

Review: Isolation, Analysis, Pharmacological Activity, and Toxicity of Sinensetin

Ria Hani Andira^{1*}, Wiwiet Yuniati², Ami Tjitraresmi³

¹Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Indonesia

²Departemen Laboratorium Obat Tradisional dan Suplemen Kesehatan, Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan Bandung

³Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Indonesia

Submitted 23 May 2024; Revised 30 May 2024; Accepted 4 June 2024 ; Published 12 August 2024

*Corresponding author: ria23003@mail.unpad.ac.id

Abstract

Orthosiphon aristatus is widely used in natural medicine both in herbal preparations, standardized herbal medicines and phytopharmaceuticals. Sinensetin, a polymethoxylated flavonoid derived from the *O. aristatus* plant has various pharmacological benefits with minimal toxicity. The presence of sinensetin in *O. aristatus* dried material and extract as raw materials for standardized herbal medicines and phytopharmaceuticals must meet the requirements of Indonesian Herbal Pharmacopoeia. This review aims to collect published information on the isolation and identification of sinensetin compounds from *O. aristatus* leaves from qualitative and quantitative testing of sinensetin in natural medicine raw materials, as well as information on the pharmacological activity and toxicity of sinensetin. The method used in this study is literature study from various databases: Google Scholar, PubMed and Science Direct. It is concluded that some known pharmacological activities of sinensetin are anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antiobesity, immunomodulator and vasorelaxant.

Keywords: Flavonoid, *Orthosiphon aristatus*, Sinensetin

Review: Isolasi, Analisis, Aktivitas Farmakologi Dan Toksisitas Sinensetin

Abstrak

Orthosiphon aristatus banyak digunakan dalam obat bahan alam baik dalam sediaan jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka. Sinensetin, flavonoid polimetoksilasi berasal dari tumbuhan *O. aristatus* yang memiliki beragam manfaat farmakologis dengan toksisitas minimal. Keberadaan sinensetin dalam simplisia dan ekstrak daun kumis kucing sebagai bahan baku obat herbal terstandar dan fitofarmaka harus memenuhi persyaratan yang ada pada Farmakope Herbal Indonesia. Tinjauan ini bertujuan untuk mengumpulkan informasi yang dipublikasikan mengenai isolasi dan identifikasi senyawa sinensetin dari daun kumis kucing dari pengujian kualitatif dan kuantitatif sinensetin pada bahan baku obat bahan alam, serta informasi mengenai aktivitas farmakologis dan toksisitas dari sinensetin. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan meninjau pustaka secara digital dari beberapa database: Google Scholar, PubMed dan Science Direct. Beberapa aktivitas farmakologis sinensetin yang telah diketahui adalah antikanker, antiinflamasi, antioksidan, antimikroba, antiobesitas, immunomodulator dan vasorelaksan.

Kata Kunci: Flavonoid, *Orthosiphon aristatus*, Sinensetin

1. Pendahuluan

Berbagai tanaman sudah banyak digunakan sebagai obat tradisional selama berabad-abad tidak hanya di Indonesia tetapi di seluruh dunia. Tanaman yang digunakan sebagai pengobatan tradisional memerlukan penelitian ilmiah untuk mengetahui khasiat yang terdapat di dalamnya untuk menjamin kebenaran khasiatnya. Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional yaitu tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). Secara tradisional herba kumis kucing digunakan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antihipertensi, antidiabetes dan antimikroba.¹ Hasil penelitian sudah banyak melaporkan aktivitas farmakologi dari kumis kucing, diantaranya adalah pencegahan dan pengobatan kanker,² antivirus,³ imunomodulator,⁴ antihipertensi,⁵ Antibakteri,⁶ antioksidan,⁷ gastroprotektif,⁸ antiobesitas,⁹ dan diuretik.¹⁰ Aktivitas farmakologi yang terdapat pada daun kumis kucing dikarenakan adanya kandungan fitokimia. Kandungan fitokimia *O. aristatus* sebagian besar berasal dari kelas polifenol (asam rosmarinik, asam kafeat dan asam sikorat), flavonoid (sinensetin dan eupatorin) dan terpenoid (ortosipol A-Z).¹¹

Sinensetin merupakan senyawa identitas dari tanaman kumis kucing yang ditemukan pada akhir tahun 1980. Sinensetin merupakan flavonoid golongan senyawa flavon polimetoksi yang berpotensi sebagai agen antivirus dan imunomodulator.¹² Kandungan senyawa sinensetin pada daun kumis kucing tidak kurang dari 0,1%.¹³

Kandungan senyawa sinensetin pada ekstrak daun kumis kucing telah digunakan sebagai bahan baku sediaan fitofarmaka dengan khasiat menurunkan dan menstabilkan tekanan darah. Uji klinis daun kumis kucing dilakukan dengan mengkombinasikan dengan *Apium graveolens* sebagai antihipertensi. Uji klinis dilakukan di Rumah Sakit Jantung Harapan Kita, Jakarta, Indonesia terdapat 160 pasien dengan tekanan darah tinggi. Semua subjek dibagi kedalam dua kelompok dan diberikan produk uji dengan dosis 250 mg tiga kali sehari. Kelompok kedua diobati dengan amlodipine sebagai standar dengan

dosis 5 mg lima kali per hari. Setelah 12 minggu pengobatan, tekanan darah sistolik dan diastolik mengalami penurunan. Elektrolit plasma, lipid, kadar glukosa darah dan fungsi hati tidak dipengaruhi oleh pemberian produk uji.¹⁴ Banyak sediaan jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka yang mengandung ekstrak daun kumis kucing dengan kandungan sinensetin dan pengawasan post market produk fitofarmaka yang mengandung senyawa sinensetin baru dimulai tahun 2024 dimasukkan ke pedoman sampling dan pengujian BPOM. Oleh karena itu perlu dilakukan studi literatur mengenai senyawa sinensetin untuk menjamin mutu produk jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka.

2. Metode

Penulisan jurnal ini berdasarkan review jurnal terkait dengan senyawa sinensetin, isolasi senyawa sinensetin dari *Orthosiphon aristatus*, aktivitas farmakologi sinensetin dan toksisitas sinensetin berupa artikel review dan artikel riset melalui google scholar, google cendikia, PubMed dan Science Direct dengan kata kunci kandungan fitokimia kumis kucing, isolasi senyawa sinensetin, *pharmacological activities of sinensetin* dan toksisitas sinensetin.

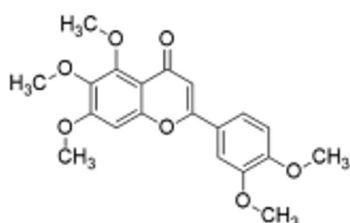
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Analisa Kandungan Sinensetin pada Daun Kumis Kucing

Penelitian mengenai analisa kandungan sinensetin pada daun kumis kucing yang berasal dari berbagai daerah di Malaysia telah dilakukan oleh Akowuah,¹⁵ dan berhasil memperoleh hasil kadar sinensetin tertinggi dari daerah Bota Kenan sebesar 1,7% dan terendah pada daerah Semmenggok yaitu 0,22% menggunakan metode HPLC menggunakan fase terbalik C18 kolom lichrosob dengan fase gerak metanol air tetrahidrofuran (45:50:5). Senyawa sinensetin merupakan produk metabolit sekunder dan dapat diproduksi secara in vitro melalui kultur kalus maupun kultur sel.

Sinensetin merupakan flavonoid terpolimetoksi mempunyai ikatan rangkap antara posisi 2 dan posisi 3 serta keton pada posisi 4 cincin C.¹⁷ Sinensetin adalah

pentametoksiflavan yang secara kimia dikenal sebagai 2-(3,4-dimetoksi fenil)-5,6,7-trimetoksi-4H-1 benzopiran -4-one. Kerangka flavon digantikan oleh gugus metoksi pada posisi 5,6,7,3' dan 4' masing masing dengan rumus molekul $C_{20}H_{20}O_7$ dan berat molekul 372,4 g/mol.¹⁸ Berikut adalah struktur senyawa sinensetin.



Gambar 1. Struktur sinensetin

3.2. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Sinensetin pada Ekstrak Daun Kumis Kucing

Bahan baku simplisia dan ekstrak yang digunakan dalam sediaan obat herbal terstandar dan fitofarmaka harus memenuhi standar mutu yang terdapat pada Farmakope Herbal Indonesia. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia edisi 2 tahun 2017 persyaratan kadar sinensetin pada bahan baku simplisia daun kumis kucing adalah tidak kurang dari 0,10% sedangkan pada ekstrak tidak kurang dari 1,10%.

Penetapan kadar sinensetin dalam simplisia dan ekstrak daun kumis kucing dilakukan dengan cara KLT Densitometri menggunakan fase gerak Diklorometan P dengan hasil tidak kurang dari 0,10%. Uji kualitatif senyawa identitas sinensetin pada daun kumis kucing dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan fase gerak Kloroform P-etil asetat dan fase diam Silika gel 60 F₂₅₄ dengan hasil nilai Rf pembanding sinensetin 0,50 dan Rf daun kumis kucing 0,50.¹⁹

Untuk uji kualitatif sinensetin, daun kumis kucing diekstraksi dengan etanol dan difraksinasi dengan n-heksan, etil asetat dan air. Fraksi n-heksan menghasilkan rendemen paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya, hasil ini menunjukkan bahwa sebaran senyawa non polar lebih banyak. Profil KLT dari ketiga fraksi tersebut dengan fase gerak n-heksan : etil asetat (3:7) terdeteksi adanya

senyawa sinensetin pada fraksi etil asetat dan n-heksan pada *retention factor* (Rf) 0,4 sedangkan berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia edisi 2 fase gerak yang digunakan untuk uji kualitatif sinensetin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis adalah kloroform P-etil asetat dengan perbandingan 60:40 dimana berdasarkan penelitian yang dilakukan sinensetin terdeteksi pada fraksi etil asetat dan n-heksan dengan Rf 0,41. Sinensetin lebih berfluoresensi pada fraksi etil asetat dibandingkan dengan fraksi n-heksana.²⁰ Sinensetin termasuk golongan senyawa flavon polimetoksi dengan adanya gugus metoksi membuat senyawa ini bersifat non polar dan cenderung mengarah non polar,²¹ sehingga sinensetin terdeteksi pada fraksi etil asetat dan n-heksana.

Penetapan kadar sinensetin dalam ekstrak etanol daun kumis kucing dilakukan dengan menggunakan TLC-Densitometri. Standard yang digunakan yaitu 5 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm dan 200 ppm (dalam etanol 96%) dengan volume totalan masing masing 10 µl. Kadar sinensetin dalam ekstrak daun kumis kucing dengan pelarut air sebesar 0,3 %, pelarut alkohol 50% sebesar 1,1 %, pelarut alkohol 70% sebesar 1,3 % dan pelarut alkohol 96% sebesar 1,9 %.²²

Berdasarkan hasil penelitian, kumis kucing mengandung persentase sinensetin, eupatorin, dan 3'-hidroksi-5,6,7,40-tetrametoksiflavan dalam ekstrak kloroform masing masing sebesar 1,48% ; 2,26 % dan 0,58% dengan menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). HPLC yang digunakan adalah Shimadzu dengan fase diam C18 (12,5 X 4,6 mm) dan fase gerak asetronitril, isopropyl alkohol dan 0,02 M phosphate buffer NaH₂PO₄ (30:15:55) dengan pH adjust 3.5 menggunakan 85% asam fosfat. Sistem elusi yang digunakan adalah isokratik dengan kecepatan alir 1 ml/menit pada suhu 25°C. Volume injeksi nya adalah 20 µl dan peak di deteksi pada panjang gelombang 340 nm.²³

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia edisi II, penetapan kadar sinensetin dalam simplisia dan ekstrak daun kumis kucing dilakukan dengan cara KLT Densitometri

menggunakan fase gerak Diklorometan P dengan hasil tidak kurang dari 0,10% untuk simplisia dan 1,10% untuk ekstrak. Berdasarkan hasil penelitian Elnoussi,²⁴ kadar sinensetin dalam ekstrak daun kumis kucing adalah 0,3%, 1,1 % dan 1,3% dimana untuk ekstrak yang menggunakan pelarut alkohol 70% kadarnya melebihi batas yang ditetapkan di Farmakope Herbal Indonesia edisi II.

3.3. Isolasi Senyawa Sinensetin

Senyawa sinensetin dalam tanaman kumis kucing dapat diisolasi menggunakan cara ekstraksi melalui maserasi, ekstraksi cair-cair, kromatografi cair vakum dan kolom gravitasi. Simplisia daun kumis kucing yang diekstraksi sebanyak 200 g dalam 3 L etanol 96% menghasilkan ekstrak pekat 26,835 g dengan persen rendemen 13,417% b/b. Rendemen fraksi n-heksan yang diperoleh adalah 50,511%, rendemen fraksi etil asetat 30,548% dan fraksi air 11,858%. Rendemen fraksi n-heksan paling tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan air, hal ini menunjukkan bahwa sebaran senyawa yang bersifat non polar lebih banyak.²⁵

Profil KLT dari ketiga fraksi terdeteksi adanya senyawa sinensetin pada fraksi etil asetat dan n-heksan pada fase gerak n-heksan : etil asetat (3:7) pada retention factor (Rf) 0,4 sedangkan terdeteksi senyawa sinensetin pada fraksi etil asetat dan n-heksan pada fase gerak kloroform : etil asetat (6:4) dengan nilai retention factor (Rf) 0,41. Fraksi etil asetat adalah fraksi yang dipilih untuk dilanjutkan pada tahap pemisahan lanjutan dengan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Senyawa sinensetin lebih berfluoresensi pada fraksi etil asetat dibandingkan pada fraksi n-heksan. Hasil Kromatografi Cair Vakum fraksi etil asetat menghasilkan 11 subfraksi namun yang terdeteksi adanya senyawa sinensetin hanya pada subfraksi 8-11 dengan nilai retention factor (Rf) 0,68.²⁶

Subfraksi 8-11 digunakan sebagai sampel dalam pemisahan lanjutan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan sistem fase gerak gradient n-heksan : etil asetat. Hasil kromatografi kolom adalah 142

subfraksi kolom (SFK) dimana pada rentang SFK 91-124 terdeteksi adanya senyawa sinensetin dan SFK lainnya tidak terdeteksi adanya senyawa sinensetin. SFK 91-124 dengan profil KLT sama digabungkan untuk dilakukan pemantauan KLT kembali. Sampel yang dihasilkan dari penggabungan SFK adalah SFKA (SFK 91,94,98,103,108,109,110,112,114), SFKB (SFK 115,116,118,119), SFKC (SFK 120-123) dan SFKD (SFK 124). Senyawa sinensetin terdeteksi pada SFK A-D dengan nilai retention factor (Rf) 0,5 dengan fasa gerak n-heksan : etil asetat (3:7). Fluoresensi yang dihasilkan SFK A lebih terang dibandingkan dengan subfraksi yang lainnya dan memiliki profil KLT yang baik sehingga SFK A dilanjutkan pada tahap pemurnian dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis Preparatif).²⁷

Analisa kemurnian terhadap isolat yang diperoleh menggunakan KLT 2D menghasilkan satu bercak dengan dua fasa gerak yang kepolarannya berbeda. Identifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis menghasilkan pola spectrum dengan dua pita dimana pita I memiliki panjang gelombang 328,6 nm dan pita II 264,2 nm. Pola spektrum pada standar sinensetin teridentifikasi dua pita dimana pita I memiliki panjang gelombang 324,1 nm dan pita II 265,3 nm. Kemiripan profil spektrum isolat dengan standar sinensetin menunjukkan bahwa isolat diduga senyawa sinensetin.²⁸

3.4. Efek Farmakologis Sinensetin

3.4.1. Aktivitas Antikanker

Sinensetin merupakan salah satu flavonoid polimetoksilasi yang telah diteliti aktivitas antikankernya dengan mekanisme yang melibatkan interaksi dengan P-glikoprotein, protein resistensi kanker payudara (ABCG2/BCRP), antiproliferasi dan antiangiogenesis.

Sinensetin bisa menghambat P-glikoprotein dalam beberapa penelitian. Peningkatan P-glikoprotein disebabkan karena adanya resistensi multidrug tumor (MDR).²⁹ P-glikoprotein yang berlebihan akan berkurangnya respon kemoterapi dan hasil klinis yang buruk pada berbagai jenis kanker.³⁰ Oleh karena itu penghambatan P-glikoprotein

adalah cara untuk membalikan MDR. Sinensetin ditemukan dapat menghambat P-glikoprotein dalam berbagai jenis sel seperti sel MDR1-MDCK II, sel Caco 2 dan sel K56A/ADM.³¹

Sinensetin dapat menginduksi respon antiproliferasi secara sinergis dengan 5-fluorouracil dalam sel HT29.³²

3.4.2. Aktivitas Antiinflamasi

Sinensetin menunjukkan aktivitas sedang pada pelepasan histamin basophil tetapi tidak pada neutrophil beta-glukuronidase. Pelepasan histamin basophil distimulasi oleh antigen, tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) dan kalsium ionofor masing masing melalui jalur imunologis yang diarahkan pada reseptor dan yang tidak diarahkan ke reseptor. Sinensetin menghambat pelepasan histamin yang distimulasi antigen dan TPA dengan IC₅₀ nilai masing masing 44 dan 26 μ m.³³

Sinensetin menghambat produksi prostaglandin E2 (PGE2) dengan nilai IC₅₀ 2,7 μ m. Selain itu untuk mendukung penemuan Shin34 pada iNOS dan COX-2 dan tidak ada penghambatan produksi. Dalam uji peradangan kaki yang diinduksi karagenan pengobatan sinensetin (50 mg/kg) secara intraperitoneal bisa menghambat peradangan kaki pada tikus, efeknya sebanding dengan deksametason 2 mg/kg yang menghambat respons edema sebesar 84%.³⁵

3.4.3. Aktivitas Antioksidan

Penghambatan 15-lipooksigenase berperan dalam oksidasi lipoprotein densitas rendah (LDL) yang bisa menyebabkan lesi aterosklerotik. Udara bisa menyebabkan inaktivasi 15-lipooksigenase dengan hilangnya gugus sulfhidril melalui oksidasi. Sinensetin dalam kumis kucing memiliki aktivitas antioksidan dari penangkap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil sebesar 84,2 %.³⁶

3.4.4. Aktivitas Antidiabetes

Mohamed³⁷ menunjukkan bahwa fraksi yang terdiri dari sebagian besar sinensetin dan eupatorin memiliki efek penurunan glukosa tertinggi. Orthosipon aristatus

mengurangi penyerapan glukosa jejunum tanpa mengubah tingkat insulin pada tikus yang diinduksi streptozosin. Hidrolisis pati oleh α -amilase pankreas dan pengambilan glukosa oleh α -glukosidase usus menyebabkan hiperglikemia pada diabetes mellitus tipe 2 ketika terjadi peningkatan kadar glukosa darah secara tiba-tiba.

Penghambatan yang kuat (89,0-32,0%) untuk α -glukosidase pada konsentrasi 2,5-0,31 mg/ml sebanding dengan nilai IC₅₀ 0,66 mg/ml terhadap akarbose (IC₅₀ 1,93 mg/ml) dan ekstrak etanol orthosipon aristatus (IC₅₀ 4,63 mg/ml).³⁸

3.4.5. Aktivitas Diuretik

O. aristatus memiliki aktivitas diuretik yang digambarkan dengan adanya peningkatan ekskresi ion terutama ekskresi ion kalium melalui urin walaupun aktivitasnya lebih rendah dibandingkan dengan furosemide pada tikus Sprague-Dawley.^{39,40}

Adenosin A1 antagonis reseptor berfungsi sebagai diuresis dan penginduksi ekskresi natrium yang memberikan perlindungan ginjal.⁴¹ Uji pengikatan reseptor adenosin A1 antagonis dilakukan pada tujuh metoksi flavonoid aktif dari orthosipon aristatus dengan hasil sinensetin nilai pKi (5,5 μ m), luteolin (5,4 μ m) dan kuersetin (5,8 μ m).⁴²

3.4.6. Aktivitas Vasorelaksan

Aktivitas vasorelaksan sinensetin berdasarkan penelitian Yam⁴³ melalui uji in vitro cincin aorta pra-kontraksi. Mekanisme kerjanya melalui jalur NO/sGC/cGMP dan indometasin, saluran kalium dan kalsium serta reseptor muskarinik dan beta-adrenergik. Sinensetin pada 0,03-2,11 μ m menyebabkan vasorelaksasi yang bergantung pada konsentrasi 1 μ m fenilefrin pre-kontraksi cincin aorta utuh-endotelium (pD₂=6,97, Emax = 108%).

3.4.7. Aktivitas Antimikroba

Pengujian 19 kultivar citrus sebagai antitrypanosomal untuk mengatasi trypanosomiasis Africa seperti *Trypanosoma brucei*, *T. brucei gambiense* dan *T. brucei rhodesiense*, menunjukkan efek penghambatan

pada ekstrak setoka (36%) pada *T. brucei* proliferasi dengan aktivitas paling tinggi pada ekstrak etil asetat. Setoka adalah salah satu hibrida generasi kedua antara kiyomi (*C. reticulata*) dan dengan spesies jeruk yang lainnya yang mengandung sinensetin.⁴⁴

3.5. Toksisitas Sinensetin

Penelitian Lam⁴⁵ toksisitas sinensetin paling rendah dibandingkan dengan nobiletin dan hesperetin dengan menggunakan embrio ikan zebra dengan parameter detak jantung embrio untuk menunjukkan status hidup embrio. Toksisitas senyawa ditentukan pada dosis uji dengan konsentrasi 30, 100 dan 300 µm selama 48 jam. 48 jam setelah perlakuan pada konsentrasi 100 µm sinensetin sekitar 40% embrio dilaporkan hidup dan survival rate mencapai 94,6%.

4. Simpulan

Sinensetin adalah golongan senyawa flavonoid polimetoksi yang memiliki banyak aktivitas farmakologi seperti antikanker, antiinflamasi, antidiabetes, antioksidan, antibakteri, vasorelaksan, immunomodulator dan diuretik. Sediaan fitofarmaka harus dijamin keamanan dan mutunya melalui serangkaian pengujian dengan beberapa parameter seperti organoleptis, kadar air, cemaran mikroba, cemaran logam berat, uji kualitatif dan kuantitatif untuk memastikan bahwa sediaan fitofarmaka sebelum dan sesudah diedarkan tetap memenuhi spesifikasi yang ditetapkan.

Daftar Pustaka

1. Ameer OZ, Salman IM, Asmawi MZ, Ibraheem ZO, Yam MF. *Orthosiphon stamineus*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J Med Food*. 2012;15(8):678-90
2. Pauzi, N., Mohd, K. S., Hidayah, N., and Halim, A. 2018. *Orthosiphon stamineus* Extracts Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Uterine Fibroid Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 19, 2737–2744. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.10.2737>
3. Ripim, M., Fazil, N., Ibrahim, K., Bahtiar, A., Wai, C., Ibrahim, N., and Nor, M. 2018. Antiviral Properties of *Orthosiphon stamineus* Aqueous Extract in Herpes Simplex Virus Type 1 Infected Cells. *Sains Malaysiana* 47(8), 1725–1730.
4. Harun, N. H., Septama, A. W., and Jantan, I. 2015. Immunomodulatory Effects of Selected Malaysian Plants on The CD18/11a Expression and Phagocytosis Activities of Leukocytes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5(1), 48–53. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30170-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30170-2)
5. Manshor, N. M., Dewa, A., Asmawi, M. Z., Ismail, Z., Razali, N., and Hassan, Z. (2013). Vascular reactivity concerning *Orthosiphon stamineus* Benth-mediated antihypertensive in aortic rings of Spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Vasc. Med.* 2013, 456852–456858. doi:10.1155/2013/456852
6. Ho, S. K., Tan, C. P., Thoo, Y. Y. Abas, F., and Ho, C. W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of antioxidants in misai kucing (*Orthosiphon stamineus*). *Molecules*. 19 (8), 12640–12659. doi:10.3390/molecules190812640
7. Ashraf K, Halim H, Lim SM, Ramasamy K, Sultan S. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiproliferative studies of four different extracts of *Orthosiphon stamineus*, *Gynura procumbens* and *Ficus deltoidea*. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(1):417–32.
8. Yuniarto A, Susilawati E, Khairunnisa I, Juanda D, Setiawan F. Antioxidant and gastric ulcer healing effect of *Orthosiphon stamineus* (Benth.) leaves extract in aspirin-induced rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(2):397–9.
9. Seyedan A, Alshawsh MA, Alshagga MA, Mohamed Z. Antiobesity and Lipid Lowering Effects of *Orthosiphon stamineus* in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Planta Med*. 2017;83(8):684–92.
10. Peraturan Menteri Kesehatan RI (2016). Nomor 6 tentang Formularium Obat Herbal Asli Indonesia. Jakarta: Menteri Kesehatan
11. Ameer OZ, Salman IM, Asmawi MZ, Ibraheem ZO, Yam MF. *Orthosiphon*

- stamineus: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J Med Food*. 2012;15(8):678-90
12. Berim, A., and Gang, D. R. 2016. Methoxylated Flavones: Occurrence, Importance, Biosynthesis. *Phytochemistry Reviews Springer Netherlands*. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9426-0>.
 13. Kementerian Kesehatan RI. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
 14. Adnyana, I. K., Setiawan, F. & Insanu, M. (2013). From Ethnopharmacology to Clinical Study of *Orthosiphon stamineus* benth. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5; 66-73.
 15. Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A, Khamsah SM. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem*. 2004;87(4):559-566. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.008
 16. Lee, H.J., Ibrahim, J., Syaratul, D.Y., Juriyati, J., Khairana, H. (2021). Sinensetin: An Insight on Its Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity. *Frontiers in Pharmacology*. Doi: 10.3389/fphar.2020.553404.
 17. Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci*. 5, e47. doi:10.1017/jns.2016.41.
 18. Lee, H.J., Ibrahim, J., Syaratul, D.Y., Juriyati, J., Khairana, H. (2021). Sinensetin: An Insight on Its Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity. *Frontiers in Pharmacology*. Doi: 10.3389/fphar.2020.55340
 19. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Hebal Indonesia Edisi II*. In *Farmakope Herbal Indonesia*.
 20. Fahrauk F, Soraya R., Adella S.P, Totik S.M., Elfahm., Sukrasno. Isolasi Sinensetin dari Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021 02 ; 111-127 doi :10.20961/jpscr.v6i2.48084
 21. Pang, S. F., Yusoff, M., and Gimbut, J. 2014. Extraction and Microencapsulation of Polyphenols from *Orthosiphon stamineus* Leaves, *Journal Of Mechanical Engineering And Sciences* 7, 1033–1041. <https://doi.org/10.15282/jmes.7.2014.2.010>
 22. Lusiana A., Rice D.O., Idha K. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. 2014 2(1)
 23. Elnoussi A.H.M., Mohammad J.A.S., Lee F.A., Amirin S., Sue H.C., Soo C.T., Mohd Z.A., Mun F.Y. Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 2012 : 176(12) ; 1472-6882-.
 24. Elnoussi A.H.M., Mohammad J.A.S., Lee F.A., Amirin S., Sue H.C., Soo C.T., Mohd Z.A., Mun F.Y. Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 2012 : 176(12) ; 1472-6882-.
 25. Fahrauk F, Soraya R., Adella S.P, Totik S.M., Elfahm., Sukrasno. Isolasi Sinensetin dari Kkumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021 02 ; 111-127 doi :10.20961/jpscr.v6i2.48084
 26. Fahrauk F, Soraya R., Adella S.P, Totik S.M., Elfahm., Sukrasno. Isolasi Sinensetin dari Kkumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021 02 ; 111-127 doi :10.20961/jpscr.v6i2.48084
 27. Fahrauk F, Soraya R., Adella S.P, Totik S.M., Elfahm., Sukrasno. Isolasi Sinensetin dari Kkumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021 02 ; 111-127 doi :10.20961/jpscr.v6i2.48084

28. Fahrauk F., Soraya R., Adella S.P., Totik S.M., Elfahm., Sukrasno. Isolasi Sinensetin dari Kkumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021 02 ; 111-127 doi :10.20961/jpscr.v6i2.48084
29. Qiu, Q., Shi, W., Zhao, S., Zhu, Y., Ding, Z., Zhou, S., et al. (2019). Discovery to Solve multidrug resistance: design, synthesis, and Biological evaluation of novel agents. *Archiv der Pharmazie- Chem. Life Sci*. 37, 28.
30. Waghray, D., and Zhang, Q. (2018). Inhibit or evade multidrug resistance P-glycoprotein in cancer treatment. *J. Med. Chem*. 61, 5108–5121. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01457.
31. Bai, J., Zhao, S., Fan, X., Chen, Y., Zou, X., Hu, M., et al. (2019). Inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein in vitro and in vivo: food/Herb-drug interactions and structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 369, 49–59. doi:10.1016/j.taap.2019.02.010.
32. Pereira, C. V., Duarte, M., Silva, P., Bento Da Silva, A., Duarte, C. M. M., Cifuentes, A., et al. (2019). Polymethoxylated flavones target cancer stemness and improve the antiproliferative effect of 5-fluorouracil in a 3d cell model of Colorectal cancer. *Nutrients*. 11. doi:10.3390/nu11020326.
33. Laavola, M., Nieminen, R., Yam, M. F., Sadikun, A., Asmawi, M. Z., Basir, R., et al. (2012). Flavonoid eupatorin and sinensetin present in *Orthosiphon stamineus* leaves inhibit inflammatory gene expression and Stat1 activation. *Planta Med*. 78, 779–786. doi:10.1055/s-0031-1298458.
34. Shin, H. S., Kang, S. I., Yoon, S. A., Ko, H. C., and Kim, S. J. (2012). Sinensetin attenuates LPS-induced inflammation by regulating the protein level of IKB- α . *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 76, 847–849. doi:10.1271/bbb.110908.
35. Laavola, M., Nieminen, R., Yam, M. F., Sadikun, A., Asmawi, M. Z., Basir, R., et al. (2012). Flavonoid eupatorin and sinensetin present in *Orthosiphon stamineus* leaves inhibit inflammatory gene expression and Stat1 activation. *Planta Med*. 78, 779–786. doi:10.1055/s-0031-1298458.
36. Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A, Khamsah SM. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem*. 2004;87(4):559-566. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.008
37. Mohamed, E. A., Yam, M. F., Ang, L. F., Mohamed, A. J., and Asmawi, M. Z. (2013). Antidiabetic properties and mechanism of action of *Orthosiphon stamineus* Benth bioactive sub-fraction in Streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Acupunct. Meridian Stud*. 6, 31–40. doi:10.1016/j.jams.2013.01.005
38. Mohamed, E. A., Siddiqui, M. J., Ang, L. F., Sadikun, A., Chan, S. H., Tan, S. C., et al. (2012). Potent α -glucosidase and -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Compl. Alternat. Med*. 12, 176–177. doi:10.1186/1472-6882-12-176
39. Adam, Y., Somchit, M. N., Sulaiman, M. R., Nasaruddin, A. A., Zuraini, A., Bustamam, A. A., et al. (2009). Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *J. Ethnopharmacol*. 124, 154–158. doi:10.1016/j.jep.2009.04.014.
40. Arafat, O. M., Tham, S. Y., Sadikun, A., Zhari, I., Haughton, P. J., and Asmawi, M. Z. (2008). Studies on diuretic and Hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. *J. Ethnopharmacol*. 118, 354–360. doi:10.1016/j.jep.2008.04.015.
41. Tofovic, S. P., Salah, E. M., Smits, G. J., Whalley, E. T., Ticho, B., Deykin, A., et al. (2016). Dual A1/A2b receptor blockade improves cardiac and renal outcomes in a rat model of heart Failure with preserved ejection fraction. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut*. 356, 333–340. doi:10.1124/jpet.115.228841.
42. Yuliana, N. D., Khatib, A., Link-Struensee, A. M., Ijzerman, A. P., Rungkat-Zakaria,

- F., Choi, Y. H., et al. (2009). Adenosine A1 receptor binding activity of methoxy flavonoids from *Orthosiphon stamineus*. *Planta Med.* 75, 132–136. doi:10.1055/s-0028-1088379.
43. Yam, M. F., Tan, C. S., and Shibao, R. (2018). Vasorelaxant effect of sinensetin via the No/Sgc/Cgmp pathway and potassium and calcium channels. *Hypertens. Res.* 41, 787–797. doi:10.1038/s41440-018-0083-8.
44. Nakanishi, M., Hino, M., Yoshimura, M., Amakura, Y., and Nomoto, H. (2019). Identification of sinensetin and nobiletin as major antitrypanosomal factors in a Citrus cultivar. *Exp. Parasitol.* 200, 24–29. doi:10.1016/j.exppara.2019.03.00.
45. Lam, I. K., Alex, D., Wang, Y. H., Liu, P., Liu, A. L., Du, G. H., et al. (2012). In Vitro and in Vivo structure and activity relationship analysis of polymethoxylated flavonoids: identifying sinensetin as a novel antiangiogenesis agent. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 945–956. doi:10.1002/mnfr.201100680.