

Isolasi Biflavonoid Baru dari *Garcinia tetranda* Pierre Berdasarkan Jalur Biogenesis dan Aktivitas terhadap Antibakteri

Novi Sulistyaningrum¹, Taslim Ersam²

¹ Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan-Badan Litbangkes Kemenkes RI

² Jurusan Kimia-Fakultas MIPA, ITS Surabaya

email: novisulistya@litbang.depkes.go.id

Abstract

Garcinia tetranda Pierre (Clusiaceae) is a plant that is widely used to treat various diseases and its chemical compounds has not been much studied. Compound isolation using the three methods of chromatography (Vacuum Liquid Chromatography Column (VLCC), preparative Thin Layer Chromatography (pTLC) and TLC) generate novel compound 5,7,4', 5'', 7'', 3''', 4'''-heptahidroksi-2'''-methoxy-flavanon [3,8]-flavone" which is different from the compounds that had been found previously in *Garcinia tetranda* Pierre. Structure identification was conducted using UV, IR and NMR spectroscopic data and by comparing the ¹³C and ¹H-NMR data of the isolate compound and known biflavonoid compounds. Biogenesis pathway analysis of the new compound showing relationship with molecular compounds which have previously been found in *Garcinia*. Antibacterial test of the novel compound using Kirby-Bauer agar diffusion method against Gram-negative bacteria *Salmonella typhi* showed that the compound is not potentially used as antibacterial agent compared to chloramphenicol.

Keywords: *Garcinia tetranda*, Biflavonoid, Biogenesis, *Salmonella typhi*

Pendahuluan

Hutan tropika adalah gudang senyawa organik bahan alam yang mempunyai struktur molekul beraneka ragam, dengan aktivitas biologi yang luar biasa.¹ Hutan tropis banyak ditemukan di negara Indonesia, berkaitan dengan kondisi alam yang beriklim tropis dengan curah hujan tinggi, terdiri dari pulau-pulau dan diapit oleh 2 samudera.²

Ramuan obat tradisional dari bahan tumbuhan telah digunakan sejak dahulu untuk mengobati penyakit, namun demikian laporan penelitian mengenai kandungan senyawa kimia di dalamnya masih sangat terbatas. Berbagai macam khasiat

obat suatu tumbuhan ditimbulkan oleh kemampuan tumbuhan dalam merekayasa molekul metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari tantangan lingkungan sekitar.³ Tumbuhan dalam satu famili atau genus sama yang tumbuh di tempat berbeda pada dasarnya secara kualitas memiliki kandungan senyawa kimia yang sama namun berbeda kuantitasnya.

Garcinia (Clusiaceae) merupakan tumbuh-tumbuhan yang terdapat di hutan tropis Indonesia dan memiliki berbagai manfaat dalam kehidupan manusia. Berdasarkan hasil penelitian Tahan Uji Puslit Biologi-LIPI pada tahun 2007 terhadap 64 spesies *Garcinia* yang tersebar di In-

donesia, tercatat 22 jenis *Garcinia* buahnya dapat dimakan, 21 spesies lainnya memiliki nilai kayu tinggi sebagai bahan bangunan. Berdasarkan studi literatur, tumbuh-tumbuhan genus *Garcinia* (Clusiaceae) telah dikenal sebagai sumber senyawa santon dan biflavonoid⁴ dengan berbagai macam bioaktivitas, seperti antimalaria,⁵ antijamur, antikanker, dan antibakteri.⁶

Salah satu spesies *Garcinia* yang belum banyak diteliti adalah *Garcinia tetranda* Pierre (wadung). Tumbuhan ini banyak tersebar di daerah Indonesia Timur dan merupakan koleksi Taman Nasional Meru Betiri, Jember. Berdasarkan hasil penelitian kelompok kimia tumbuhan ITS, *Garcinia tetranda* Pierre dilaporkan mengandung senyawa santon, mayoritas adalah santon terprenilasi mulai dari monoprenilasi sampai triprenilasi, santon termodifikasi, dan santon teroksidasi. Jenis santon terprenilasi seperti α -mangostin yang diisolasi dari kulit akar tanaman ini⁷ juga ditemukan dalam tumbuhan *Garcinia mangostana* dan dilaporkan aktivitasnya sebagai antibakteri.⁸ Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Purwaningsih⁹ terhadap ekstrak diklorometana kayu batang *Garcinia tetranda* Pierre, menghasilkan 1,3,6,7-tetrahidroksisanton yang diketahui bioaktivitasnya sebagai antioksidan. Penelitian mengenai aktivitas senyawa dalam tumbuhan *Garcinia tetranda* masih sangat terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian aktivitas untuk menambah informasi keragaman bioaktivitas senyawa dari *Garcinia tetranda*, misalnya sebagai antibakteri.

Bakteri Gram-negatif berkaitan erat dengan berbagai penyakit, misalnya *Salmonella typhi* penyebab demam typhoid, yang menjadi masalah kesehatan di berbagai negara berkembang. Insiden

demam typhoid di Indonesia rata-rata terjadi 900000 kasus per tahun, dengan angka kematian lebih dari 20000.¹⁰ Demam typhoid ditemukan hampir sepanjang tahun terutama pada musim panas.¹¹

Penelitian ini bertujuan untuk menambah informasi keragaman senyawa dan bioaktivitas tumbuhan *Garcinia tetranda* sebagai antibakteri gram negatif *Salmonella typhi*, sehingga dapat memberikan kontribusi dalam penanggulangan masalah kesehatan.

Metode

Penelitian dilakukan pada tahun 2008 di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia-Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Pengukuran spektroskopi dilakukan di LIPI Serpong dan laboratorium kimia Universitas Negeri Surabaya. Pengujian antibakteri dilakukan di Tropical Diseases Center (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

Sampel yang digunakan berupa kayu batang *Garcinia tetranda* Pierre (wadung) yang diperoleh dan diidentifikasi ciri-ciri morfologinya dari Taman Nasional Meru Betiri, Jember.

Bahan-bahan yang digunakan meliputi n-heksana (C_6H_6), diklorometana (CH_2Cl_2), etil asetat (EtOAc), aseton ($CO(CH_3)_2$), metanol (MeOH), kloroform ($CHCl_3$), metanol. Selain pelarut juga digunakan silika gel 60 G Merck untuk kromatografi kolom, silika gel GF₂₅₄ Merck untuk KLTp, plat KLT silika gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm ukuran 20x20 cm dengan alumunium sebagai penyangga fasa diam, larutan penampak noda 1,5% serum sulfat dalam H_2SO_4 2N. Bakteri yang digunakan adalah *Salmonella typhi* lokal terstandarisasi API 20E.

Peralatan yang digunakan antara lain rotari evaporator vakum BUCHI, peralatan kromatografi cair vakum (KCV), *chamber*

kromatografi lapis tipis preparatif (KLTp), seperangkat alat uji titik leleh Fisher-John, spektrofotometer UV Shimadzu pada panjang gelombang 200-600 nm, spektrometer FTIR Shimadzu dengan metoda pelet KBR pada daerah 4000-400 cm^{-1} , spektrometer NMR JEOL-ECA 500 dengan pelarut aseton dan seperangkat alat uji antibakteri.

Cara Kerja

Isolasi dan Penentuan Struktur

Prosedur isolasi yang dilakukan adalah sesuai dengan prosedur standar isolasi bahan alam dengan variasi pelarut. Serbuk kayu batang kering *Garcinia tetranda* sebanyak 1,5 kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol. Ekstrak metanol diuapkan pelarutnya dengan alat rotari evaporator sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat metanol dipartisi dengan etil asetat dan akuades. Fraksi etil asetat diuapkan sampai didapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat etil asetat difraksinasi KCV menggunakan eluen n-heksana/EtOAc yang ditingkatkan kepolarnya, sehingga dihasilkan fraksi-fraksi. Fraksi yang memiliki harga R_f relatif sama digabungkan. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksana/EtOAc, dilanjutkan KLTp menggunakan eluen CH_2Cl_2 /aseton 50%. Senyawa tunggal diuji kemurniannya dengan KLT 2 dimensi dan diukur titik lelehnya. Senyawa murni kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV, spektrometer IR, ^1H dan ^{13}C NMR dan dibandingkan dengan data senyawa yang telah dilaporkan pada penelitian terdahulu untuk dianalisa strukturnya.

Uji Antibakteri

Uji antibakteri isolat dilakukan di Tropical Diseases Center (TDC)- Universitas Airlangga Surabaya, secara in-

vitro terhadap bakteri gram-negatif *Salmonella typhi* 261 lokal terstandarisasi API 20E menggunakan metode Kirby-Bauer dengan identifikasi zona gelap-terang di seputar well (sumur) isolat dalam agar Mueller-Hinton berisi biakan bakteri.¹² Senyawa standar pembanding/kontrol positif digunakan chloramphenicol. Uji antibakteri isolat dilakukan dengan dua konsentrasi, yaitu 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g}/\text{disc}$.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi senyawa dari kayu batang *Garcinia tetranda* menghasilkan padatan murni berwarna oranye kecoklatan, dengan titik leleh 233-234 $^{\circ}\text{C}$. Data spektroskopi UV λ_{maks} (MeOH) 230, 292, 359 nm; λ_{maks} (MeOH+NaOH) 289, 327, 413 nm; λ_{maks} (MeOH+ AlCl_3) 229, 286, 436 nm; λ_{maks} (MeOH+ AlCl_3 +HCl) 232, 291, 364, 396 nm. Data spektroskopi IR menunjukkan ν_{max} (KBr): 3526, 3119, 2903, 2826, 1621, 1601, 1516, 1460, 1427, 1370, 1304, 1260, 1186, 1015, 837 cm^{-1} . Data ^1H , ^{13}C -NMR beserta senyawa pembandingnya (naringenin, aromadendrin dan morelloflavon) disajikan berturut-turut dalam Tabel 1 dan 2.

Identifikasi Struktur

Spektrum UV senyawa murni (isolat) dalam MeOH menunjukkan pola spektrum senyawa flavonoid, yaitu puncak di sekitar λ_{maks} 290 nm (pita II), serta puncak dengan intensitas absorpsi yang lemah pada 330-360 nm (pita I).¹³ Pergeseran batokromik yang terjadi setelah penambahan NaOH menandakan adanya senyawa fenolat, dan dalam spektrum UV senyawa flavonoid mengindikasikan adanya -OH pada posisi 7 atau 4'. Adanya pergeseran pita I setelah ditambahkan AlCl_3/HCl dalam pengukuran spektroskopi UV menandakan adanya sistem 3',4'-orto dihidroksi flavonoid.¹⁴ Serapan gugus fungsi dalam spektrum IR

isolat mendukung hipotesa analisa spektrum UV bahwa isolat merupakan suatu flavonoid.

Terdapat sedikitnya 21 proton dalam spektrum $^1\text{H-NMR}$ isolat (Tabel 1). Kelaziman dalam satu molekul flavonoid terdiri dari sedikitnya 12 proton sedangkan jumlah sehingga memunculkan hipotesa bahwa isolat terdiri atas dua kerangka flavonoid. Disamping itu jumlah atom karbon dalam spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ isolat sebanyak 31 karbon lebih sesuai untuk senyawa biflavonoid (kelaziman satu molekul flavonoid terdiri dari 15 atom karbon). Adanya sinyal dari 2 proton alifatik trans dengan tetapan kopling 12 Hz yang khas untuk H-2 dan H-3 flavanon menandakan bahwa salah satu struktur flavonoid isolat adalah suatu flavanon dan struktur lainnya adalah flavon yang dicirikan dari adanya satu proton Csp^2 singlet H-3 flavon¹⁵ pada δH 6,31. Untuk membuktikan hipotesa tersebut, digunakan data perbandingan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dengan data spektrum senyawa yang sudah pernah ditemukan, yaitu naringenin (flavanon) dan luteolin (flavon) (Tabel 1).

Data spektrum isolat menunjukkan kemiripan data spektrum NMR dengan morelloflavon, perbedaan terletak pada pergeseran karbon pada posisi C-2''' isolat lebih downfield, yang memperkuat hipotesa bahwa gugus metoksi tersubstitusi pada posisi C-2''' struktur morelloflavon, atau pada posisi C-2' struktur luteolin penyusunnya. Senyawa ini merupakan senyawa biflavonoid baru karena belum pernah dilaporkan sebelumnya. Sesuai aturan IUPAC, isolat dinamakan 5,7,4',5'',7'',3''',4'''-heptahidroksi-2'''-metoksi flavanon-[3,8'']-flavon.

Jalur Pembentukan 5, 7, 4', 5'', 7'', 3''', 4'''-heptahidroksi-2'''-metoksi flavanon-[3,8'']-flavon

Penemuan senyawa biflavonoid dalam *Garcinia tetranda* merupakan sesuatu yang baru, karena dari laporan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh kelompok aktivitas kimiawi tumbuhan ITS terhadap *Garcinia tetranda* seluruhnya ditemukan senyawa santon. Namun fenomena ini juga terjadi dalam *Garcinia densivenia*, yaitu selain ditemukan santon juga ditemukan senyawa biflavonoid.⁴ Hal ini juga membuktikan bahwa spesies *Garcinia tetranda* memiliki tingkat rekayasa molekul yang tinggi dan sesuai dengan teori kekerabatan molekul bahwa dalam satu genus dan famili yang sama akan ditemukan senyawa dengan pola yang sama pula. Dengan demikian penemuan santon dan biflavonoid merupakan hal yang wajar terjadi dalam *Garcinia* dan dapat dijelaskan melalui saran jalur pembentukan Gambar 1.

Prekursor calkon terbentuk dari senyawa santon maupun flavonoid (Gambar 1). Kerangka dasar flavonoid adalah flavon (luteolin) yang terbentuk dari 3 unit asetat yang tergabung kepala ke ekor membentuk cincin A dan suatu *p*-kumaril yang mengalami kondensasi dengan 3 unit malonil koA (asetil-koA) yang membentuk cincin C dan B. Pelepasan satu molekul H_2O mengakibatkan terbentuknya flavanon (naringenin). Kopling karbon-karbon antara naringenin dan luteolin membentuk senyawa morelloflavon yang selanjutnya mengalami oksidasi membentuk isolat.

Tabel 1. Perbandingan δ H spektrum 1 H-NMR isolat terhadap spektrum Naringenin dan Luteolin

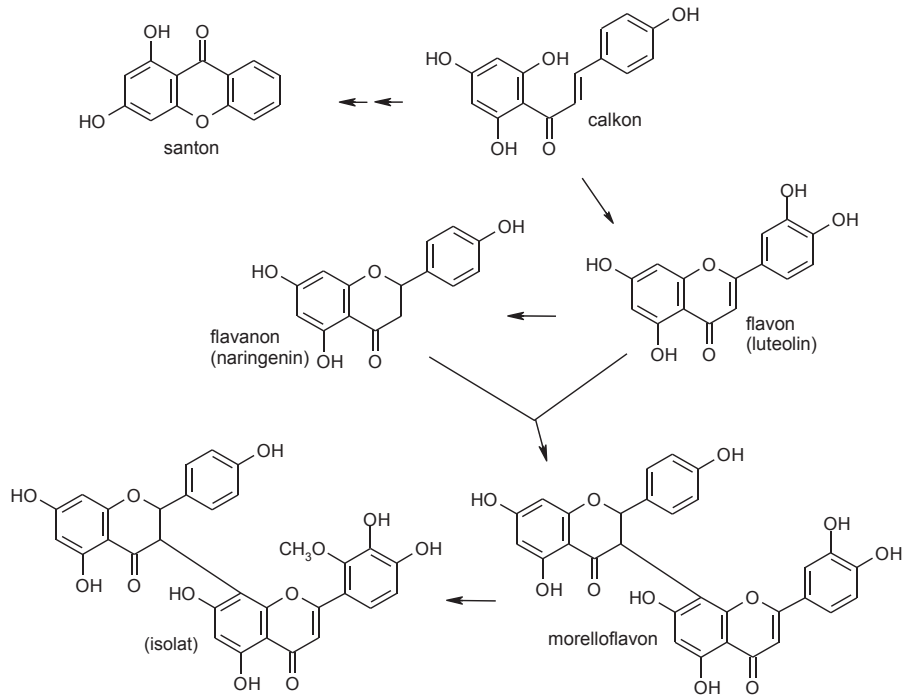
Posisi C	Naringenin	Luteolin	Isolat
2	5,45 (1H,dd, $J=12$ & 4 Hz)		5,85 (1H,d, $J=12$ Hz)
3	3,25 (1H,dd, $J=17$ & 12 Hz)		4,98 (1H,d, $J=12$ Hz)
3	2,65 (1H,dd, $J=17$ & 4 Hz)		-
5	12,18 (1H,s,OH)		13,15 (1H,s,OH)
6	5,93 (2H,s)		6,02 (2H,s)
7	-		-
8	5,93 (2H,s)		6,02 (2H,s)
2'	7,33 (2H,d, $J=9$ Hz)		7,23 (2H,d, $J=8$ Hz)
3'	6,80 (2H,d, $J=9$ Hz)		6,52 (2H,d, $J=8$ Hz)
4'	-		-
5'	6,80 (2H,d, $J=9$ Hz)		6,52 (2H,d, $J=8$ Hz)
6'	7,33 (2H,d, $J=9$ Hz)		7,23 (2H,d, $J=8$ Hz)
2		-	-
3		6,54 (1H,s)	6,47 (1H,s)
5		12,91 (1H,s,OH)	12,33 (1H,s,OH)
6		6,36 (1H,d, $J=2$ Hz)	6,31 (1H,s)
7		-	-
8		6,68 (1H,d, $J=2$ Hz)	-
2'		7,35 (br.s)	3,31 (3H,s,OCH3)
3'		-	-
4'		-	-
5'		6,88 (1H,d, $J=8$ Hz)	7,01 (1H,d, $J=8$ Hz)
6'		7,34 (1H,d, $J=8$ Hz)	7,21 (1H,d, $J=8$ Hz)

Sumber : Waterman, P., dkk., (1980)⁴; Grande, M., dkk., (1985)¹⁶; Rinaldo, D., dkk., (2007)¹⁷

Tabel 2. Perbandingan C spektrum ¹³C-NMR isolat terhadap spektrum naringenin, luteolin dan morelloflavon

Posisi C	Naringenin	Luteolin	Isolat	Posisi C	Morelloflavon
2	78,41		82,37	2	82,3
3	41,95		48,96	3	50,1
4	196,83		197,27	4	197,2
4a	101,75		103,79	4a	101,6
5	163,47		158,42	5	158,4
6	95,79		97,14	6	97,2
7	166,62		162,58	7	158,4
8	94,95		96,04	8	96,1
8a	162,91		164,36	8a	162,4
1'	128,83		130,17	1'	129,8
2'	128,30		129,37	2'	129,8
3'	115,15		115,49	3'	115,5
4'	157,51		156,72	4'	150,23
5'	115,15		115,49	5'	115,15
6'	128,30		129,37	6'	129,8
2			164,40	2"	164,2
3			101,62	3"	103,8
4		164,4	183,15	4"	183,1
4a		103,0	103,41	4b	103
5		181,7	162,60	5"	164,9
6		105,4	99,59	6"	99,6
7		161,2	165,65	7"	165,6
8		99,1	104,50	8"	103,9
8a		162,4	167,20	8b	165,8
1'		94,4	120,58	1'''	120,7
2'		156,9	146,38	2'''	114,2
3'		121,6	152,10	3'''	146,3
4'		113,4	150,23	4'''	150
5'		149,3	116,71	5'''	116,5
6'		145,0	123,45	6'''	123,5
OMe		115,9	50,05	OMe	-
		119,1			

Sumber : Waterman, P. , dkk., (1980)⁴; Ito, C., dkk, (1999)¹⁸, Rinaldo, D., dkk, (2007)¹⁷



Gambar 1. Saran jalur pembentukan senyawa (isolat) dari kayu batang *Garcinia tetrandia*



Gambar 2. Uji in-vitro antibakteri GB-1 terhadap *Salmonella typhi*, dengan standar Chloramphenicol (K)

Uji Bioaktivitas Antibakteri

Uji bioaktivitas isolat dari kayu batang *Garcinia tetranda* sebagai anti - bakteri dilakukan untuk menambah keragaman informasi tentang aktivitas senyawa yang terkandung dalam *Garcinia tetranda*. Uji dilakukan secara in vitro dengan menggunakan bakteri gram-negatif *Salmonella typhi* 261 lokal terstandarisasi API 20E. Aktivitas antibakteri diidentifikasi melalui pengukuran diameter zona terang yang terbentuk di sekitar sumur senyawa hasil isolasi (Gambar 2) dan dibandingkan dengan diameter zona terang chloramphenicol 30 µg (C30). Diameter zona terang ≤ 12 mm berarti resisten, 13-17 mm berarti memiliki aktivitas menengah, sedangkan ≥ 18 mm berarti sangat aktif/potensial.¹² Tidak munculnya zona terang di sekitar sumur isolat pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa isolat tidak potensial sebagai antibakteri dibandingkan chloramphenicol 30 µg. Zona terang muncul di sekitar sumur chloramphenicol pada konsentrasi 31,25 dan 15,625 µg/disc dengan diameter berturut-turut 34,30 dan 33,80 mm.

Biflavonoid lain, yaitu GB-1 yang pernah ditemukan dalam *Garcinia kola* dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri gram-positif *Staphylococcus aureus*.¹⁹ Hal ini dapat disebabkan karena struktur membran bakteri gram-negatif lebih kuat dibanding gram-positif sehingga bakteri gram-negatif memiliki pertahanan diri yang lebih kuat dibandingkan bakteri gram-positif. Aktivitas senyawa juga dipengaruhi oleh gugus fungsi. Potensi antibakteri chloramphenicol antara lain disebabkan oleh peranan gugus propanol dalam strukturnya, yang merupakan sisi-aktif (*active-site*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa ahli membuktikan bahwa perubahan pada

bagian propanol chloramphenicol menyebabkan hilangnya aktivitas antibakteri.²⁰

Kesimpulan

Isolasi terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak metanol kayu batang *Garcinia tetranda*, didapatkan senyawa biflavonoid baru 5,7,4',5'',7'',3''',4''''-heptahidroksi-2''''-metoksi flavanon-[3,8'''']-flavon yang belum pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya. Penemuan biflavonoid baru menambah informasi keragaman senyawa dalam *Garcinia tetranda* dan juga membuktikan bahwa *Garcinia tetranda* memiliki kemampuan yang tinggi dalam rekayasa molekul. Uji antibakteri isolat terhadap bakteri Gram negatif *Salmonella typhi* menunjukkan bahwa 5,7,4',5'',7'',3''',4''''-heptahidroksi-2''''-metoksi flavanon-[3,8''''] flavon tersebut tidak potensial sebagai antibakteri Gram-negatif *Salmonella typhi*.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada DIKNAS sebagai pemberi beasiswa, staf Taman Nasional Meru Betiri Jember untuk pengambilan sampel, LIPI-Serpong dan Laboratorium Kimia Universitas Surabaya untuk pengujian Spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR serta TDC Universitas Airlangga.

Daftar Rujukan

1. Arifin, A.S. Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam. Jakarta: Karunika Universitas Terbuka 1986
2. Balai Taman Nasional Meru Betiri. *Laporan Identifikasi dan Inventarisasi Taman Obat di Taman Nasional Meru Betiri*. Jember: Departemen Kehutanan Dirjen Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam Taman Nasional Meru Betiri 2002
3. Ersam, T. *Senyawa kimia mikromolekul beberapa tumbuhan Artocarpus hutan tropika Sumatra Barat*. Disertasi. Bandung: ITB. 2001
4. Waterman, P.G., E.G Crichton. Xanthonenes and biflavonoids from *Garcinia densivenia* stem bark. *Phytochemistry*, 1980;19: 2723-26.
5. Hay A.E., J.J. Helesbeux, O. Duval, M. Labaied, P. Grellier, P. Richomme. 2004. Antimalarial

- xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences*, 2004;75: 3077–85.
6. Peres V., T.J. Nagem. Trioxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry*, 1996;44(2): 191-214.
 7. Astuti, S.Y.E. 2005. *Dua diprenilsanton pada kulit akar wadung (Garcinia tetrandia, Pierre)*. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas MIPA. Surabaya: ITS. 2005
 8. Suksamrarn, S., N.Suwannapoch, W.Phakhodee, J.Thanuhiranlert, P. Ratananukul, N.Chimnoi, A.Suksamrarn. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull*, 2003;51(7): 857–59.
 9. Purwaningsih, Y. *Dua Senyawa Santon Sebagai Antioksidan dari Kayu Batang Garcinia tetrandia Pierre*. Tesis, Magister Kimia. Surabaya: ITS.2006
 10. Department of Vaccines and Biologicals-Communicable Disease Surveillance and Response. *Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever*. Geneva: World Health Organization.2003.
 11. Nurhayati, Y. *Asuhan Keperawatan pada An. D dengan Demam Typhoid di Bangsal Melati RSU dr. Moewardi Surakarta*. Karya Tulis Ilmiah, Jurusan Keperawatan Fakultas Ilmu Kesehatan. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.2009.
 12. Vandepitte, J., K. Engbaek., P.Piot, C.C. Heuck. 1991. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*.Geneva:World Health Organization.
 13. Ilic, S.B., S.S.Konstantinovic, Z.B. Todorovic. . Flavonoids from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics, Chemistry and Technology*, 2004;3(1): 67-71.
 14. He, K., B.N.Timmermann, A.J.Ala- desanmi, L.Zeng. A biflavonoid from *Dysoxylum lenticellare* Gillespie. *Phytochemistry*,1996; 42(4): 1199-201.
 15. Tih, A.E., R.T.Ghogomu, B.L.Son- dengam, C. Caux, B.Bodo. Minor Biflavonoids from *Lophira alata* Leaves. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*.2006.
 16. Grande, M., F. Piera, A.Cuenca, P.Torres, I.S. Bellido. Flavonoids from *Inula viscosa*. *Planta Medica*,1985; 51: 414-419.
 17. Rinaldo, D., C.M.Rodrigues, J.Rodri- gues, M.Sannomiya, L.C. dos Santos, W. Vilegas. *New flavone from the leaves of Neea theifera (Nyctaginaceae)*. *J.Braz.Chem.Soc.*, 2007;18(6): 1132-35.
 18. Ito, C., M.Itoigawa, Y.Miyamoto, K.S.Rao, J.Takayasu, Y.Okuda, T.Mukainaka, H.Tokuda, H.Nishino, H.Furukawa. 1999. A New Biflavonoid from *Calophyllum panicflorum* with Antitumor-Promoting Activity. *J.Nat.Prod.*,1999; 62(12): 1668-1671.
 19. Han, Q.B., S.F.Lee, C.F.Qiao, Z.D.He, J.Z.Song, H.D.Sun, H.X.Xu. 2005. *Complete NMR Assignments of The aAntibacterial Biflavonoid GB-1 from Garcinia kola*. *Chem. Pharm. Bull.*,2005; 53(8): 1034-1036.
 20. Jardetzky O. Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963;238(7): 2498-508.