

**ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA TRITERPENOID DARI
KULIT BATANG AMBACANG (*Mangifera foetida* L.) SERTA
UJI BRINE SHRIMP LETALITY TEST (BSLT)**

Adlis Santoni, Sabariah, dan Mai Efdi

Jurusan Kimia, Universitas Andalas, Padang, 25163, Indonesia

Email: maiefdi@yahoo.com

ABSTRACT

A brine shrimp toxic compound has been isolated from *Mangifera foetida* L. steam bark. Based on spectroscopic data (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 1D and 2D), the structure of this compound was identified as mangiferenes B, C₃₀H₄₇O₂. In this study, the n-hexane, ethyl acetate, methanol extracts and isolated compound showed toxic effects (LC₅₀ 471.9543; 534.5209, 678.4421, and 22.1615 µg/mL, respectively). The toxicity degree among the three extracts and isolated compound is isolated compound > n-hexane extract > ethyl acetate extract > methanol extract.

Keywords: cytotoxic effects, *Mangifera foetida* L. steam bark, *Mangiferenes B*

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara memiliki keanekaragaman hayati tinggi sehingga berpotensi dalam pengembangan obat herbal berbasis pada tanaman obat tradisional. Banyak tumbuhan yang sudah dimanfaatkan sejak lama sebagai obat-obatan tradisional tapi belum diketahui senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dari tumbuhan yang memiliki aktifitas sitotoksik adalah seperti lantanic acid yang diisolasi dari daun *Lantana camara* L. [1], sentulic acid dari *Sandoricum koetjape* dan Clerodermic acid (*Enicosanthum membranifolium*) memiliki aktifitas terhadap sel leukemia HL-60 [2,3]. Senyawa 3-methyl-1H-benz[f]indole-4,9-dione (*Goniothalamus tapis* Miq.) juga aktif terhadap sel kanker tersebut [4].

Salah satu genus tumbuhan yang banyak dijumpai di Indonesia adalah genus *Mangifera* yang termasuk pada famili Anacardiaceae. Spesies-spesies dari genus ini dikenal sebagai buah-buahan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Diantaranya

adalah mangga (*Mangifera indica*), paku (*Mangifera foetida* L.), dan kweni (*Mangifera odorata*).

Di Sumatera Barat tanaman *Mangifera foetida* L. banyak dijumpai dan telah digunakan sebagai obat tradisional sebagai obat cacung. Biji, kulit batang dan daun *Mangifera foetida* L. dilaporkan mengandung flavonoida dan tannin, di samping itu kulit batang dan daunnya juga mengandung polifenol, serta kulit batangnya juga mengandung saponin [5]. Ekstrak dari daun *Mangifera foetida* L. menunjukkan aktifitas antitumor [6] dan aktifitas antibakteri [7]. Buah *Mangifera foetida* L. menunjukkan aktifitas antioksidan [8].

Beberapa senyawa yang dilaporkan telah diisolasi dari kulit batang ambacang (*Mangifera foetida* L.) yaitu mangiferenes A, mangiferenes B, mangiferzene glucoside, mangiferolic acid, isomangiferolic acid, mangiferonic acid, 27-hydroxymangiferonic acid, mangiferadiol, 24-oxocycloart-25-en-3b-ol, 3b-taraxerol, betulinic acid, ligballinol, (+)-syringaresinol, vanillin, protocatechuic acid, 5,7-dihydroxychromone, quercetin, naringenin, (2S)-5, 7, 30, 50-tetra-

hydroxyflavanone, garbanzol, (+)-aromadendrin dan (+)-taxifolin yang aktif sebagai antioksidan dan antibakteri^[9].

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode yang sudah digunakan sebagai indikator toksisitas secara umum, khususnya sebagai petunjuk dalam pendeteksian sitotoksitas secara in vitro dalam produk alami laut serta senyawa antitumor dan pestisida. Pemilihan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ini karena terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas sel kanker.

Disisi lain, belum ada laporan tentang uji sitotoksik *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada ekstrak dan senyawa dari kulit batang *Mangifera foetida* L. ini. Uji fitokimia terhadap kulit batangnya menunjukkan positif mengandung senyawa flavonoid, fenolik, kumarin, steroid dan triterpenoid. Umumnya, senyawa triterpenoid bersifat toksik. Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan isolasi dan karakterisasi triterpenoid dari kulit batang *Mangifera foetida* L. serta uji sitotoksik *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *Mangifera foetida* L. sebanyak 10 kg yang diperoleh dari Nagari Padang Palangki, Kec. IV Nagari, Kab. Sijunjung. Sampel dikering anginkan selama 3 minggu pada udara terbuka yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung dan dihaluskan hingga diperoleh sampel serbuk kering sebanyak 5 kg.

Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia hingga isolasi senyawa adalah kloroform (Brataco), akuades, besi(III) klorida (Merck), anhidrida asetat (Fisson), amonia (Merck), pereaksi *Liebermann-Burchard* (asam sulfat pekat dan anhidrida asetat), metanol (Merck), etil asetat (Merck), n-heksana (Merck), kristal iod dan silika gel 60 F₂₅₄. Bahan yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah telur udang *Artemia salina* Leach, air laut, dan dimetilsulfoksida (DMSO).

Peralatan yang digunakan untuk pengerjaan isolasi adalah alat distilasi, alat *rotary evaporator* (Betracher Lamag[®]), oven (Fisher Scientific Isotemp[®] oven, model 630 F), lampu UV ($\lambda = 254$ nm dan 365 nm), *melting point apparatus* (Fisher Jhon), spektrofotometer UV-Vis (tipe UV-160 A; Shimadzu), spektroskopi NMR, spektrofotometri FTIR, kolom kromatografi, plat KLT (silika gel 60 F₂₅₄), dan pipet mikro.

Ekstraksi

Sampel yang telah berbentuk serbuk kering 5 kg dimaserasi dengan n-heksan selama 3 x 24 jam. Hasil maserasi kemudian disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksan. Perendaman dilakukan sebanyak delapan kali dan semua ekstrak kental n-heksana yang diperoleh digabung dan didapatkan ekstrak pekat n-heksan berwarna orange sebanyak 37 gram.

Ampas dari maserasi n-heksan dikeringkan dengan cara menguapkan sisa pelarut tersebut kemudian perendaman dilanjutkan dengan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam sebanyak tujuh kali dan semua ekstrak pekat etil asetat yang diperoleh digabung dan didapatkan ekstrak pekat etil asetat berwarna merah sebanyak 93 gram. Ampas dari maserasi etil asetat juga dikeringkan dengan cara menguapkan sisa pelarut tersebut kemudian perendaman dilanjutkan dengan pelarut metanol selama 3 x 24 jam sebanyak tiga kali dan semua ekstrak pekat metanol yang diperoleh digabung dan didapatkan ekstrak pekat metanol berwarna merah sebanyak 71 gram.

Ekstrak pekat metanol, etil asetat dan n-heksan dikromatografi lapis tipis untuk mengetahui pola pemisahannya dengan menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (9:1) dan (4:6) untuk fraksi n-heksan, perbandingan eluen n-heksan : etil asetat (8:2), (6:4) dan (4:6) untuk fraksi etil asetat, serta perbandingan etil asetat : metanol (3:7) dan (7:3) untuk fraksi metanol. Semua fraksi yang diperoleh juga dilakukan pengujian dengan pereaksi *Liebermann-Burchard* untuk menentukan fraksi yang mengandung terpenoid.

Uji Sitotoksik dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Ekstrak kental n-heksan, etil asetat dan metanol yang dihasilkan diuji menggunakan metoda *Brine Shrimps Lethality Test* yaitu dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji^[10].

Pembenihan Udang. Larva udang *Artemia salina* Leach ini diperoleh dengan cara menetas telur udang yang diperoleh dari Labor Biota Sumatera Universitas Andalas, selama 48 jam dalam wadah pembiakan. Wadah pembiakan terdiri atas dua bagian yaitu bagian terang dan bagian gelap. Wadah pembiakan ini kemudian diisi dengan air laut dan telur udang yang akan ditetaskan ditempatkan pada bagian gelap. Setelah menetas larva akan berenang menuju bagian terang.

Persiapan Larutan Uji dan Prosedur Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT. Persiapan sampel dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak pekat sebanyak 40 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol sampai volume 4 mL, sehingga didapatkan konsentrasi sampel 10 mg/mL (10^4 µg/mL) yang dianggap sebagai larutan induk. Disiapkan 75 vial uji untuk masing-masing ekstrak dan senyawa hasil isolasi dan 3 vial untuk larutan kontrol. Vial yang digunakan terlebih dahulu dikalibrasi pada volume tepat 5 mL. Vial uji terdiri dari 6 variasi konsentrasi yaitu 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 300 µg/mL, 100 µg/mL, 80 µg/mL, dan 40 µg/mL yang masing-masingnya dilakukan triplo. Larutan sampel diuapkan, setelah kering ditambahkan 50 µL larutan dimetil sulfoksida dan dicukupkan 5 mL dengan air laut. Untuk larutan kontrol hanya berisi 50 µL larutan dimetilsulfoksida dan dicukupkan 5 mL dengan air laut. Setelah itu, ke dalam masing-masing vial dimasukkan 10 ekor larva udang.

Terhitung sejak larva udang dimasukkan ke masing-masing vial, setiap 3 jam dalam 24 jam diamati jumlah kematian larva udang. Jumlah larva yang mati dihitung setelah 24 jam dan data ini diperlukan untuk menghitung persentase kematian, nilai probit dan menentukan nilai LC_{50} .

Pemurnian dengan Kromatografi

Dari hasil kromatografi lapis tipis, ekstrak pekat etil asetat memiliki pola pemisahan yang sederhana dan pada pengujian dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*, ekstrak pekat etil asetat menghasilkan warna merah bata, yang menunjukkan positif mengandung triterpenoid. Ekstrak pekat etil asetat (25 g) dikromatografi kolom dengan fasa diam silika gel 60 (0,063 – 0,200 mm). Eluen yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat dan metanol. Pengerjaan dimulai dari 100% n-heksana sampai 100% metanol didasarkan pada *step gradient polarity* (SGP) atau peningkatan kepolaran pelarut. Hasil kromatografi kolom tersebut ditampung pada vial dan dimonitor menggunakan KLT untuk mengetahui pola noda masing-masing vial. Hasil KLT yang menunjukkan pola noda yang sama digabungkan sehingga diperoleh 13 kelompok fraksi (A-M).

Fraksi G terdapat padatan putih, selanjutnya padatan dicuci, sampai dihasilkan senyawa murni yang ditunjukkan satu noda pada plat KLT dan dilakukan pengujian dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*.

Karakterisasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi dikarakterisasi titik leleh dengan melting point apparatus, spektrofotometer UV, FTIR dan spektrometer NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, 2D-NMR)

HASIL DAN DISKUSI

Pada penelitian ini dilakukan proses isolasi dengan cara maserasi (perendaman) yang dilakukan berulang-ulang dan dipekatkan sehingga didapatkan hasil seperti pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1, dapat dilihat bahwa rendemen ekstrak metanol dan etil asetat dari kulit batang *Mangifera foetida* L. lebih besar dibandingkan ekstrak n-heksan. Dari hasil KLT fraksi etil asetat memiliki pola KLT yang lebih sederhana dibandingkan kedua fraksi lainnya.

Tabel 1. Hasil ekstraksi sampel dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol

Ekstrak	Banyak pengulangan (kali)	Banyak larutan pengeksrak (liter)	Hasil ekstrak (gram)	Rendemen (%)
n-Heksan	8	20	37	0,74
Etil asetat	7	18	93	1,86
Metanol	3	4	71	1,42

Uji Sitotoksik dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Hasil pengamatan uji toksisitas terhadap ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol dan senyawa hasil isolasi dari dari *Mangifera foetida* L. dapat dilihat pada Tabel 2. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak dan senyawa hasil isolasi, semakin kecil persen kematian hewan uji tersebut. Menurut Harbone (1994) menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi suatu ekstrak, maka kematian hewan uji akan semakin tinggi^[13]. Toksisitas suatu bahan dipengaruhi oleh jenis komponen yang terdapat dalam ekstrak.

Dari hasil perhitungan LC_{50} dapat disimpulkan bahwa ketiga ekstrak dan senyawa hasil isolasi aktif terhadap pengujian toksisitas karena memiliki $LC_{50} < 1000$

mg/L. Menurut Meyer (1982) dan Anderson (1991), Pengujian BSLT dianggap berpotensi jika ekstrak menyebabkan kematian 50% terhadap *Artemia salina* L. pada konsentrasi kurang dari 1000 mg/L^[11,12]. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak dan senyawa hasil isolasi, semakin besar pula mortalitas hewan uji tersebut

Pemurnian dengan Kromatografi

Senyawa hasil isolasi yang diperoleh dari pemurnian dengan kromatografi kolom dan dilanjutkan dengan teknik rekristalisasi berbentuk serbuk berwarna putih. Kemudian senyawa hasil isolasi diuji dengan KLT dan penampak noda. Pengujian KLT dilakukan dengan variasi tingkat kepolaran eluen, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3 dan dimonitoring nodanya dengan lampu UV dan pereaksi Lieberman-Burchard (Tabel 4).

Tabel 2. Nilai LC_{50} fraksi n-heksana, etil asetat dan metanol

No	Fraksi	Regresi	LC_{50} (mg/L)
1	n-Heksana	$Y = 0,966X + 2,417$	471,9543
2	Etil Asetat	$Y = 2,496X - 1,809$	534,5209
3	Metanol	$Y = 2,475 X - 2,008$	678,4221
4	Senyawa isolasi	$Y = 0,596 X + 4,198$	22,1615

Tabel 3. Hasil uji kemurnian senyawa hasil isolasi dengan plat KLT

No	Eluen	Rf	Noda
1	Heksana : etil asetat (8:2)	0,27	Tunggal
2	Heksan : etil asetat (2:8)	0,67	Tunggal
3	Etil asetat	0,75	Tunggal

Tabel 4. Hasil KLT senyawa hasil isolasi dengan beberapa penampak noda

No	Penampak Noda	Hasil	Warna Noda
1	Lampu UV 254 nm	Tidak ada	-
2	Lampu UV 356 nm	Tidak ada	-
3	Lieberman Burchard	1 noda	Merah bata

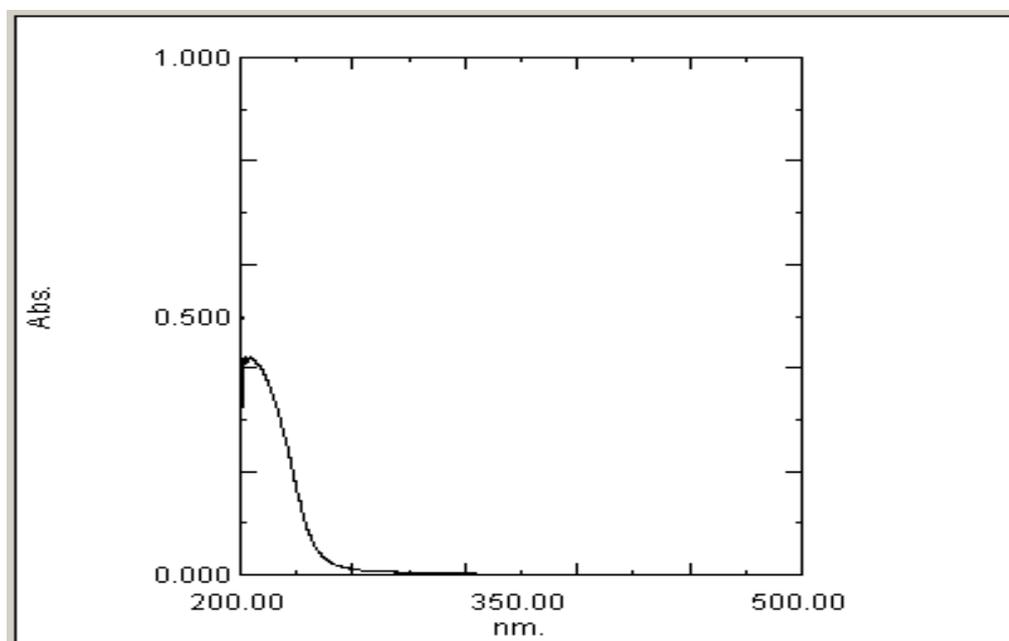
Berdasarkan Tabel 3 dan 4 menunjukkan bahwa senyawa yang telah diisolasi telah murni, karena telah menunjukkan satu noda tunggal dan selanjutnya diuji dengan pereaksi *Liebermen Buchard* memberikan warna merah bata yang menunjukkan bahwa senyawa isolasi merupakan golongan triterpenoid.

Karakterisasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa isolasi berbentuk serbuk putih dengan titik leleh 220-221 °C, serapan UV λ_{\max} (MeOH) pada panjang gelombang 206.4 nm yang menunjukkan transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan rangkap yang tidak

berkonjugasi. Karakterisasi triterpenoid senyawa hasil isolasi dilakukan dengan spektrofotometer IR memperlihatkan beberapa serapan penting pada ν_{\max} (cm^{-1}), 3421,50(-OH), 1054,9 (C-O), 2934,38 (C-H), 1647,01 (C=C), 1670,29 (C = O), 1472,84 dan 1332,21(gugus germinal dimetil). Spektrum UV dan IR senyawa isolasi ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2.

Data pergeseran kimia senyawa isolasi ini dibandingkan data senyawa mangiferene B yang diisolasi oleh Kanda Patopang, Ratanaporn S., Vatcharin R., Nongporn H. T., Supayang P.V., Jongkon S.(2015) dari kulit batang *Mangifera foetida* L. Tabel data ^{13}C dan ^1H NMR dapat dilihat pada Tabel 5.

**Gambar 1.** Hasil spektroskopi UV senyawa isolasi.

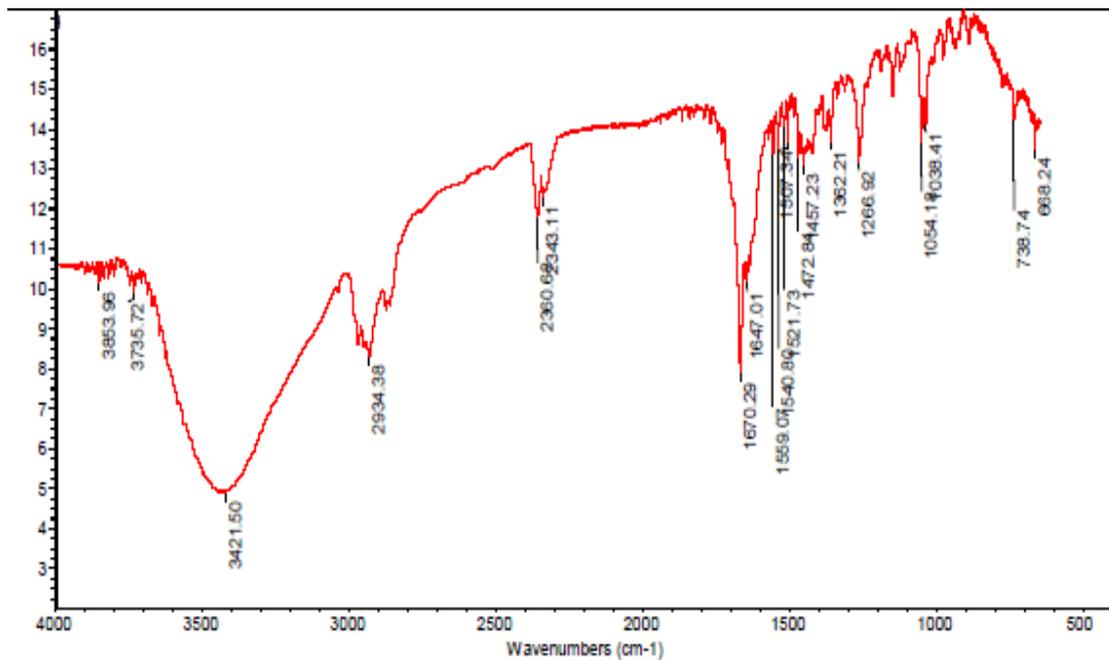
Tabel 5. Perbandingan data pergeseran kimia senyawa isolasi dan senyawa mangiferenes B

No	Senyawa isolasi		Literatur	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C , ppm	δ_H (ppm)
1	36,01	1,26(4H,m)	37,5	1,59, m, 2,38,t, 11,7
2	68,72	3,9 (1H,dd)	69,1	4,36, ddd, 11,7, 4,2, 2,7
3	79,48	3.3(1H,s)	80,4	3,86, br d, 2,7
4	39,73		40,8	
5	40,13	1,84(1H,dd)	40,6	2,22, dd, 12,6, 3,9
6	20,81	0,95 , 0,88,1H (2H)	21,5	0,78, m, 1,55, m
7	25,67	2,06 , 2,25 (1H,m)	26,4	1,13, m, 2,12, m
8	47,83	3.3 (1H, m)	48,3	1,59, m
9	19,18		19,7	
10	25,35		26,4	
11	26,40	1,2(4H, m)	27,1	1,62, m, 2,05 m
12	35,47	1,34 (4H, s)	33,5	1,63, m
13	45,31		45,9	
14	49,53		49,5	
15	35,49	1,67(2H, m)	36,1	1,33, m
16	28,12	1,34(4H, s)	28,7	1,33, m, 1,90, m
17	52,20	3,92 (1H, dd)	52,8	1,67, m
18	18,1	0,95(10H, m)	18,7	1,00, s
19	29,72	0,57, 0,41(1H, t)	30,2	0,42,d, 3,6 0,54, d, 3,6
20	35,95	1,9, m	36,6	1,23, m
21	17,96	1,66 (1H, m)	18,6	0,96, d, 6,3
22	35,84	0,95(10H, m)	35,8	1,61, m
23	25,79	1,94, 2,15 (1H, m)	26,3	1,14, m, 1,34, m
24	143	6,7(1H, t)	142,8	7,23,t, 7,5
25	128		129,3	
26	171		171,2	
27	12,8	1,81(3H, d)	13,2	2,14, s
28	20,60	0,88 (3H, d)	21,5	1,00, s
29	25,95	1,15(3H, d)	27,3	1,27, s
30	19,2	0,95(19H, m)	19,8	0,91, s

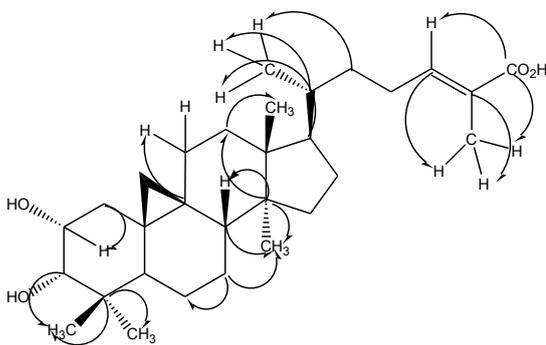
Dari Tabel 5 terlihat bahwa senyawa isolasi menunjukkan ciri-ciri suatu triterpenoid karena data pergeseran kimia ^1H dan ^{13}C NMR nya hampir mirip dengan data pergeseran kimia triterpenoid mangiferenes B yang terdapat pada literatur. Dengan demikian diduga bahwa senyawa hasil isolasi

adalah mangiferenes B. Struktur senyawa mangiferenes B dapat dilihat pada Gambar 5.

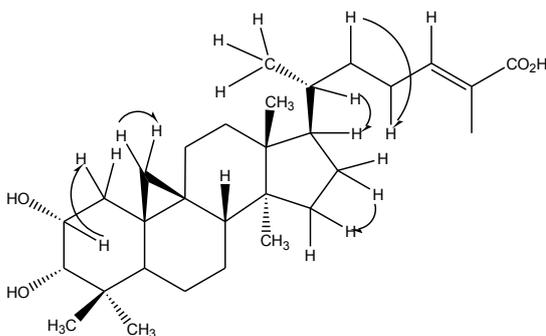
Korelasi proton dan karbon tetangga (HMBC) dalam senyawa isolasi dan korelasi proton dengan proton (^1H - ^1H COSY) ditunjukkan pada Gambar 3 dan Gambar 4.



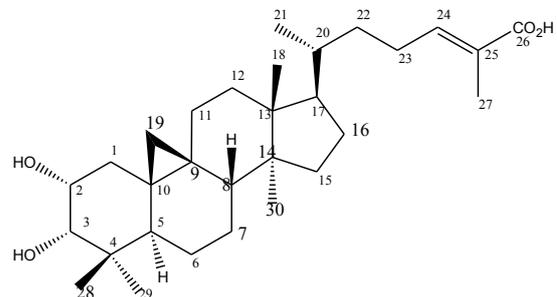
Gambar 2. Spektrum Inframerah senyawa isolasi.



Gambar 3. Korelasi antara proton dan karbon tetangga (HMBC).



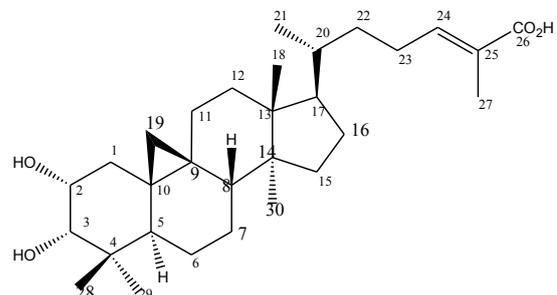
Gambar 4. Korelasi ¹H-¹H COSY.



Gambar 5. Struktur mangiferenes B.

KESIMPULAN

Berdasarkan dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan suatu triterpenoid dengan nama mangiferenes B, berupa padatan putih, titik lelehnya 220 – 221 °C dengan struktur sebagai berikut:



Hasil uji sitotoksik BSLT terhadap ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol dan senyawa hasil isolasi bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ masing-masing: 471,95 µg/mL; 534,52 µg/mL; 678,42 dan 22,1615 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ruslan E., Yunazar M., Suryati, Hermansyah Aziz, Structure elucidation of brine shrimp toxic compound from *Lantana camara* L. leaves. *J. Chem. Pharm. Res.*, **7**(12): 250-255 (2015).
2. Efdi, M., Ninomiya, M., Suryani, E., Tanaka, K., Ibrahim, S., Watanabe, K., & Koketsu, M., *Sentulic acid: A cytotoxic ring A-seco triterpenoid from Sandoricum koetjape Merr. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**: 4242–4245 (2012).
3. Efdi M., Itoh T., Akao Y., Nozawa Y., Koketsu, M., and Ishihara H., 2007. The isolation of secondary metabolites and in vitro potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3667–3671 (2007).
4. Efdi M., Fujita S., Toshiyasu Inuzukac and Koketsu M., Chemical studies on *Goniothalamus tapis* Miq. *Nat. Prod. Res.*, **24**(7): 657–662 (2010).
5. Widyaningrum, Herlina dan Tim Solusi Alternatif (2011). *Kitab Tanaman Obat Nusantara*. Medpress (Anggota IKAPI).
6. Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Screening for in vitro anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Lett.* **95**: 139–146 (1995).
7. Grosvenor, P.W., Supriono, A., Gray, D.O., Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *J. Ethnopharmacol.* **45**: 97–111 (1995).
8. Ikram, E.H.K., Eng, K.H., Jalil, A.M.M., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A., Nazri, H.S.M., Diton, N.A.M., Mokhtar, R.A.M., Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *J. Food Compos. Anal.* **22**: 388–393 (2009).
9. Kanda, Panthong, Ratanaporn S., Vatcharin R., Nongporn H. T., Supayang P.V., Jongkon S. Two new triterpenes and a new coumaroyl glucoside from the twigs of *Mangifera foetida* Lour, *Phytochem. Lett.* **11**: 43–48 (2015).
10. Muaja, Arter D., Harry S. J. Koleangan, Max R. J. Runtuwene: Uji Toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode Soxhletasi. *Jurnal MIPA Unsrat Online* **2**: 115-118 (2013).
11. Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D. E., and McLaughlin J. L., Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med.* **45**(1): 31-34 (1982).
12. Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L. and Suffness, M., A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal.*, **2**(3): 107-111 (1991).
13. Harborne, J. B. *The Flavonoids*. Chapman and Hall. London (1994).