

## ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Shorea foxworthyi* SYM STEAM BARK METHANOL EXTRACT

### Aktivitas Antimikroba dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang Tumbuhan *Shorea foxworthyi* Sym

Andi Hairil Alimuddin<sup>1</sup>, and Masriani<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, FMIPA, University of Tanjungpura, Jl. Jenderal Ahmad Yani Pontianak 78124

<sup>2</sup> Department of Mathematics and Natural Sciences Education, FKIP, University of Tanjungpura

Received 29 May 2007; Accepted 11 July 2007

#### ABSTRACT

Screening of antimicrobial activity compound from steam bark of *Shorea foxworthyi* Sym by Thin Layer Chromatography-Bioautography method have been conducted. The result of this research can be base in elucidation of antimicrobial activity compounds from *S. foxworthyi* Sym. The first step was done in this research that is maceration of *S. foxworthyi* steam bark using methanol solvent. Fractination to methanol extract was done using *n*-hexane, chloroform, and ethyl acetate solvent, respectively. Phytochemical screening were done to methanol, chloroform, *n*-hexane, and ethyl acetate fractions. Screening of antimicrobial activity compound were done to polar fraction such as methanol, chloroform, and ethyl acetate fraction. The bacteria were used in this screening such as *E. coli*, *S. aureus*, *S. thypii*, and *B. Subtilis*. The extract was highest antimicrobial activity choosed to test by Thin Layer Chromatography-Bioautography. The result was showed that chloroform extract was had highest antimicrobial activity and the flavonoide of compaund was considered having antimicrobial activity.

**Keywords:** antimicrobial, TLC-Bioautography, and *Shorea foxworthyi* Sym

#### PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang masih menduduki peringkat atas dari penyakit yang diderita oleh masyarakat. Penemuan berbagai jenis antibiotik telah berhasil menurunkan kematian dan mengatasi penyakit tersebut. Hal tersebut menimbulkan kepercayaan yang besar terhadap antibakteri untuk selalu berhasil dalam membunuh kuman dan menyembuhkan penyakit infeksi. Kepercayaan yang besar namun tidak dibarengi dengan pengetahuan tentang antibakteri menyebabkan obat tersebut sering digunakan secara tidak tepat dan berlebihan.

Penggunaan yang tidak tepat dan berlebihan akhirnya mendorong percepatan dan perluasan resistensi. Antibakteri yang dulunya sangat aktif terhadap suatu bakteri sekarang tak lagi mempan melawan bakteri tersebut sehingga perlu peningkatan dosis atau mencari senyawa baru.

Timbulnya resistensi bakteri penyebab infeksi terhadap antibakteri yang ada saat ini mendorong pencarian terus menerus senyawa antibakteri baru baik dari tumbuhan, hewan, maupun mineral. Salah satu tumbuhan yang potensial sebagai antibakteri adalah tumbuhan tekam *Shorea foxworthyi* Sym. Tumbuhan *S. foxworthyi* merupakan salah satu spesies dari tumbuhan famili *Dipterocarpaceae*. Famili *Dipterocarpaceae* terdiri dari 16 genus dan 600 spesies yang tersebar cukup luas, meliputi Asia, Afrika, dan Amerika. Dari sejumlah genus tersebut, 9 genus di antaranya berada di Indonesia salah satu diantaranya adalah genus *Shorea*.

Tumbuhan genus *Shorea* merupakan salah satu genus utama dalam famili *Dipterocarpaceae*. Genus *Shorea* terdiri dari 150 spesies [1] yang tersebar di Kalimantan, Sumatera, dan Jawa [2]. Keanekaragaman tertinggi tumbuhan tersebut terdapat di Kalimantan. Tumbuhan genus *Shorea* secara tradisional telah digunakan secara luas dalam bidang pengobatan untuk diare, disentri, penyakit kulit [3] dan untuk pengobatan penyakit flu [4].

Berdasarkan kajian pustaka, dari tumbuhan genus *Shorea* telah ditemukan berbagai jenis senyawa yang memiliki aktivitas menarik, seperti dari *S. stipularis* dan *S. disticha* telah ditemukan senyawa polifenol yang aktif sebagai antibakteri dan antifungi dan dari *Shorea sp* telah ditemukan senyawa vatanol A, ampelopsin C, malapinol A dan malapinol B yang dapat menghambat enzim 5  $\alpha$ - reduktase yang bermanfaat sebagai kosmetik, mencegah kerontokan rambut, dan obat jerawat [5]. Senyawa antimikroba lainnya adalah  $\epsilon$ -viniferin (diptoindonesin A) yang diisolasi dari *Shorea seminis* aktif sebagai antibakteri terhadap *Polia placenta*, *Gloeaphyllum trabeum* dan *Escheriacha coli*. Senyawa copalliferol A, kobapaenol A-B dan miyabenol C dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* [6]. Akan tetapi sampai saat ini belum diperoleh publikasi yang menerangkan aktivitas antibakteri maupun aktivitas biologik yang lain dari *S. foxworthyi*. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang tumbuhan tekam *S. foxworthyi* karena berdasarkan penelitian sebelumnya dari genus *Shorea*

\* Corresponding author.

Email address : andimuddin@yahoo.com

telah ditemukan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga diperkirakan dalam tumbuhan tekam juga terdapat senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antibakteri.

Salah satu metode yang saat ini luas digunakan dalam mendeteksi aktivitas antimikroba dari ekstrak tumbuhan adalah metode kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi. Metode ini merupakan metode yang cepat, sensitif, dan dapat melokalisir senyawa yang aktif sebagai antimikroba. Metode KLT-bioautografi dapat digunakan untuk mengisolasi senyawa aktif yang telah diuji. Pemisahan dilakukan di atas plat KLT silika gel menggunakan berbagai variasi pelarut organik sebagai fase gerak. Untuk deteksi senyawa yang ada menggunakan reagen penampak noda seperti  $H_2SO_4$  10%,  $CeSO_4$  1% , asam molibdat 2,5% dan reagen penampak noda lainnya [7,8]. Dengan menggunakan metode ini telah berhasil diisolasi senyawa antimikroba *N*-[10-(13,14-metilenedioksifenil)-7(*E*),9(*Z*)-pentadienoil]-pirolidin, arboreumin, *N*-[10-(13,14-metilenedioksifenil)-7(*E*)-pentaenoil]-pirolidin, *N*-[10-(13,14-metilenedioksifenil)-7(*E*),9(*E*)-pentadienoil]-pirolidin dan *N*-[10-(13,14-metilenedioksifenil)-pentanoil]-pirolidin dari *Piper arboreum* yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Cladosporium sphaerospermum* [9]. Dari tumbuhan *Bixa orellana* L diisolasi senyawa asam 6,6'-diapocarotene-6,6'-dioat and asam 9'-*cis*-6,6'-diapocarotene-6,6'-dioat yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* [10]. Senyawa fungitoksik yang diisolasi dari tumbuhan *Polygonum punctatum* adalah senyawa sesquiterpen poligodial [11] dan dari *Eleutherine bulbosa* diisolasi senyawa naphthoquinon [12].

## METODE PENELITIAN

### Pengumpulan dan Ekstraksi Sampel

Sampel tumbuhan berupa kulit batang tumbuhan tekam *S. foxworthyi* yang diambil dari Putussibau dibersihkan dan dikeringkan kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk dan diekstraksi. Untuk determinasi, daun (spesimen) tumbuhan dikirimkan ke Herbarium Bogoriense

Untuk ekstraksi sample kulit batang tumbuhan *S. foxworthyi* digunakan metode maserasi dengan pelarut metanol (MeOH). Maserasi dilakukan selama 3 x 48 jam sehingga diperoleh ekstrak metanol. Ekstraksi dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh hasil penyarian yang bening. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipisahkan dan dikeringkan dengan metode evaporasi menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak metanol kering. Ekstrak metanol kemudian difraksinasi dengan pelarut organik dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak kering dari ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat diuji aktivitas antimikrobanya.

## Uji Aktivitas Antimikroba

### Screening aktivitas antimikroba

Pada *screening* aktivitas, sebanyak 10 mg ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat dari kulit batang tekam dilarutkan dalam 200  $\mu$ L DMSO (0,2 mL) kemudian dicampurkan dengan glukosa nutrien agar (GNA) yang telah dicairkan sampai volume 10 mL. Campuran tersebut dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Setiap cawan petri dibagi menjadi empat zona untuk masing-masing mikroba uji yaitu *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *B. subtilis*. Mikroba uji yang kekeruhannya mencapai transmittan 25% diambil sebanyak 5  $\mu$ L dan diteteskan pada media yang sudah memadat. Setelah itu tetesan disebar di atas media dengan menggunakan driglasky (metode *surface plate*). Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama  $\pm$  24 jam. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif (+) sedangkan DMSO digunakan sebagai kontrol negatif (-). Ekstrak tekam yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba terhadap mikroba uji yang diperoleh dari hasil skrining kemudian dilanjutkan dengan analisis KLT-Bioautografi.

### Analisis KLT-bioautografi

Pemisahan senyawa secara KLT dilakukan dengan cara: sebanyak 100 mg ekstrak kering dilarutkan dalam 10 mL cairan pengelusi lalu ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 8 x 6 cm kemudian dielusi dengan cairan pengelusi yang sesuai dengan bejana kromatografi (*chamber*). Kromatogram hasil elusi diamati di bawah sinar UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian senyawa yang berfluorosensi diberi tanda [13,14].

Selanjutnya, dilakukan pengujian aktivitas antimikroba terhadap kromatogram yang diperoleh dengan menggunakan metode difusi agar [15]. Penggunaan aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zone bening di sekeliling koloni mikroba uji yang tumbuh pada permukaan medium. Noda yang memberikan zone bening menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai potensi antibiosis (sebagai senyawa antibiotik).

### Identifikasi Senyawa Antimikroba

Identifikasi senyawa antimikroba dilakukan dengan cara pita noda yang mempunyai nilai  $R_f$  sama dengan noda yang memberikan zone bening pada analisis KLT bioautografi diambil lalu didekantasi dengan pelarut metanol hingga diperoleh filtrate. Isolat dianalisis untuk menentukan karakteristik atau golongan senyawa antimikroba yang diperoleh. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi kimia yang meliputi identifikasi golongan senyawa terpenoid, steroid, flavonoid, alkaloid, dan saponin.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi terhadap 4,68 kg serbuk kulit batang tumbuhan *S. foxworthyi* selama 3 x 5 hari dengan menggunakan pelarut metanol menghasilkan ekstrak metanol total. Partisi berturut-turut dengan *n*-heksana, kloroform dan etil asetat terhadap ekstrak metanol total menghasilkan fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi metanol sisa masing-masing adalah 9,7; 20,65; 23,86 dan 57,1 g.

Pengujian fitokimia terhadap fraksi metanol, kloroform, dan etil asetat guna mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam masing-masing fraksi dilakukan dengan menggunakan pereaksi spesifik, yaitu serbuk magnesium dengan HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan FeCl<sub>3</sub> 10% untuk penentuan senyawa golongan flavonoid. Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan reagen Dragendorf dan Wagner. Pada pengujian golongan terpen dan steroid ditentukan dengan reagen Liebermann Buchard.

Pada uji FeCl<sub>3</sub> 10%, fraksi metanol dan etil asetat memberikan warna hijau kehitaman. Perubahan ini merupakan karakteristik untuk senyawa yang memiliki gugus fenolik. Penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat pada fraksi ini menghasilkan perubahan warna merah yang menunjukkan keberadaan senyawa turunan fenol kelompok flavonoid. Hal ini diperkuat melalui uji fitokimia menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat yang memberikan warna merah kecoklatan.

Fraksi kloroform memberikan warna hijau tua dengan uji FeCl<sub>3</sub> 10% yang mengidentifikasi adanya senyawa fenolik. Penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat pada fraksi ini menghasilkan perubahan warna oranye yang menunjukkan keberadaan senyawa turunan fenol kelompok flavonoid. Hal ini diperkuat melalui uji fitokimia menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat yang memberikan warna merah kecoklatan.

Pada pengujian fraksi *n*-heksana dengan FeCl<sub>3</sub> 10% tidak memberikan hasil yang positif terdapatnya golongan senyawa fenolik. Hal ini diperkuat melalui uji fitokimia dengan penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat pada fraksi ini tidak menghasilkan perubahan fisis yang menunjukkan keberadaan senyawa turunan fenol kelompok flavonoid (Tabel 1).

Pengujian fitokimia dengan Liebermann Buchard menunjukkan tidak terdapat senyawa golongan

terpenoid/steroid pada fraksi ketiga fraksi. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa terpenoid/steroid tidak terdapat pada fraksi metanol, kloroform, dan etil asetat yang kita ketahui merupakan fraksi-fraksi polar. Ini sesuai teori like dissolve like, bahwa hanya senyawa polar yang larut dalam polar, begitupula sebaliknya. Hasil ini juga mengindikasikan bahwa proses fraksinasi berlangsung sempurna, dimana senyawa terpenoid/steroid yang merupakan senyawa non polar tidak berada dalam fraksi-fraksi polar. Adapun data hasil pengujian fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

Screening aktivitas antimikroba dari fraksi metanol, kloroform, dan etil asetat dilakukan terhadap empat bakteri uji yaitu bakteri *E. coli* (EC), *B. subtilis* (BS), *S. aureus* (SA), dan *S. thypii* (ST). Adanya aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tam pak berupa daerah jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi lebih kecil dibandingkan dengan yang tidak dihambat. Oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga fraksi memberikan aktivitas terhadap bakteri uji. Bakteri yang paling rentan terhadap ketiga fraksi adalah *B. subtilis*, diikuti *E. coli* dan *S. aureus*. Bakteri *S. thypii* kurang rentan terhadap ketiga fraksi. Untuk memastikan fraksi yang paling aktif diantara ketiga fraksi tersebut, maka konsentrasi ditingkatkan dari 1 mg/ mL menjadi 2 mg/1 mL. Hasil pengamatan ketiga fraksi terhadap keempat bakteri uji menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba ketiga fraksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi. Dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa fraksi teraktif adalah fraksi kloroform (Gambar 1-3 dan Tabel 3).

Ekstrak kloroform sebagai ekstrak teraktif di antara ketiga fraksi uji selanjutnya ditotolkan pada lempeng kromatografi kemudian dielusi pada campuran eluen heksan-etil asetat dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Campuran eluen yang memberikan elusi terbaik adalah campuran heksan:etil asetat 2:1 (Gambar 4).

**Tabel 1.** Uji golongan senyawa flavonoid

Fraksi	FeCl <sub>3</sub> 10%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Mg + HCl	Keterangan
Metanol	Hijau kehitaman	Merah coklat	Merah coklat	+ flavonoid
Kloroform	Hijau tua	Merah coklat	Orange	+ flavonoid
Etil asetat	Hijau kehitaman	Merah coklat	Merah coklat	+ flavonoid

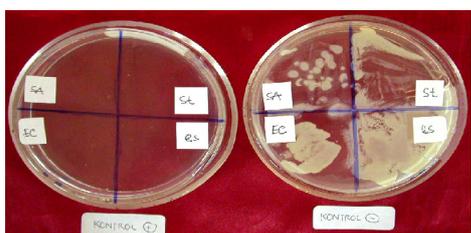
**Tabel 2.** Uji golongan senyawa terpenoid/ steroid

Fraksi	Liebermann-Buchard	Keterangan
Metanol	Coklat merah	(-)terpenoid/steroid
Kloroform	Coklat merah	(-)terpenoid/steroid
Etil asetat	Coklat merah	(-)terpenoid/steroid

**Tabel 3.** Hasil skrining aktivitas antimikroba ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat pada konsentrasi 1 mg/mL dan 2 mg/mL

Fraksi	Bakteri Uji							
	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. thypii</i>	
	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
MeOH	++	+++	+++	++++	++	+++	+	++
CHCl <sub>3</sub>	+++	++++	+++	++++	+++	++++	++	+++
EtOAc	++	+++	++	+++	++	+++	+	++
K-	----	----	----	----	----	----	----	----
K+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Keterangan: Makin banyak tanda (+) makin aktif  
 Makin banyak tanda (-) makin kurang aktif  
 K- : Kontrol negatif (DMSO)  
 K+ : Kontrol positif (kloramfenikol)

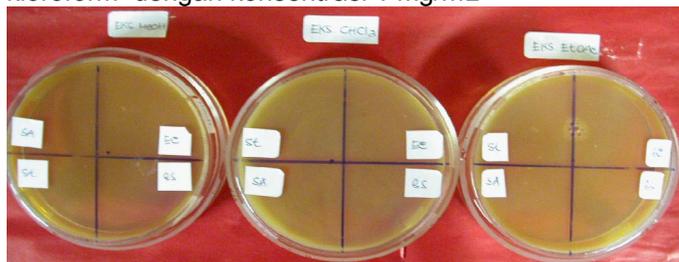


**Gambar 1.** Kontrol positif dan negatif



(a) (b) (c)

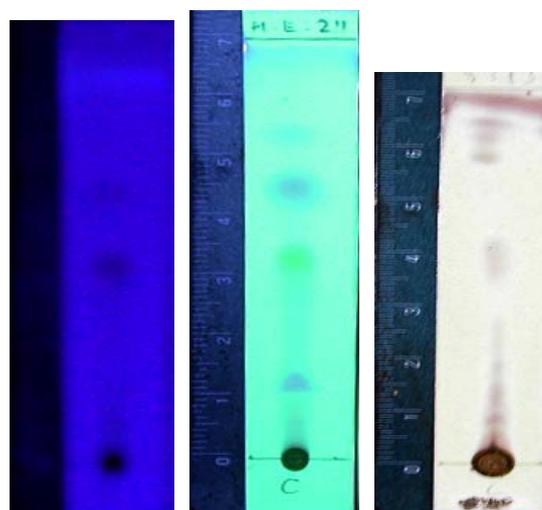
**Gambar 2.** Hasil skrining aktivitas antimikroba pada (a) ekstrak metanol, (b) fraksi etil asetat dan (c) fraksi kloroform dengan konsentrasi 1 mg/mL



(a) (b) (c)

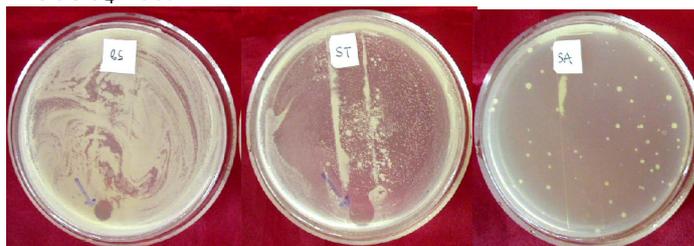
**Gambar 3.** Foto hasil skrining aktivitas antimikroba pada (a) ekstrak metanol, (b) fraksi kloroform dan (c) fraksi etil asetat dengan konsentrasi 2 mg/mL

Profil kromatogram ekstrak kloroform menunjukkan bahwa terdapat beberapa senyawa dalam ekstrak tersebut. Penggunaan metode KLT-Bioautografi dapat mendeteksi secara cepat noda pada kromatogram yang memberikan aktivitas antimikroba. Dari hasil KLT-bioautografi bercak pada sampel ekstrak kloroform dapat dilihat bahwa senyawa yang memberikan aktivitas antimikroba terdapat pada tempat penotolan (Gambar 5). Bercak tersebut memberikan daya hambat terhadap

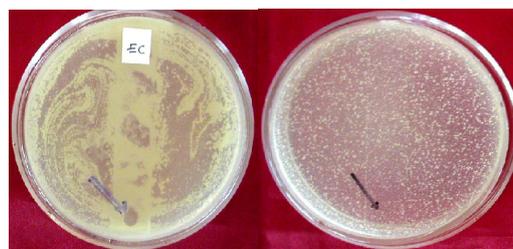


(a) (b) (c)

**Gambar 4.** Profil kromatogram ekstrak kloroform dengan eluen heksan- etil asetat 2:1 pada (a) UV 254, (b) UV 366 dan (c) reagen penampak noda CeSO<sub>4</sub> 15%



(a) (b) (c)



(d) (e)

**Gambar 5.** Hasil KLT-Bioautografi ekstrak kloroform terhadap (a) *B. Subtilis*, (b) *S. Thypii*, (c) *S. Aureus*, (d) *E. Coli* dan (e) *C. albicans*

bakteri *E. coli*, *B. Subtilis*, *S. thipii*, tetapi tidak terhadap *S. aureus*. Selain itu bercak tersebut juga memberikan zona hambat pada jamur *Candida albicans*. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa yang aktif sebagai antimikroba dalam ekstrak kloroform berspektrum luas yaitu aktif terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Dapat juga dikatakan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak kloroform aktif bukan hanya aktif terhadap bakteri juga terhadap jamur.

Hasil uji KLT-bioautografi juga menunjukkan bahwa senyawa yang aktif sebagai antimikroba tidak larut pada *n*-heksan dan etil asetat, kemungkinan senyawa ini larut dalam kloroform dan metanol. Hasil ini menyulitkan untuk mengisolasi senyawa yang aktif sebagai antimikroba, karena kemungkinan senyawa dalam bercak pada titik penotolan bukan merupakan senyawa tunggal tetapi campuran berbagai jenis senyawa. Oleh karena itu perlu perlakuan lebih lanjut untuk dapat mengisolasi senyawa aktif.

Untuk menentukan golongan senyawa yang aktif sebagai antimikroba, maka bercak pada titik penotolan direaksikan dengan reagen  $\text{FeCl}_3$  dan Shinoda Test. Hasil reaksi antara senyawa yang terdapat pada bercak yang memberikan aktivitas antimikroba dengan reagen  $\text{FeCl}_3$  menghasilkan perubahan warna dari coklat kemerahan menjadi warna hitam. Hal ini menunjukkan bahwa dalam bercak tersebut terdapat senyawa golongan fenol. Uji dengan serbuk magnesium dengan HCl (Shinoda test) memberikan warna merah jingga yang berarti bahwa senyawa fenol tersebut termasuk dalam kelompok flavonoid.

## KESIMPULAN

Ekstrak kulit batang tumbuhan tekam *Shorea foxworthyi* Sym memiliki aktivitas antimikroba. Ekstrak kloroform merupakan ekstrak yang paling aktif baik terhadap bakteri uji *E. coli*, *B. Subtilis*, *S. Thipii* dan *S. aureus* maupun jamur *Candida albicans*. Golongan senyawa yang aktif sebagai antimikroba dari ekstrak kloroform diperkirakan adalah senyawa flavonoid berdasarkan hasil pengujian fitokimia menggunakan reagen  $\text{FeCl}_3$  dan Shinoda Test.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departement Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cronquist, A., 1981, *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia in Press, New York.
2. Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia Vol. II*, Balai Kehutanan Indonesia, 1434.
3. Misra, L.N., and Ahmad, A., 1997, *Phytochemistry*, 45(3) 575-578.
4. Sangat, M., and Harini 2000, Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
5. Hirano, Y., 2001, *Patent Japan*, JP 99-94715 19990-401.
6. Sotheeswaran S and Pasupathy V, 1993, *Phytochemistry*, 32 (5), 1083-1092
7. Kanfer I, Skinner M.F, and Walker R.B., 1998, *J. Chromato. A*, 812, 255-286
8. Wedge D.E. and Nagle D.G., 2000, A New 2D-TLC *J. Nat. Prod.*, 63, 1050-1054
9. Silva R.V, Navickiene H.M.D, Kato M.J., Bolzani V.S., Méda C.I, Young M.C and Furlan M, 2002, *Phytochem.*, 59 (5), 521-527
10. Cuspinera V.G and Rankin S.A., 2005, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2524-2529
11. Alves TMA, Ribeiro FL, Kloos H, and Zani CL 2001. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 96, 831-833
12. Alves TMA, Ribeiro FL, Kloos H, and Zani CL 2003. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 98, 709-712
13. Betina, V., 1972. *Pharmaceutical Applications of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam
14. Hamburger, M.O, and G.A Cordell, 1987. *J.Nat.Prod.*, 50, 19-22
15. Rahalison, L. and K. Hostettmann, 1991. A *J.Phytochemistry*. 2, 199-203