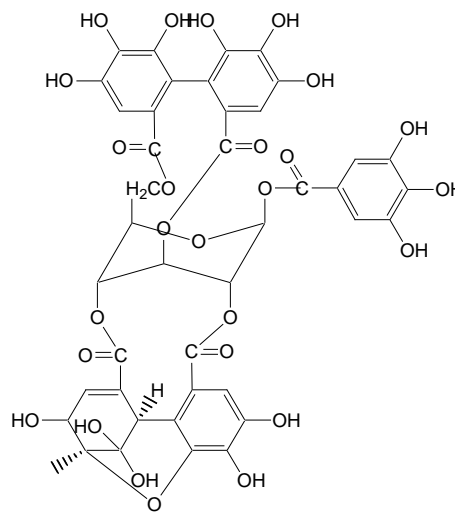


(6) casuarinin

Ellagitanin tersebar secara tidak merata pada dunia tumbuhan. Berbeda dengan tanin-terkondensasi yang tersebar luas di paku-pakuan, gymnospermae, dan angiospermae, ellagitanin hanya terdapat pada angiospermae, khususnya pada tumbuhan dikotil, terutama Hammamelidae, Dilleniidae, Rosidae, serta beberapa lainnya (Harbone, 1996,

Bruyne *et al.*, 1999). HHDP (2) merupakan contoh dari molekul ellagitanin yang paling sederhana (Gross, 1992). Sedangkan beberapa contoh ellagitanin yang strukturnya lebih kompleks misalnya, lagerstroemin (5) dari bungur (*Lagerstroemia speciosa*; Lythraceae), dan casuarinin (6) dari *Casuarina spinosa*. Terkadang suatu jenis ellagitanin hanya dapat ditemukan pada satu jenis tumbuhan saja, misalnya lagerstroemin, namun ada juga yang ditemukan pada lebih dari satu jenis tumbuhan, misalnya geraniin (7) yang dapat ditemukan pada Euphorbiaceae, Aceraceae, dan Cercidiphyllaceae (Xu *et al.*, 1991, Okuda *et al.*, 1992).

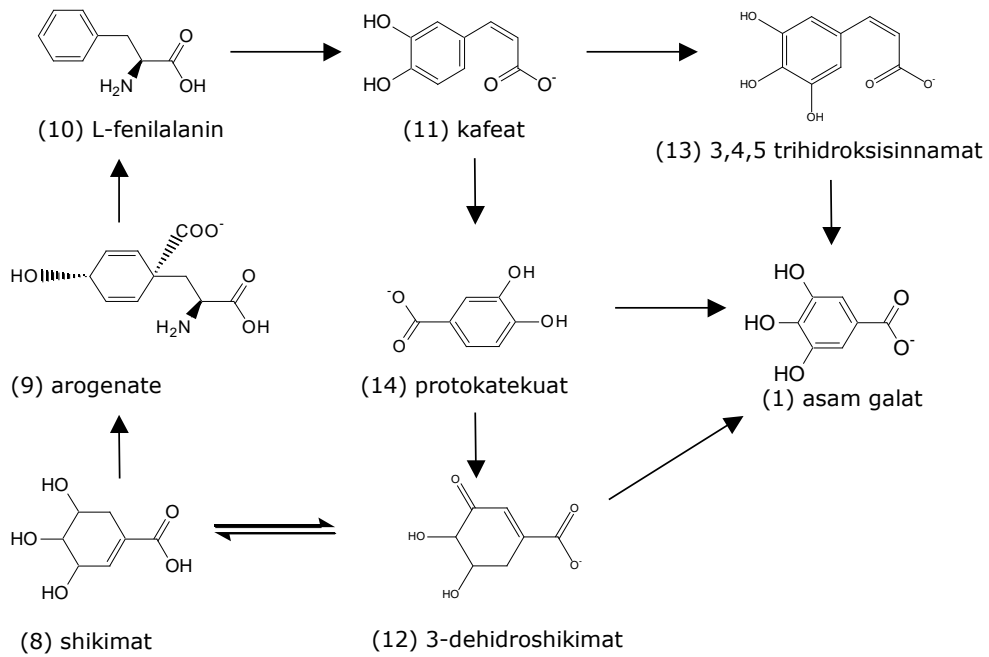
Seperti halnya dengan metabolit sekunder lainnya, sejauh ini ellagitanin diketahui tidak memiliki fungsi yang penting bagi metabolisme tumbuhan. Justru dalam hal fungsi morfologi dan ekologi, ellagitanin menunjukkan perannya (Gottlieb dan Borin 2000). Lepas dari fungsi tersebut, ellagitanin diketahui memiliki nilai tersendiri bagi manusia, khususnya dalam dunia kesehatan. Aktivitas biologis dan farmakologi yang telah diketahui antara lain, penghambatan karsinogenesis, anti-tumor, anti-virus, anti-oksidasi (peroksidasi lipida, lipoksigenase, oksidasi xanthin, dan oksidasi monoamin), anti hipertensi (Okuda *et al.*, 1992; Taylor, 2003), anti-bakteri dan jamur, anti-diabetes, dan anti-nematoda (Cowan, 1999; Hayashi *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2000).



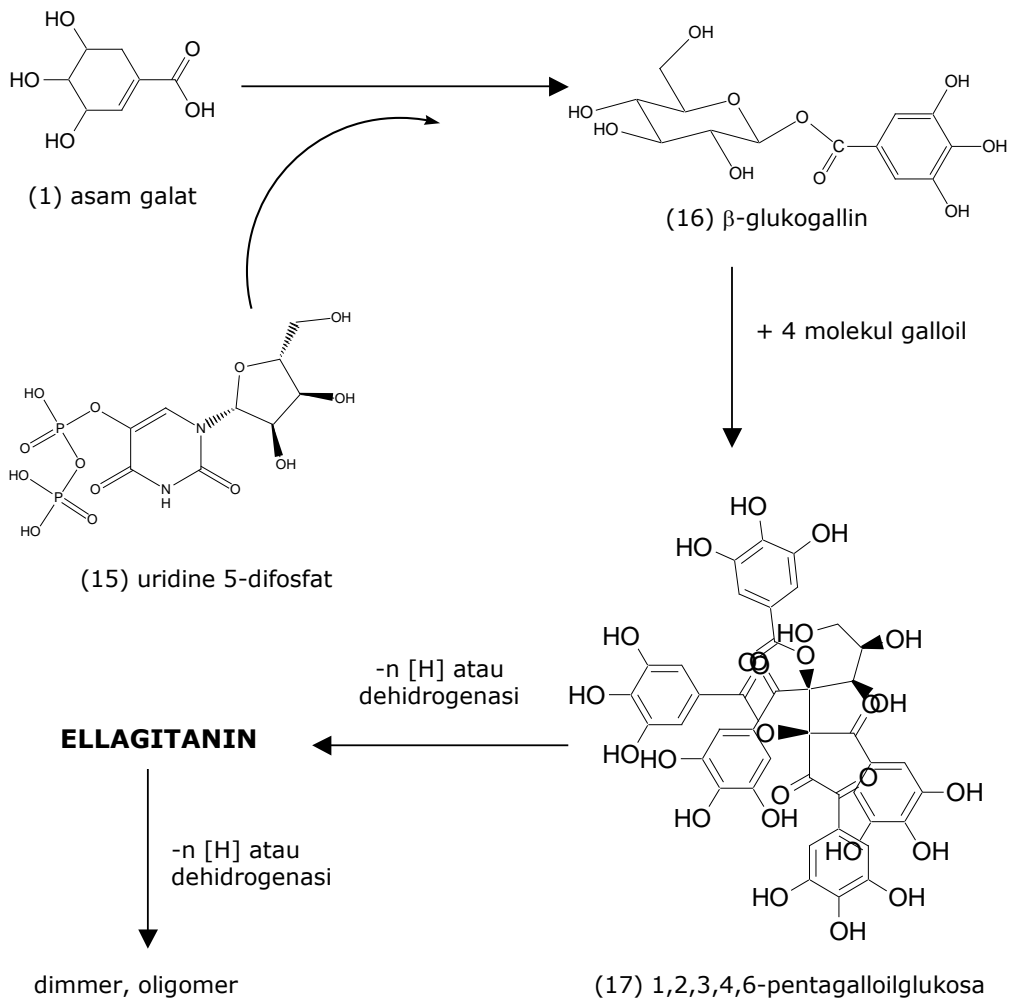
(7) geraniin

BIOSINTESIS ELLAGITANIN

Biosintesis ellagitanin secara mendetail ke setiap senyawa-senyawanya masih belum jelas. Gross (1992) menjelaskan secara garis besar pembentukan ellagitanin dari hasil-hasil penelitian sebelumnya. Umumnya penelitian tentang biosintesis ellagitanin dilakukan pada tumbuhan Oak (*Quercus rubra*), *Rhus sp.*, dan beberapa tumbuhan tertentu lainnya. Reaksi spesifik yang menuju ke senyawa ellagitanin tertentu berbeda-beda tergantung jenis



Gambar 1. Jalur pembentukan asam galat (Gross, 1992).



Gambar 2. Biosintesis ellagitanin (Gross, 1992).

senyawa dan tumbuhannya. Oleh karena itu, penelitian biosintesis ellagitanin sekarang mengalami perkembangan, tidak hanya difokuskan pada beberapa jenis tumbuhan di atas, namun sudah semakin meluas.

Jalur biosintesis ellagitanin, terdiri atas tiga tahapan reaksi. Tahap pertama adalah pembentukan asam galat (1), sebagai penyusun struktur primer ellagitanin (Gambar 1). Tahap ini diawali dari jalur shikimat (8) yang membentuk dua arah reaksi sintesis asam galat. Arah pertama melalui pembentukan L-fenilalanin (10) dengan perantara arogenate (9). Pembentukan asam sinamat dari L-fenilalanin (10) dihalangi oleh enzim L-AOPP (L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid), dan reaksi diarahkan pada senyawa kafeat (11). Arah reaksi kedua melalui pembentukan 3-dehidroshikimat (12) yang mengalami hidrogenasi pada atom C ke-3 sehingga terbentuk asam galat (Gross, 1992).

Tahap kedua adalah pembentukan pentagalloylglukosa yang diawali oleh reaksi asam galat (1) dengan uridin 5-difosfat glukosa (15) untuk membentuk β -glukogallin (16) (Gambar 2). Dengan penambahan 4 molekul galloil, β -glukogallin diubah menjadi 1,2,3,4,6-pentagalloylglukosa (17). Empat molekul galloil menggantikan atom H pada empat gugus hidroksil. Proses penggantian atom H tersebut dinamakan reaksi galloilasi. Reaksi ini berurutan mulai dari gugus hidroksil ke-1, lalu ke-6, ke-2, ke-3, dan yang terakhir ke-4. Reaksi ini membutuhkan enzim galloiltransferase (Gross, 1992).

Tahap terakhir merupakan tahap yang secara langsung menuju ke pembentukan senyawa-senyawa golongan ellagitanin (Gambar 2). Seperti telah disebutkan sebelumnya, biosintesis senyawa ellagitanin berbeda-beda tergantung jenis senyawa dan jenis tumbuhan penghasilnya. Senyawa ellagitanin dihasilkan dari oksidasi (atau lebih tepatnya dehidrogenasi/pelepasan atom H dari gugus OH) pentagalloylglukosa. Residu sederhana yang dihasilkan dari proses dehidrogenasi dua grup galloil dari pentagalloylglukosa adalah HHDP (2). Dehidrogenasi yang terjadi diikuti dengan reaksi perangkaian (*coupling*) antar atom C dua gugus galloil. Gallotanin yang mengalami oksidasi perangkaian C-C dan C-O pada gugus galloil yang berdekatan menghasilkan ellagitanin (Gross, 1992).

EKSTRAKSI DAN ISOLASI ELLAGITANIN

Bahan tumbuhan

Pada prinsipnya, semua bagian jaringan tumbuhan penghasil ellagitanin dapat digunakan sebagai sumber ekstrak ellagitanin, namun jenis dan kadar pada setiap jaringan cenderung berbeda-beda. Dalam menentukan bagian tumbuhan yang akan diekstraksi, perbandingan kadar senyawa pada setiap jaringan perlu dipertimbangkan. Selain itu, umur jaringan juga perlu diperhatikan. Umumnya, jaringan tua memiliki kandungan metabolit sekunder lebih banyak daripada jaringan muda.

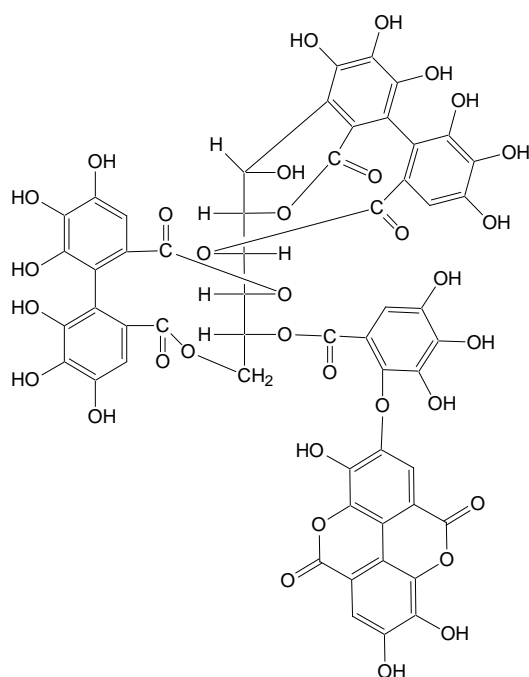
Tanin dapat diekstraksi dari seluruh bagian tumbuhan, meliputi daun, cabang, batang, akar, dan buah (Scalbert, 1991). Bagian yang kaya akan tanin, berbeda-beda tergantung jenis tumbuhannya, misalnya pada *Caesalpinia spinosa* organ buah memiliki kandungan tanin paling tinggi (Galvez *et al.* 1997), sedangkan pada pohon oak (*Quercus*) kandungan tanin banyak terdapat di batang (Helm, 2000). Umumnya ekstraksi tanin dilakukan dari daun dan batang tumbuhan. Jaringan yang diekstrak dapat berupa jaringan segar maupun yang sudah kering. Untuk analisis, sebaiknya digunakan jaringan segar (Scalbert, 1992). Namun, kadangkala hal itu tidak memungkinkan karena jauhnya jarak pengambilan sampel dengan laboratorium. Untuk itu sampel tumbuhan dapat dibekukan, dikeringbekukan, atau dikeringanginkan. Metode kering-beku merupakan cara yang paling aman untuk mencegah perubahan jaringan, yang berakibat pada perubahan kadar tanin. Metode ini dilakukan dengan menggunakan nitrogen cair.

Jika nitrogen cair tidak tersedia, maka alternatif yang mudah adalah dikeringanginkan. Titik uap senyawa ellagitanin sangat tinggi, misalnya pada lagerstroemin (5) di atas 250°C, namun proses pengeringan sebaiknya dilakukan pada suhu kamar atau kurang dari 40°C. Pada suhu lebih dari 40°C dapat terjadi penurunan kadar dan ekstraktibilitas tanin secara drastis. Jika pengeringan dilakukan dalam ruang yang kelembabannya tinggi, maka penggunaan kipas angin sangat disarankan. Hal ini akan mempercepat proses pengeringan dan mencegah molekul air bereaksi dengan molekul tanin melalui lukanluka pada jaringan.

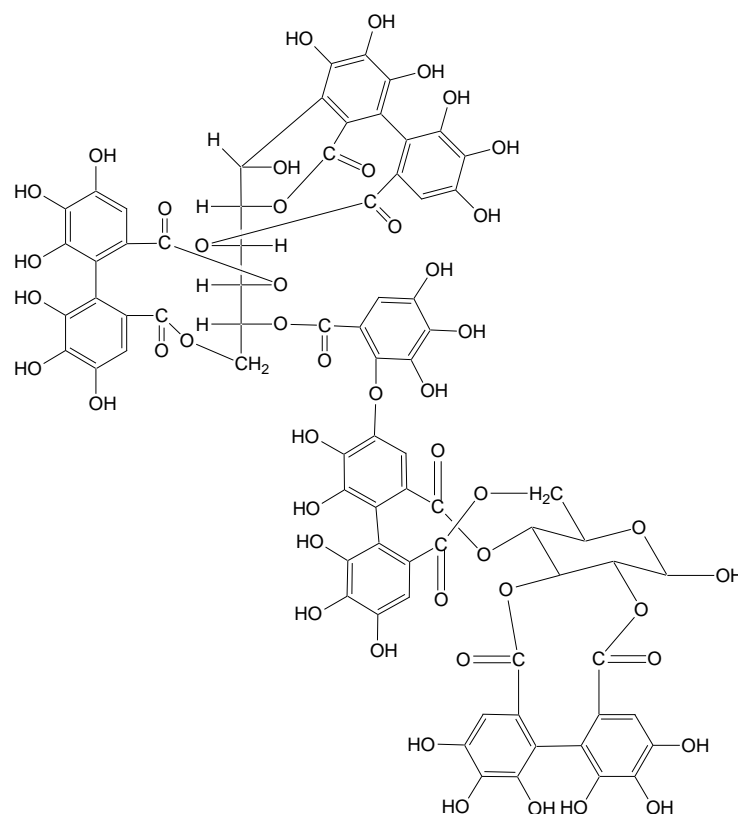
Ekstraksi dan Isolasi

Senyawa tanin umumnya dapat larut dengan pelarut dari polar sampai semipolar. Ekstraksi tanin dari jaringan tumbuhan dilakukan dengan menggunakan pelarut aseton 70% atau metanol 50% dalam air (FAO/IAEA, 2000). Lin *et al.* (2001) melakukan ekstraksi ellagitanin dari daun kering *Euphorbia tirucalli* dengan menggunakan pelarut aseton 60%. Sedangkan Machado *et al.* (2002) berhasil melakukan ekstraksi ellagitanin dari kulit buah delima segar (*Punica granatum*; Punicaceae) dengan etanol. Seperti yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2001), jika menggunakan air sebagai pelarut, proses ekstraksi harus berlangsung pada kondisi air mendidih. Suhu panas dapat membantu ekstraktibilitas tanin terhadap pelarut air.

Prosedur ekstraksi biasa tidak cukup untuk mengisolasi ellagitanin. Proses ekstraksi umumnya dilakukan secara berulang dan bertahap. Sering kali, ekstraksi dengan aseton 70% dilakukan berulang sampai tiga kali dan dilanjutkan ke tahapan isolasi. Banyak pekerjaan isolasi ellagitanin mengharuskan penggunaan kromatografi kolom sebagai salah satu tahapan isolasi. Ellagitanin dapat terpisah dengan baik menggunakan kolom pemisah Sephadex LH-20, MCI-gel CHP 20P, atau ODS-AQ. Metanol dengan konsentrasi bertingkat merupakan eluen yang baik untuk memperoleh ellagitanin.



(18) flosin B



(19) reginin A

Isolasi lagerstroemin (5), flosin B (18), dan reginin A (19) dari bungur (*L. speciosa*) pertama kali menggunakan aseton 70% berulang tiga kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian disuspensikan dalam air dan dipartisikan dengan etil asetat, eter, dan butanol. Fraksi air yang terbentuk dipisahkan dengan menggunakan kolom pemisah Diaion HP-20 dengan eluen metanol. Proses isolasi berakhir dengan penggunaan instrumen HPLC-preparatif (*high performance liquid chromatography*). Kolom ODS-A, 2 x 15 cm, dengan eluen metanol 25%, CH₃CN 10 mM dan buffer fosfat pH 2 dapat memisahkan ellagitanin dengan baik (Hayashi *et al.*, 2002).

Pemisahan ellagitanin dari *P. granatum* dilakukan dengan kolom berurutan yaitu XAD-16 dan Sephadex LH-20 (eluen yang dipakai adalah metanol dengan konsentrasi bertingkat), setelah sebelumnya ekstrak etanol dipartisikan dengan heksana, butanol, dan etilasetat dan kloroform. Fraksi yang diperoleh dielusikan ke instrumen HPLC-preparatif fase balik, kolom RP-18, 2x25 cm menghasilkan α -punicalagin 20, β -punicalagin (21), α -punicalin 22 dan β -punicalin (23), dan asam elagat (3) (Machado *et al.*, 2001).

ANALISIS BIOKIMIA

Ellagitanin memberikan reaksi warna yang khas dengan asam nitrit (larutan NaNO₂ 10% dengan suhu rendah yang ditambahi asam asetat). Warna yang terbentuk merah yang kian lama berubah menjadi biru indigo. Prosedur sederhana ini biasa

digunakan untuk deteksi ellagitanin yang dipisahkan dengan menggunakan prosedur kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis (Harbone, 1996). Untuk analisis secara detail disarankan untuk tidak mengandalkan prosedur ini karena hanya cocok untuk deteksi pendahuluan.

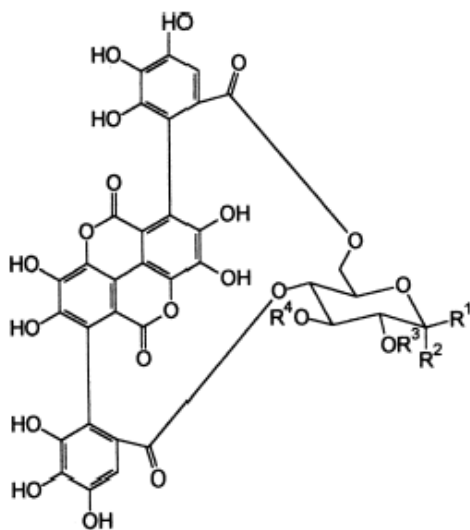
Teknik kromatografi lapis tipis (KLT) dua arah biasa digunakan untuk deteksi pendahuluan ellagitanin, jika hanya menggunakan KLT satu arah, hasil pemisahan kurang maksimal akibat adanya bercak-bercak yang masih menyatu. Lempong yang digunakan dalam KLT adalah selulosa, misalnya MN300, dengan pengembang I dari asam asetat 2% v/v dan pengembang II dari campuran butanol: asam asetat: air (12:3:5). Penyemprot yang digunakan untuk ellagitanin adalah reagen vanillin/HCL dan reagen NaNO₂ (Harbone, 1996; FAO/IAEA, 2000).

Reagen vanillin/HCL dibuat dengan melarutkan 1 gram vanillin ke dalam 10 ml HCL 12 M. Setelah dibuat, hendaknya reagen ini langsung digunakan karena sifatnya yang tidak dapat bertahan lama. Jika disemprotkan ke spot ellagitanin, akan muncul warna merah. Reagen NaNO₂ dibuat dengan melarutkan 20 mg NaNO₂ dan beberapa tetes asam asetat glasial dalam 10 ml akuades yang telah didinginkan sampai mendekati titik beku. Untuk mengkondisikan lingkungan yang mendekati 0°C dapat digunakan nitrogen cair. Spot ellagitanin akan memberikan warna merah kecoklatan jika disemprot dengan reagen NaNO₂ (FAO/IAEA, 2000).

Analisis kuantitatif, sebagai lanjutan dari prosedur di atas, pun memanfaatkan prinsip yang

sama dengan reagen NaNO_2 . Sebanyak 0,5 ml ekstrak dicampur dengan 2,0 ml reagen NaNO_2 atau HNO_2 0,1 M pada suhu lingkungan rendah. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 600 nm. Larutan standar yang digunakan adalah asam elagat (Harbone, 1996). Galvez (1997) menentukan kandungan asam elagat (3) dalam buah *Caesalpinia spinosa* dengan metode Hagerman dan Wilson (1990). Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml H_2SO_4 2 N. Larutan dipanaskan 100°C selama 24 jam, kemudian didinginkan. Sebanyak 1 ml larutan tersebut ditambahkan dalam larutan piridin 1,1 ml dan 0,1 ml HCL. Pada suhu 30°C larutan ditambah 0,1 ml NaNO_2 1%. Absorbansi diukur pada 538 nm. Setelah 36 menit inkubasi pada suhu 30°C , dilakukan pengukuran absorbansi lagi. Selisih absorbansi sebanding dengan kandungan asam elagat dalam sampel. Kadar asam elagat dihitung dengan rumus $A_{538} = (0,3x \text{ mg kadar asam elagat}) - 0,04$.

Metode analisis dengan HPLC (*high performance liquid chromatography*) merupakan prosedur yang biasa ditempuh untuk menganalisis kandungan ellagitanin suatu tumbuhan obat. Prosedur ini cocok dilakukan karena kinerja HPLC yang baik untuk pemisahan senyawa-senyawa yang sulit menguap, termasuk di antaranya ellagitanin. Dengan waktu yang singkat dan persiapan yang tidak rumit, hasil pemisahan dapat segera diperoleh, untuk kemudian dianalisis baik kuantitatif maupun kualitatif. Meskipun membutuhkan biaya yang relatif mahal, setidaknya prosedur HPLC merupakan prosedur yang mutakhir dalam bidang fitokimia.



- (20) α -punicalagin $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=R_4=\text{H}$
 (21) β -punicalagin $R_1=\text{OH}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=R_4=\text{H}$
 (22) α -punicalin $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=R_4=\text{HHDP}$
 (23) β -punicalin $R_1=\text{OH}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=R_4=\text{HHDP}$

Metode standar yang biasa digunakan adalah kombinasi instrumen RP-HPLC (*Reverse Phase-HPLC*) atau HPLC-fase balik dengan detektor UV/Vis (*ultra violet/visible*) atau DAD (*diode array detector*). Panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang yang umum untuk deteksi

semua senyawa fenol dan turunannya (Salminen *et al.*, 1999). Asam elagat (3) dapat dideteksi pada panjang gelombang 260 nm (Rauha, 2001), α -punicalagin (20), β -punicalagin (21), α -punicalin (22), dan β -punicalin (23) dideteksi pada panjang gelombang 350 nm (Machado *et al.*, 2002).

Penentuan struktur ellagitanin hasil pemisahan didasarkan pada data spektrum MS (*mass spectrometric*) dan spektrum NMR (*nuclear magnetic resonance*). Dua instrumen tersebut menjadi standar dalam analisis struktur senyawa ellagitanin. Namun untuk pemula, membuat analisis spektrum MS dan NMR adalah pekerjaan yang relatif sulit. Teknik yang dapat digunakan untuk MS, misalnya FAB-MS (*fast atom bombardment-MS*) (Hatano *et al.*, 1992). Sedangkan untuk NMR baik H-NMR maupun C-NMR, antara lain COSY, NOESY, HMQC, dan HMBC (Lin *et al.*, 2001).

Perkembangan teknologi kromatografi saat ini telah memungkinkan kombinasi instrumen HPLC dengan MS. Dengan kombinasi HPLC-MS pekerjaan analisis struktur menjadi lebih mudah. Senyawa hasil pemisahan dari HPLC dapat secara langsung dianalisis spektrum massanya di instrumen MS. Terdapat beberapa pilihan teknik MS yang dapat dikombinasikan dengan HPLC, baik fase normal (NP) maupun fase balik (RP), antara lain API (*atmospheric pressure ionization*), APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) (Rauha, 2001), dan ESI (*electrospray ionization*) (Salminen *et al.*, 2002) Teknik MS yang relatif sensitif adalah dengan MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-MS*), namun sampai sekarang teknik ini belum memungkinkan untuk dikombinasikan dengan HPLC (Rauha, 2001).

AKTIVITAS BIOLOGI

Aktivitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari ikatan antara ellagitanin dengan protein, senyawa dengan berat molekul tinggi, senyawa sederhana, dan ion logam berat (Okuda *et al.*, 1992). Ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang dapat menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Berbagai penelitian telah dikembangkan untuk mengeksplorasi ellagitanin dan aktivitas biologinya. Pada tahun 1992, baru sekitar 90 senyawa ellagitanin yang diketahui memiliki aktivitas biologi (Okuda *et al.* 1992) dan diperkirakan masih banyak yang belum terungkap. Aktivitas biologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai anti-diabetes, anti-mikrobia, anti-virus, anti-hipertensi, anti-oksidan, dan anti-kanker/tumor. Dari sekian banyak penelitian yang telah dilakukan, belum ada yang menunjukkan efek toksik ellagitanin.

Anti-diabetes

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit fisiologis berupa perubahan homeostasis glukosa sehingga kadar glukosa dalam plasma darah mengalami kenaikan di atas normal. Kondisi ini sering disebut hiperglikemik (Maher, 2000).

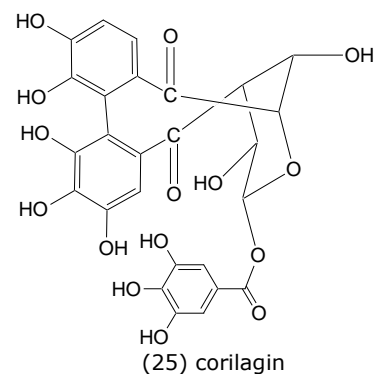
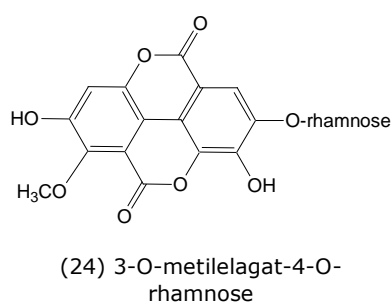
Berbagai jenis tumbuhan obat telah dimanfaatkan untuk terapi penyakit tersebut. Banyak penelitian telah sampai pada isolasi senyawa aktif tumbuhan yang mampu memberikan efek hipoglikemik atau anti-diabetes. Hayashi *et al.* (2002) berhasil mengisolasi lagerstroemin (5), flosin B (18), dan reginin A (19) dari daun kering bungur (*L. speciosa*) untuk uji anti-diabetes secara *in vitro*. Sebelumnya telah diketahui bahwa ekstrak daun bungur memiliki aktifitas hipoglikemik (Mishra *et al.* 1990; Kakuda *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001), yang mana ketiga senyawa ellagitanin tersebut diketahui berkaitan dengan efek hipoglikemik ekstrak daun bungur.

Efek hipoglikemik yang diberikan oleh ellagitanin daun bungur berupa peningkatan aktifitas transpor glukosa pada jaringan adiposa. Kemampuan lagerstroemin (5) dan flosin B (18) hampir setengah kali kemampuan insulin dalam meningkatkan kecepatan transpor glukosa. Bahkan reginin A (19) menunjukkan aktifitas yang hampir sama dengan insulin. Pada konsentrasi 0,04 mM, kecepatan transpor glukosa meningkat menjadi hampir 0,5 nmol/5 menit, padahal pada kontrol hanya 0,1 nmol/5 menit. Insulin sendiri meningkatkan transpor glukosa sampai 0,48 nmol/5 menit. Ini menunjukkan bahwa ellagitanin khususnya reginin A, dalam daun bungur cukup berpotensi untuk menggantikan peran hormon insulin (Hayashi, 2002).

Mekanisme peningkatan kecepatan transpor glukosa oleh ellagitanin tersebut diperkirakan melalui jalur yang sama dengan jalur kerja insulin. Perkiraan ini didasarkan pada fakta bahwa kerja ellagitanin dihambat oleh wortmanin (Hayashi *et al.*, 2002). Sedangkan wortmanin itu sendiri merupakan senyawa yang dapat menghambat (atau lebih tepatnya menutup jalur) kerja insulin (Standaert *et al.*, 1996).

Asam elagat (3) dalam daun meniran (*Phyllanthus niruri*; Euphorbiaceae) juga diketahui memiliki aktifitas hipoglikemik, baik pada hewan percobaan maupun penderita diabetes. Kandungan asam elagat (3) dalam tumbuhan tersebut menghambat kerja enzim aldose reduktase. Enzim ini bekerja pada jalur poliol (pembentukan sorbitol dan fruktosa dari glukosa). Pada penderita DM, proses pengubahan glukosa menjadi fruktosa terganggu. Untuk mengembalikan keseimbangan metabolisme glukosa harus ada penghambatan kerja enzim aldose reduktase (Trueblood dan Ramasamy, 1998). Karena kerja enzim aldose reduktase dihambat oleh asam elagat (3) maka proses peningkatan kadar glukosa darah dapat menurun dan metabolisme glukosa menuju ke arah keseimbangan (Taylor, 2003; Shimizu *et al.*, 1989).

Rubus imperialis (Rosaceae) merupakan tumbuhan obat yang biasa digunakan sebagai bahan untuk terapi DM oleh penduduk Brazil (Kanegusuku *et al.*, 2002). Kandungan ellagitanin, 3-O-metilelagat-4-O-rhamnose (24), dalam



tumbuhan tersebut diperkirakan berkaitan dengan efek hipoglikemik yang diberikan oleh tumbuhan tersebut pada penderita diabetes. Kondisi hiperglikemia ini dapat menyebabkan aktivasi PKC (protein kinase C). Aktifnya PKC akan menginduksi berbagai penyakit kardiovaskuler dan komplikasi turunan diabetes lainnya (Koya dan King, 1998). Ellagitanin merupakan inhibitor PKC yang lebih kuat dibandingkan dengan gallotanin (Bruyne *et al.*, 1999). Oleh karena itu, ellagitanin juga dapat menurunkan resiko komplikasi yang diakibatkan oleh DM. Tanin merupakan senyawa yang berpotensi besar sebagai agen anti-mikrobia (Scalbert, 1991). Mekanisme anti-mikrobia tanin antara lain terjadi melalui inaktivasi adhesin mikrobia, penghambatan kinerja enzim, dan penghambatan transpor protein (Cowan, 1999).

Anti-mikrobia dan virus

Pengujian aktifitas anti-mikrobia terhadap *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Tricophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. terrestre*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Candidata krusei*, dan *Cryptococcus neoformans*, menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tanin-terhidrolisiskan dan flavonoid memiliki variasi aktifitas yang berbeda-beda tergantung jenis senyawa dan jenis mikrobia sasaran. Ellagitanin, corilagin (25), memiliki aktifitas yang sama dengan amfotericin B dan conazole terhadap *C. glabrata* (Latte dan Kolodziej, 2000).

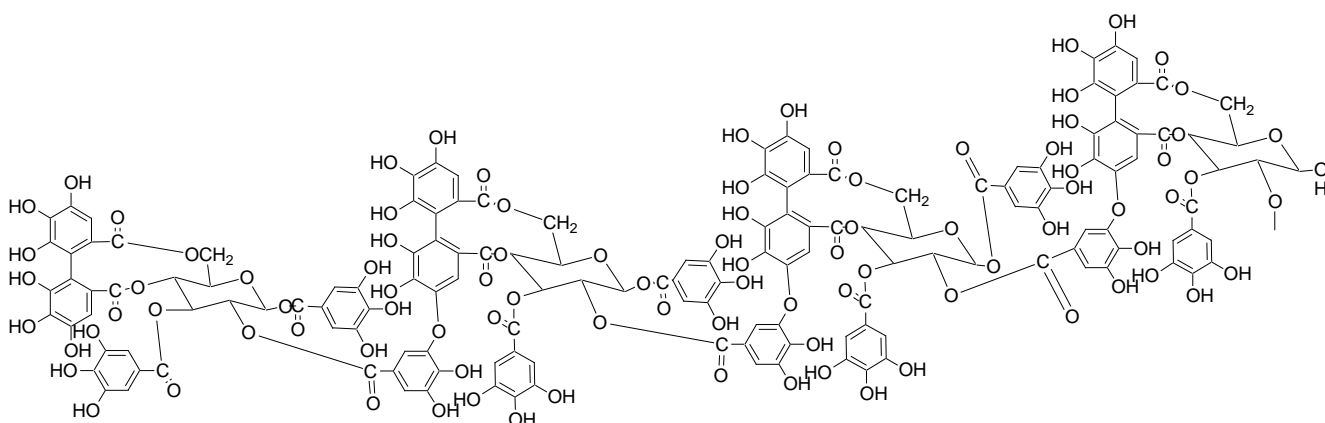
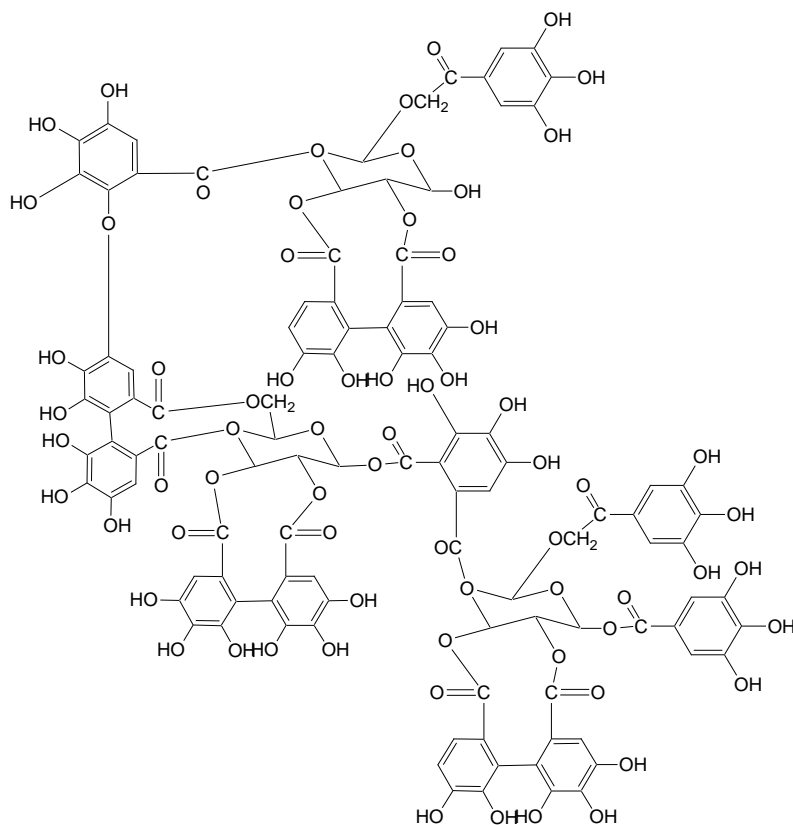
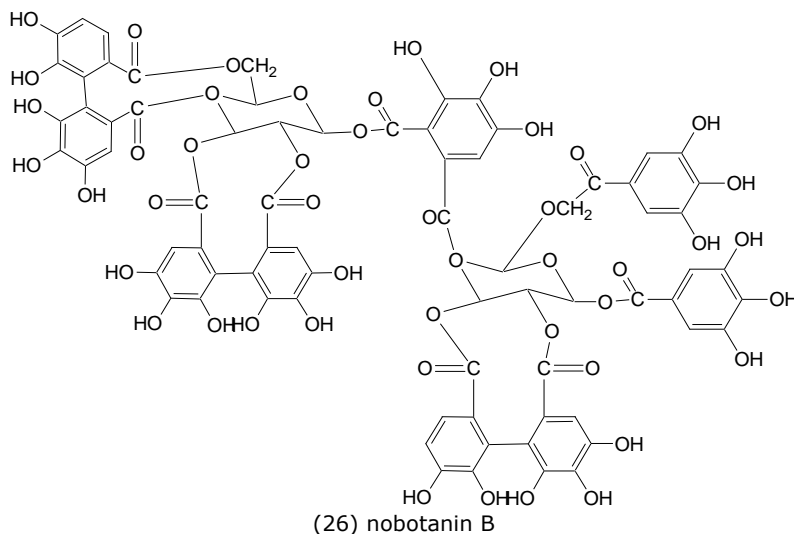
Punicalagin (20–21) dari delima mampu menghambat pertumbuhan beberapa strain *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik. MIC (*minimum inhibitory concentration*) yang dibutuhkan untuk menghambat semua strain *S. aureus* adalah 61,5 µg ml. Hal yang berbeda diperoleh pada punicalagin yang diekstrak dari *Terminalia citrina*. MIC yang dibutuhkan relatif lebih besar yaitu, 768 µg ml (Machado *et al.*, 2002). Punicalagin (20–21) yang diekstrak dari *Combretum molle* (Combretaceae) mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (typus humanus ATCC 27294). Punicalagin diketahui lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* dibandingkan saponin yang diekstrak dari tumbuhan yang sama (Asres, *et al.*, 2001).

Aktifitas anti-virus dari ekstrak tumbuhan diketahui berkaitan dengan kelompok senyawa

polifenol, terutama flavonoid dan tanin, yang terkandung di dalamnya (Cowan, 1999). Senyawa ellagitanin baru, arjunin, dan empat senyawa lainnya, yakni asam elagat (3), pentagalloylglukosa (17), asam galat (1), dan HHDP (4) dari ekstrak daun *Terminalia arjuna* (Combretaceae) mampu menghambat pertumbuhan virus HIV-1. Arjunin memberikan efek penghambatan yang paling tinggi, lebih dari 70% pada konsentrasi 0,2 mg/ml (Kandil dan Nassar, 1998). Ellagitanin lainnya yang telah lebih dulu diketahui mempunyai aktifitas anti-HIV adalah nobotanin B (26) dan C (27), oenothetin B (35), agrimoniin (33), coriariin A (39) dan trapanin B (28) (Okuda *et al.*, 1992).

Ekstrak kemloko (*Phyllanthus emblica*; Euphorbiaceae) juga berpotensi sebagai anti-HIV (Ogata *et al.*, 1992) Buah kemloko merupakan salah satu bahan ramuan obat tradisional "triphala" dari India, mengandung beberapa ellagitanin yang berpotensi sebagai anti-HIV/AIDS. Putranjivain A memberikan efek penghambatan HIV yang paling tinggi. Putranjivain A mampu menghambat kerja enzim reverse-transcriptase yang berperan penting dalam proses replikasi HIV (Wohlmuth, 2003).

Ellagitanin yang terkandung dalam tumbuhan kemloko diperkirakan mampu menghambat pertumbuhan virus hepatitis B (Taylor, 2003). Aktifitas anti-virus juga didapatkan pada tumbuhan *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae). Ekstrak daun *Geranium* yang mengandung kompleks polifenol, meliputi ellagitanin, gallotanin, flavonoid, dan asam fenolat dapat menghambat aktifitas reproduksi virus influenza dan herpes (Serkedjeva dan Manolova, 1992). Hal yang sama juga ditunjukkan oleh tumbuhan *Epilobium hirsutum* L.



(Onagraceae) (Ivancheva *et al.*, 1992). Galloilasi (penambahan gugus galloil), perbedaan ikatan interflavan, dan sifat tereokimia dari gugus hidroksil berpengaruh secara kuat terhadap aktifitas penghambatan pertumbuhan virus. Efek penghambatan ini berkaitan dengan pencegahan terbentuknya kompleks enzim-asam nukleat (Bruyne *et al.*, 1999).

Anti-hipertensi

Hipertensi merupakan salah satu bentuk penyakit kardiovaskuler. Penyakit ini dicirikan dengan tekanan darah penderita yang mengalami kenaikan di atas normal (Koya dan King, 1998). Geraniin (7), yang dapat ditemukan dalam familia Euphorbiaceae, dapat memberikan efek hipotensif (penurunan tekanan darah) secara signifikan. Tekanan sistolik penderita hipertensi dapat turun kembali normal setelah diberi ekstrak daun kemloko yang mengandung geraniin (7) (Taylor, 2003). Efek anti-hipertensi melalui vasodilatasi (pelebaran pembuluh darah) juga ditunjukkan oleh ellagitanin, lambertianin C dan sanguin H-6 (29) dalam ekstrak *Rubus idaeus* (Mullen *et al.*, 2002).

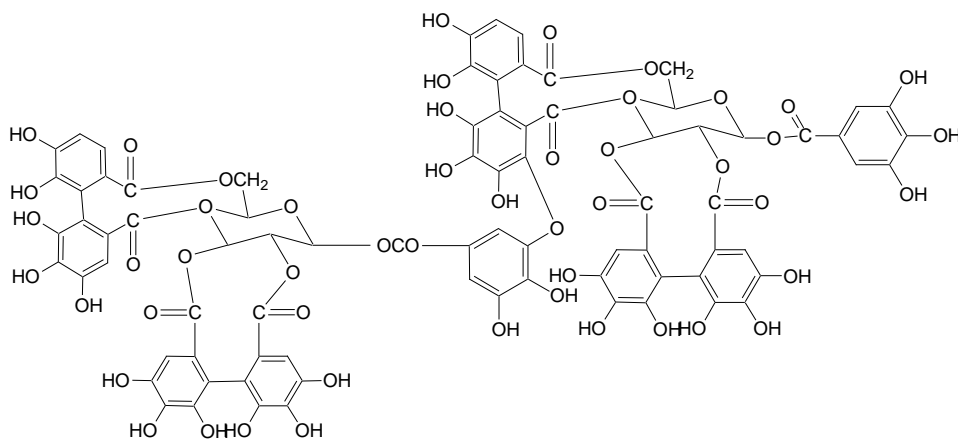
Mekanisme penurunan tekanan darah

diperkirakan berkaitan dengan pengaruh ellagitanin terhadap kesetimbangan ion Ca^{2+} sel. Ellagitanin mempengaruhi ketersediaan ion Ca^{2+} untuk kontraksi otot jantung dan polos. Konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler yang tinggi dapat menyebabkan naiknya tekanan darah atau hipertensi. Rauha (2001) menyebutkan bahwa beberapa senyawa ellagitanin dapat menghambat masuknya ion Ca^{2+} ke dalam sel, sehingga konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler dapat turun dan secara fisiologis diikuti dengan turunnya tekanan darah penderita hipertensi. Namun ada juga yang justru meningkatkan absorpsi ion Ca^{2+} ke dalam sel, seperti rugosin E (30) dari *Rosa rugosa* (Rosaceae), vescalagin (31), dan pedunculagin (32) yang mempengaruhi kesetimbangan Ca^{2+} intraseluler dalam sel platelet kelinci (Teng *et al.*, 1997).

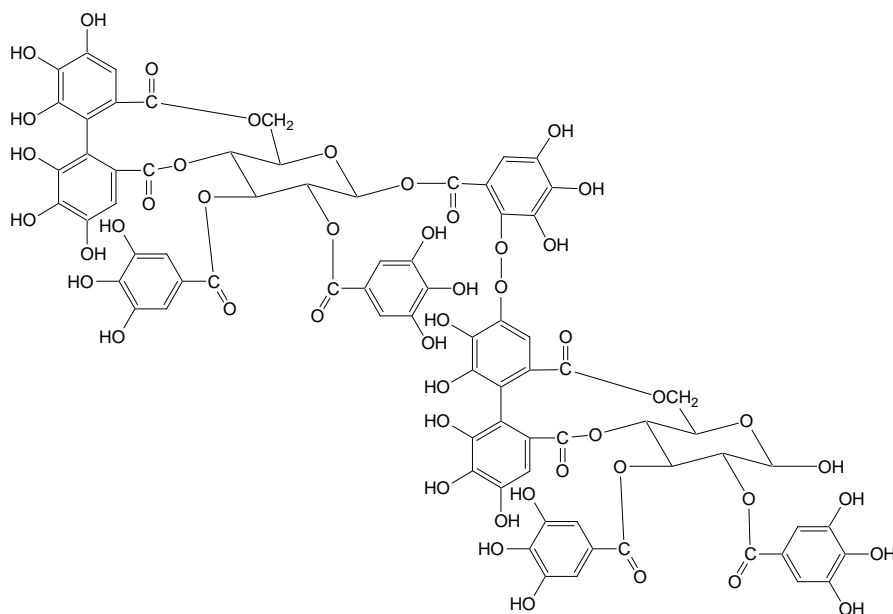
Anti-oksidan

Anti-oksidan merupakan senyawa yang jika berada pada konsentrasi yang relatif lebih rendah dibandingkan konsentrasi suatu substrat, maka akan teroksidasi lebih dulu, sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi substrat tersebut. Tanin dapat menghambat pembentukan oksigen aktif yang dapat menyebabkan oksidasi. Baik gallotanin maupun ellagitanin, merupakan senyawa anti-oksidan yang cukup berpotensi (Rauha, 2001; Okuda *et al.*, 1992). Aktifitas anti-oksidatif ellagitanin tersebut berkaitan dengan struktur kimianya. Naiknya jumlah gugus galloil, berat molekul, dan struktur ortohidroksil meningkatkan aktifitas anti-oksidatif tanin (Yokozawa *et al.*, 1998).

Dalam reviewnya, Okuda *et al.* (1992) menyebutkan aktifitas anti-oksidatif tanin, termasuk ellagitanin, antara lain penghambatan autooksidasi asam askorbat yang dikatalisi oleh ion Cu^{2+} , penghambatan autooksidasi metillinoleat dan peroksidasi lipida di mitokondria dan mikrosom hepar tikus, reduksi kandungan lipid peroksida dalam serum dan hepar tikus, efek proteksi kerusakan oksidatif lensa okuler, aktifitas antihepatotoksik pada kultur primer hepatosit tikus, penghambatan peroksidasi lipida-tergantung lipoksigenase (*lipoxygenase-dependent lipid*



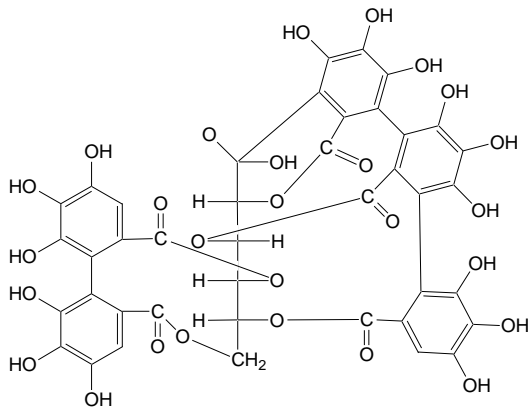
(29) sanguin H-6



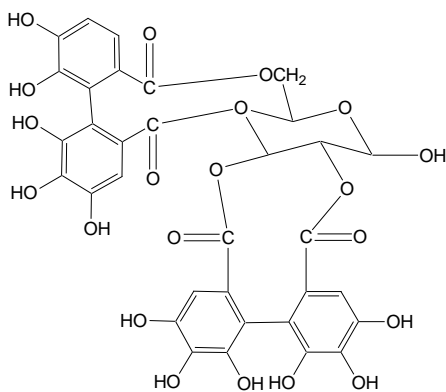
(30) rugosin E

peroksidation) efek penghambatan lipoksinase pada metabolisme arachidonat dalam leukosit, aktifitas anti-oksidatif pada monoamine oksidase dan xanthine oksidase, penghambatan anion radikal superoksida dan radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, dan penghambatan mutagen yang bekerja secara langsung (*direct-acting mutagens*).

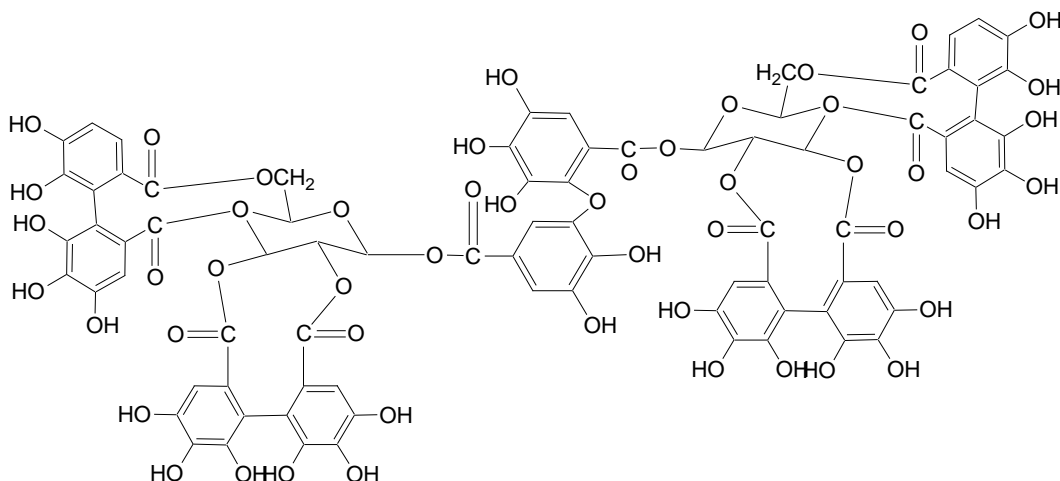
Emblicanin A dan B, punigluconin, dan pedunculagin (32) dalam buah *Phyllanthus emblica* mampu menghambat peroksidasi lipida yang diinduksi dengan radiasi sinar gamma pada



(31) vescalagin



(32) pedunculagin



(33) agrimoniin

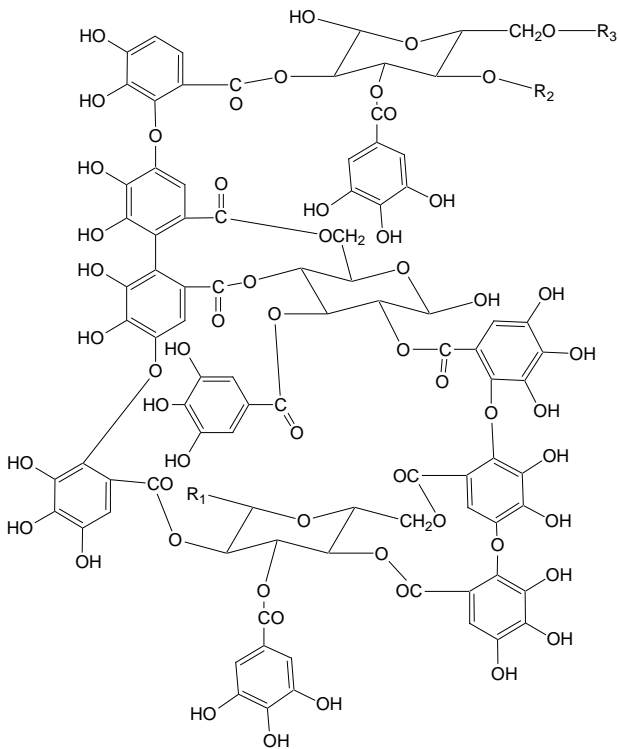
mikrosom hepar tikus. Ekstrak yang sama juga menghambat kerusakan enzim antioksidan superoksida dismutase yang diakibatkan oleh radiasi pada mitokondria hepar tikus. Perlakuan secara intraperitoneal pada tikus selama 7 hari menunjukkan peningkatan aktifitas enzim antioksidan superoksida dismutase, katalase dan glutation peroksidase dalam otak tikus. Peroksidasi lipida dalam otak tikus juga dapat terhambat aktifitasnya. Pada penelitian khusus untuk emblicanin A dan B, ditunjukkan adanya perlindungan hemolisis eritrosit yang diinduksi oleh oksigen radikal (Wohlmuth, 2003).

Lambertianin C dan sanguin H-6 (29) selain mempengaruhi kesetimbangan ion Ca^{2+} , juga memiliki aktifitas anti-oksidatif. Aktifitas tersebut akan semakin meningkat jika dua ellagitannin di atas bersama dengan asam askorbat (vitamin C) (Mullen *et al.*, 2002). Metil (S)-flavogallonat, bersama dengan asam gallat (1), asam elagat (3), punicalagin (20-21), dan sebelas senyawa fenol lainnya dalam ekstrak *Terminalia myriocarpa* mampu menghambat peroksidasi lipid dan pembentukan nitrogen oksida pada hepar tikus (Marzouk *et al.*, 2002).

Anti-kanker/tumor

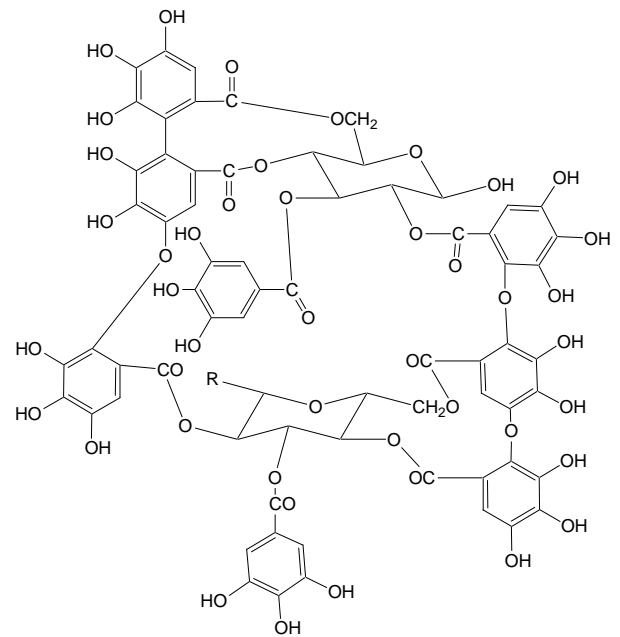
Kanker adalah sekumpulan sel yang mengalami pertumbuhan tak terkendali dan tak terorganisir. Di dalam tubuh sel kanker membentuk suatu badan yang disebut tumor. Kanker dapat timbul karena terjadinya kerusakan (lebih tepatnya mutasi) gen dalam sel (Snustad dan Simmon, 2000). Aktifitas anti-kanker suatu tanin terjadi melalui mekanisme penghambatan kerja enzim sel, pencegahan proses mutagenesis yang dapat menimbulkan kanker, dan pengaktifan makrofag sel kanker.

Ekstrak air buah *Phyllanthus emblica* dapat mencegah kerusakan kromosom akibat oksigen radikal yang dapat menimbulkan kanker pada tikus. Efek pencegahan ini berkaitan dengan aktifitas anti-oksidatif emblicanin A dan B dan pyrogallol dalam buah *Phyllanthus* (Wohlmuth, 2003). Agrimoniin (33) dari ekstrak *Agrimonia pilosa* diketahui memiliki aktifitas anti-tumor yang kuat. Dalam laboratorium,



(34) oenothein A, R1=OH, R2=(s)-HHDP,
R3=(s)-HHDP

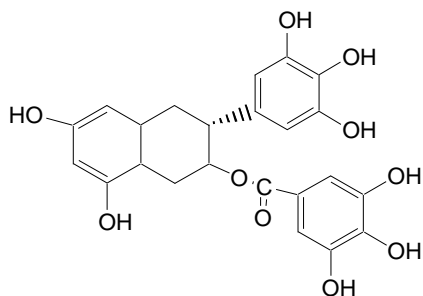
(37) woodfordin D, R2=(a)-O-galloil, R2=(s)-
HHDP, R3=(s)-HHDP



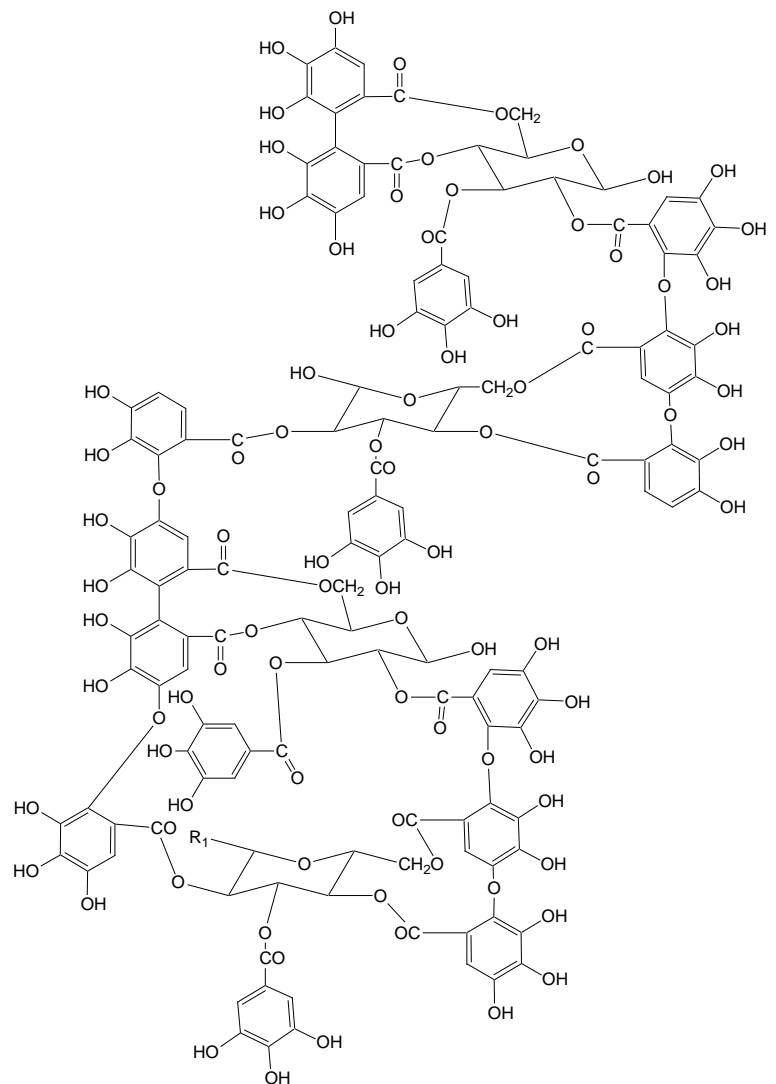
(35) oenothein B, R=OH

(36) woodfordin C, R=(a)-O-galloil

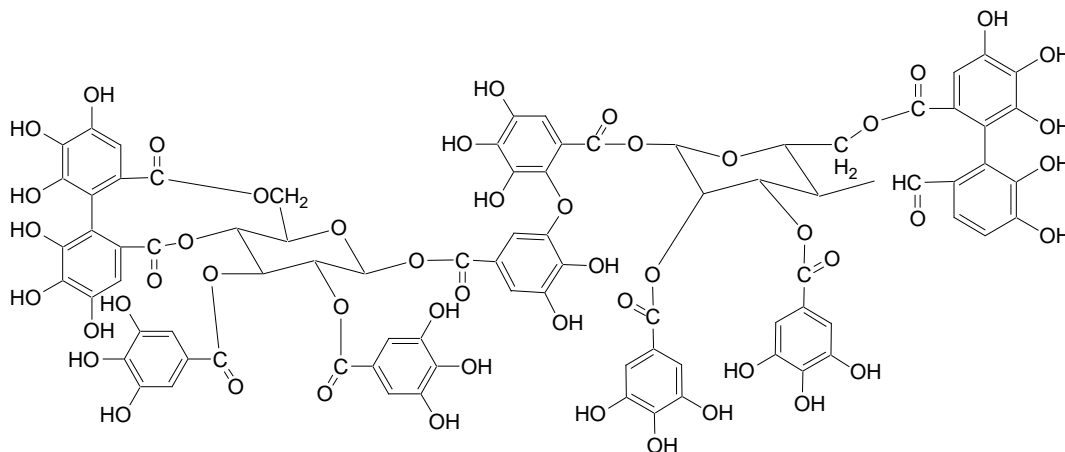
setelah perlakuan agrimoniin (33) (sebelum atau sesudah inokulasi intraperitoneal sel tumor) dapat menghambat pertumbuhan tumor secara signifikan. Ellagitanin lainnya, oenothein A (34) dan B (35), woodfordin C (36), D (37), dan F (38), coriariin (39) dan cornusin (40) juga memiliki aktifitas yang sama (Okuda *et al.*, 1992). Alienanin B dan stenophyllanin A dari *Coleogyne ramosissima* dan *Cowania mexicana* mampu menghambat aktivasi EBV-EA (*Epstein-Barr virus-early antigen*) yang dapat menginduksi kanker. Aktifitas dua ellagitanin tersebut lebih kuat jika dibandingkan dengan (-)-epigallocatechin gallat (41). Aktifitas pembentukan tumor pada kulit mencit juga dihambat oleh ellagitanin tersebut (Ito *et al.*, 1999).



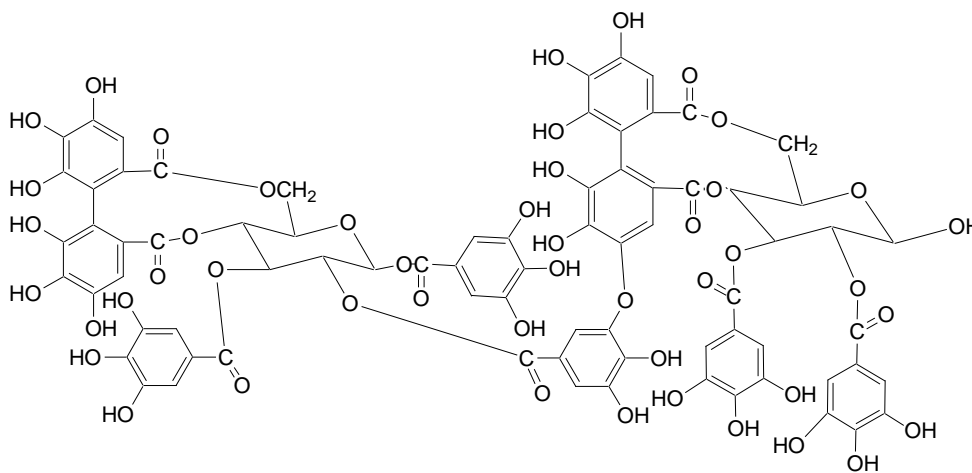
(41) (-)-epigallocatechin gallat



(38) woodfordin F



(39) coriariin A



(40) cornusiin

Ellagitanin oligomer makrosiklis, antara lain oenothetin B (35), woodfordin C (36) dan D (37) menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker epithelium dan sel kelenjar saliva relatif lebih kuat daripada asam gallat (1) dan (-)-epigallocatechin gallat (41). Ellagitanin tersebut menginduksi kematian sel karena apoptosis melalui fragmentasi DNA dan pembelahan sitokeratin 18 (Sakagumi, 2000). Studi yang mendalam tentang ellagitanin dimer makrosirkuler, menunjukkan bahwa oenothetin B (33) berpotensi dalam menghambat kinerja poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Penghambatan tersebut dapat menyebabkan ekspresi gen MMTV (*mouse mammary tumor virus*) pada kultur sel 34I mengalami gangguan (Aoki *et al.*, 1995). Penghambatan PARG akan diikuti dengan penghambatan aktivitas poly(ADP-ribose)polimerase (PARP) dimana telah diketahui aktifitas PARP dapat menyebabkan kematian sel karena nekrosis. Penghambatan PARP dapat melindungi sel dari hidrogen peroksida (Virag dan Szabo, 2002).

KESIMPULAN

Ellagitanin termasuk dalam golongan senyawa tanin-terhidrolisiskan dengan jalur biosintesis asam shikimat – asam gallat – pentagalloylglukosa. Biosintesis ellagitanin secara spesifik masih belum jelas, sehingga perlu penelitian lanjut yang mengarah pada jalur-jalur biosintesis secara spesifik. Isolasi ellagitanin dapat dilakukan dengan ekstraksi bertahap dilanjutkan dengan kromatografi kolom dan HPLC-preparatif. Aktifitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari terbentuknya ikatan molekuler antara ellagitanin dengan senyawa lain terutama protein. Adanya ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Beragam penelitian telah dilakukan untuk mempelajari aktifitas biologi ellagitanin, namun diperkirakan masih banyak hal yang belum terungkap. Aktifitas biologis ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai anti-diabetes, anti-mikrobia dan virus, anti-hipertensi, anti-oksidan, dan anti-kanker/tumor.

DAFTAR PUSTAKA

- Asres, K., F. Bucar, S. Edelsbrunner, T. Kartnig, G. Hoger, and W. Thiel. 2001. Investigation on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytoterapy Research* 15 (4): 323–326.
- Bruyne, T.D., L. Pieters, H. Deelstra, and A. Vlietinck. 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 445–459.
- Cowan, MM. 1999. Plant products as anti-microbial agents. *Clinical Microbiology Review* 12 (4): 564–582.
- Cragg, G.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Product* 60: 52–60.
- Edwards, R and J.A. Gatehouse. 1999. Secondary metabolism. In Lea, P.J. and R.C. Leegood (ed.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- FAO/IAEA. 2000. *Quantification of Tannin in Tree Foliage: A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Coordinated Research Project 'Use of Nuclear and Related Techniques to Develop simple Tannin Assays for Predicting and Improving the Safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniferous Tree Foliage'*. USA: Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- Farnsworth, N.R. 1994. *Ethno-botany and the Search for New Drugs*. New York: John Wiley and Sons.
- Gottlieb, O.R and M.R.M.B. Borin. 2000. Medicinal Products: Regulation of Biosynthesis in Space and Time. *Mimeo Instituto de Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 95 (1): 115–120.
- Gross, G.G. 1992. Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Hagerman, A.E and T.H. Wilson. 1990. Quantitative Determination of Ellagic Acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38 (8): 1678–1683.
- Hagerman, A.E., C.T. Robbins, Y. Weerasuriya, T.C. Wilson, and C. McArthur. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management* 45 (1): 57–62.
- Harbone, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (Phytochemical Methods)*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soedino. Edisi ke-2. Bandung: Penerbit ITB.
- Harvey A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drugs Discovery Trends* 5 (7): 294–300.
- Hatano, T., A. Okonogi, and T. Okuda. 1992. Oligomeric hydrolyzable tannins from **Liquidambar formosa** and spectral analysis of the orientation of valemoyl groups in their molecules. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Hayashi, T., H. Maruyama, R. Kasai, K. Hattori, S. Takasuga, O. Hazeki, K. Yamasaki, and T. Tanaka. 2002. Ellagitannins from **Lagerstroemia speciosa** as activators of glucose transport in fat cells. *Planta Medica* 68: 173–175.
- Helm, R.F. 2000. Heartwood formation in woody plants. *Biotech Times* 7 (2): 1–3.
- Ito, H., M. Miyake, E. Nitishitani, K. Mori, T. Hatano, T. Okuda, T. Konoshima, M. Takasaki, M. Kozuka, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, and T. Yoshida. 1999. Anti-tumor activity of polyphenols from **Cowania mexicana** and **Coleogyne ramisissima**. *Cancer Letters* 143 (1): 5–13.
- Ivancheva, S., N. Manolova, J. Serkedjieva, V. Dimov, and N. Ivanovska. 1992. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Kakuda, T., I. Sakane, T. Takihara, Y. Ozaki, H. Takeuchi, and M. Kuroyanagi. 1996. Hypoglycemic effect of extracts from **Lagerstroemia speciosa** L. leaves in genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60 (2): 204–208.
- Kandil, F.E. and M.I. Nassar. 1998. A tannin anti-cancer promoter from **Terminalia arjuna**. *Phytochemistry* 47 (8): 1567–1568.
- Kanegusuku, M., J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, S.A. Yunes, V.C. Filho, A.A. Maia, M.M. de Souza, F.D. Monache, and R. Niero. 2002. Cytotoxic, hypoglycemic activity, and phytochemical analysis of **Rubus imperialis** (Rosaceae). *Z. Naturforsch* 57c: 272–276.
- Khan, M.T.H., L. Lampronti, D. Martello, N. Bianchi, S. Jabbar, M.S.K. Choudhuri, B.K. Datta, and R. Gambari. 2002. Identification of pyrogallol as an anti-proliferative compound present in extracts from the medicinal plant **Emblica medicinalis**: effect on in-vitro cell growth of human tumor cell lines. *International Journal of Oncology* 20: 187–192.
- Koya, D. and G.L. King. 1998. Perspectives in diabetes: protein kinase activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 49: 859–866.
- Latte, K.P. and H. Kolodziej. 2000. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi, and yeasts. *Z. Naturforsch* 55c: 467–472.
- Lee, K.H., H.K. Wang, H. Itokawa, and S.L. Morris-Natschke. 2000. Current perspectives on Chinese medicines and dietary supplements in China, Japan and the United States. *Journal of Food and Drug Analysis* 8 (4): 219–228.
- Liu, Z., S.B. Carpenter, W.J. Bourgeois, Y. Yu, R.J. Constantin, M.J. Falcon, and J.C. Adam. 1998. Variation in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in **Camptotheca acuminata**. *Tree Physiology* 18: 265–270.
- Liu, F, J.K. Kim, Y. Li, X. Liu, J. Li, and X. Chen. 2001. An extract of **Lagerstroemia speciosa** L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *Journal of Nutrition* 131: 2242–2247.
- Machado T.B., I.C.R. Leal, A.C.F. Amaral, K.R.N. dos Santos, M.G. da Silva, and R.M. Kuster. 2002. Antimicrobial ellagitannin from **Punica granatum**. *Journal of Brazilian Chemical Society* 13 (5): 606–610.
- Maher, J. Timothy. 2000. Alpha-lipoic acid and Co-Q10 in diabetes mellitus. *Natural Healing Track* [July]: 2–7.
- Marzouk, M.S., S.A. El-Tommy, F.A. Moharram, N.M. Shalaby, A.A. Ahmad. 2002. Pharmacologically active ellagitannins from **Terminalia myriocarpa**. *Planta Medica* 68 (6): 523–527.
- Mishra, Y., M.S.Y. Khan, R. Zafar, and S.S. Agarwal. 1990. Hypoglycemic activity of leaves of **Lagerstroemia speciosa** (L) Pers. *Indian Journal of Pharmacology* 22: 174–176.
- Mori, T., A.S.A. Mohamed, M. Sato, and T. Yamasaki. 2000. Ellagitannin toxicity in the free-living soil-inhabiting nematode, **Caenorhabditis elegans**. *Journal of Pesticide Science* 25: 405–409.
- Mullen, W., J. McGinn, M.E. Lean, M.R. MacLean, P. Gardner, G.G. Duthie, T. Yokota, A. Crozier. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Agricultural Food Chemistry* 50 (18): 5191–5206.
- Ogata, T., H. Higuchi, S. Mochida, H. Matsumoto, A. Kato, T. Endo, A. Kaji, and H. Kaji. 1992. HIV-1 reverse

- transcriptase Inhibitors from **Phyllanthus niruri**. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8 (11): 1937-1944.
- Okuda, T., T. Yoshida, and T. Hatano. 1992. Pharmacologically Active Tannins Isolated from Medicinal Plants. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Raskin, I., D.M. Ribnicky, S. Komamytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, and B. Fridlender. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20 (12): 522-531.
- Rauha, J.P. 2001. *The Search for Biological Activity in Finnish Plant Extracts Containing Phenolic Compounds*. [Dissertation]. Helsinki: Faculty of Science, University of Helsinki.
- Sakagami, H., Y. Jiang, K. Kusama, T. Atsumi, T. Ueha, M. Toguchi, I. Iwakura, K. Satoh, H. Ito, T. Hatano, and T. Yoshida. 2000. Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines—a possible mechanism. *Phytomedicine* 7 (1): 39-47.
- Salminen, J.P., V. Ossipov, J. Lojonen, E. Haukioja, and K. Pihlaja. 1999. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of **Betula pubescens** by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 864 (2): 283-291.
- Salminen, J.P., V. Ossipov, and K. Pihlaja. 2002. Distribution of hydrolysable tannins in the foliage of Finnish birch species. *Z. Naturforsch* 57c: 248-256.
- Scalbert, A. 1991. Anti-microbial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Scalbert, A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Serkedjieva, J. and N. Manolova. 1992. Plant polyphenolic complex inhibits the reproduction of influenza and herpes simplex viruses. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Shimizu, M., S. Horie, S. Terashima, H. Ueno, T. Hayashi, S. Suzuki, M. Yoshizaki, N. Morita. 1989. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. active components of a Paraguayan crude drug "parai-parai", **Phyllanthus niruri**. *Chemistry and Pharmacology Bulletin* 37 (9): 2531-2532.
- Smith PM. 1976. *The Chemotaxonomy of Plants*. London: Edward Arnold.
- Snustad, D.P., and M.J. Simmons. 2000. *Principles of Genetics*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Standaert, M.L., A. Avignon, K. Yamada, G. Bandyopadhyay, and R.V. Farese. 1996. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin, inhibits insulin induced activation of phosphatidylcholine hydrolysis and associated protein kinase C translocation in rat adipocytes. *Biochemistry Journal* 313: 1039-1046.
- Stepp, J.R. and D.E. Moerman. 2001. The importance of weeds in ethno-pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 19-23.
- Taylor, L. 2003. *Herbal Secrets of The Rainforest*. 2nd edition. Austin: Sage Press, Inc.
- Teng, C.M., Y.F. Kang, Y.L. Chang, F.N. Ko, S.C. Yang, F.L. Hsu. 1997. ADP-mimicking platelet aggregation caused by rugosin E, an ellagitannin isolated from **Rosa rugosa** Thunb. *Thrombocyte Haemost* 77 (3): 556-561.
- Trueblood, N. and R. Ramasamy. 1998. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. *American Physiological Society* 1: 175-183.
- Virag, L and C Szabo. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacological Review* 54 (3): 375-429.
- Wohlmuth, H. 2003. Triphala—a short review. *Botanical Pathways* 16: 1-7.
- Xu, Y.M, T. Sakai, T. Tanaka, G. Nonaka, I. Nishioka. 1991a. Tanin and related compounds CVI: Preparation of aminoalditol derivatives of hydrolysable tannins having α and β -glucopyranose cores, and its application to the structure elucidation of new tanins, reginin A and B, flosin A isolated from **Lagerstroemia flos-reginae** Retz. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39 (3): 639-646.
- Yokozawa, T., C.P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.I. Nonaka, and I. Nishioka. 1998. Study of inhibitory effect of tannins and flavonoid against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (chemotherapy and metabolic inhibitors). *Biochemistry and Pharmacology* 56 (2): 213-222.