

Potensi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Kulit Batang *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* (paliasa) Sebagai Anti-Tuberkulosis

Usman

Staf Pengajar Prodi Kimia FKIP Universitas Mulawarman,

Abstrak

Melochia umbellata (Houtt) Stapf var. *Degrabrata* merupakan jenis tumbuhan yang banyak ditemukan di hutan tropis Indonesia. Di daerah Sulawesi selatan tumbuhan ini dikenal dengan nama paliasa dan sejak lama digunakan oleh masyarakat setempat sebagai bahan obat tradisional. Tujuan penelitian ini adalah menentukan senyawa golongan metabolit sekunder menentukan potensi anti-TB ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* mengandung senyawa golongan metabolit sekunder seperti: alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid dan fenolik. Hasil uji biaoaktivitas menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang *M. umbellata* berpotensi sebagai anti-TB dengan memperlihatkan daya hambat terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* galur H37Rv. pada konsentrasi 100 ppm dan 200 ppm.

Kata kunci : Potensi anti-tuberkulosis, ekstrak metanol dan tumbuhan *M. umbellata* (paliasa)

1. Pendahuluan

Sterculiaceae merupakan tumbuhan tropis yang terdiri dari 70 Genus dan 1500 spesies. Sebagian besar spesies dari famili tumbuhan tersebut berupa pohon dan semak belukar [1]. Kelompok tumbuhan ini banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bahan pangan, papan dan bahan obat tradisional. Sebagai contoh *Kleinhovia hospita* Lin sejak dahulu digunakan sebagai obat tradisional di beberapa negara antara lain China, Malaysia, Papua Nugini dan Indonesia untuk mengobati penyakit hepatitis, kudis, tetter dan pruritus [2]. *Sterculia setigara* Del (*Melochia tomentosa*) dan *Sterculia tragacantha* Lindl adalah dua spesies dari famili Sterculiaceae yang paling banyak digunakan sebagai obat tradisional di Afrika bagian barat untuk mengobati penyakit disentri, bisul, sifilis, epilepsi, dan malaria [3]. Serbuk kering dari daun

tanaman *S. setigara* biasanya digunakan oleh para tabib di negara bagian Bauchi (Nigeria) untuk pengobatan tuberkulosis (batuk kronik dengan noda darah) dan HIV / AIDS [4].

Paliasa merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili Sterculiaceae. Tumbuhan ini terdiri dari tiga jenis tumbuhan yang berbeda yaitu *Kleinhovia hospita* Linn dari genus *Kleinhovia*, sedangkan *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* dan *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *visenia* yang keduanya dari genus *Melochia*. Tumbuhan paliasa ini banyak dimanfaatkan di daerah Sulawesi Selatan sebagai obat tradisional untuk pengobatan; penyakit liver, hipertensi, diabetes, kolesterol dan hepatitis [6]. Daun dan kulit batang *K.hospita* digunakan sebagai obat batuk, kemudian kandungan senyawa sianogenik diasumsikan untuk membunuh ektoparasit seperti kutu. Ekstrak daun

menunjukkan aktivitas antitumor yang melawan sarkoma pada tikus. Ekstrak metanol ketiga jenis daun tumbuhan tersebut dapat memperbaiki fungsi hati mencit yang diinduksi dengan kربونتetraklorida, namun *M.umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* paling efektif dalam memperbaiki fungsi hati [7]. Ketiga jenis ekstrak daun paliasa juga bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina*, dimana ekstrak daun tumbuhan *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* yang menunjukkan paling toksik diantara ekstrak daun paliasa jenis lainnya [5].

Sejauh ini belum ada data penelitian yang mengeksplorasi senyawa bioaktif dari tumbuhan paliasa sebagai bahan baku obat untuk penyakit tuberkulosis terutama dari spesies *M. umbellata* (Houtt) Stapf var *degrabrata*. Beberapa hasil penelitian mengenai sifat toksisitas dan sifat bioaktif lainnya yang telah dilaporkan dari tumbuhan paliasa yaitu; hasil skrining toksisitas ekstrak metanol pada jaringan kulit akar, kayu akar, kulit batang, kayu batang dan daun *M. umbellata*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua bagian jaringan tumbuhan tersebut bersifat toksik terhadap *Artemia salina* namun yang paling toksik adalah bagian jaringan kayu batang dan kulit batang dengan nilai LC_{50} 1,80 $\mu\text{g/mL}$ dan 30,27 $\mu\text{g/mL}$ [8].

Senyawa stigmasterol (5,22-stigmastadien-3 β -ol) telah diisolasi dari ekstrak heksan kayu akar *M.umbellata*, dimana senyawa tersebut memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 200 ppm serta memiliki efek daya hambat terhadap pertumbuhan *Aspergillus niger* pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ [9]. Pada tumbuhan yang sama telah berhasil diisolasi senyawa stigmasterol terglisosidasi dari kayu akar *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* yang bersifat sebagai antijamur. Kemudian pada bagian jaringan kayu

batang dari *M. umbellata* telah berhasil diisolasi senyawa; β -sitosterol, 6,6'-dimetoksi-4,4'-dihidroksi-3,2'-furanoisoflavan dan 7,8-epoksi-melochinon. Senyawa 7,8-epoksi-melochinon sangat aktif terhadap sel murin leukemia P-388 dengan $IC_{50} = 0,23 \mu\text{g/mL}$ [10].

Senyawa bioaktif yang telah dilaporkan dari tumbuhan famili Sterculiaceae yaitu ekstrak metanol kasar dari daun *S. setigera* (*M. tomentosa*) memperlihatkan aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada konsentrasi hambat minimum (MIC) 2500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ [11]. Ekstrak kulit batang *Sterculia setigera* berpotensi sebagai antibakteri terutama bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan juga sebagai anti jamur terhadap jamur *Aspergillus niger* dan *Candida albicans* [12]. Ekstrak metanol dari kulit akar tumbuhan *Cola nitida* dan *Cola milleni* mengandung senyawa yang bersifat antimikobakteria terhadap *Micobacterium bovis* dan *Micobacterium vaccae* [13]. Ekstrak metanol daun *Cola gigantea* memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* [14].

Dari hasil penelitian diketahui bahwa tumbuhan famili Sterculiaceae mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, fenolik, triterpenoid, steroid, kumarin, saponin, glikosida dan tanin [15]. Hasil skrining fitokimia, telah dilaporkan bahwa ekstrak metanol daun *C. gigantea* menunjukkan adanya alkaloid, saponin, tanin, antrakuinon, dan cardenolides [14]. Tumbuhan *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* mengandung minyak atsiri, triterpenoid, alkaloid dan flavonoid [16].

Berdasarkan hasil studi pustaka yang telah dilakukan, pemanfaatan sumber bahan bioaktif terutama sebagai bahan anti-tuberkulosis dari *M. umbellata* (paliasa) ini belum banyak dilakukan dan

dipublikasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai petunjuk untuk menemukan senyawa yang aktif sebagai anti-tuberkulosis dari tumbuhan *M. umbellata* (paliasa). Selanjutnya dapat dikembangkan dan dimanfaatkan oleh industri farmasi dalam negeri untuk memproduksi obat anti-tuberkulosis.

2. Metode Penelitian

a. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium, evaporator, plat tetes, neraca analitik, penyaring Buchner, kertas saring Whatman No. 42 dan botol skrup.

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* yang diperoleh dari kota Makassar Sulawesi Selatan. Identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI Bogor. Bakteri *Mikobakterium tuberculosis*, medium pengujian adalah Lowenstein Jensen (LJ). Sedang bahan kimia yang digunakan metanol, gliserol, Rifamfisn, peraksi Meyer, Wagner, Dragendorff, Pereaksi Liberman-Burchard, HCl, H₂SO₄, FeCl₃, SeSO₄ dan DMSO.

b. Ekstraksi dan Uji Fitokimia

Sebanyak 5,25 Kg serbuk halus kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* (Paliasa) dimaserasi dengan metanol selama 1 x 24 jam (sebanyak 3 kali). Ekstrak metanol disaring dan dikumpulkan kemudian dipisahkan pada tekanan rendah menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak metanol yang berwarna cokelat sebanyak 393, 58 gram. Ekstrak metanol tersebut diambil sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam botol vial untuk dilakukan uji fitokimia dan uji anti-

tuberkulosis. Uji fitokimia yang dilakukan adalah, uji alkaloid dengan pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorff; uji flavonoid dengan pereaksi (serbuk Mg dalam 0,2 ml HCl pekat), uji fenolik dengan pereaksi FeCl₃, uji triterpenoid dan steroid dengan pereaksi LB dan Salkowski serta Uji saponin dengan pereaksi busa. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

c. Uji Daya Hambat Terhadap *Mikobakterium tuberculosis*

1). Pembuatan Medium LJ (Lowenstein Jensen)

Serbuk LJ sebanyak 36,5 gram dilarutkan dalam aquades 600 ml kemudian ditambahkan 1000 mL kuning telur dan 12 mL gliserol, selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan. Larutan LJ yang telah homogen disterilkan pada temperatur 85 °C selama 45 menit dengan menggunakan oven. Selanjutnya medium pertumbuhan LJ diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sebelum digunakan untuk pengujian, medium tersebut disterilkan kembali pada suhu 85 °C selama 45 menit dan diinkubasi pada suhu 37 °C.

2). Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji *M tuberculosis* yang digunakan dalam penelitian berasal dari pasien rumah sakit Wahidin Sudirohusodo Tamalanrea Makassar dengan kode 484. Bakteri tersebut diremajakan terlebih dahulu dengan cara diinokulasikan dalam medium LJ (Lowenstein Jensen) sebanyak 5 tetes, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 minggu.

3). Uji Ekstrak Metanol Terhadap Bakteri *M. tuberculosis*

Uji daya hambat ekstrak metanol terhadap bakteri uji dilakukan dengan cara metode difusi yang menggunakan botol skrup. Sebanyak 5 botol medium LJ

yang telah steril disiapkan, botol yang pertama ditambahkan larutan DMSO 20 μ L (kontrol negatif), botol yang kedua hanya berisi medium LJ, botol yang ketiga dan keempat masing-masing ditambahkan ekstrak metanol dengan konsentrasi 100 ppm dan 200 ppm sebanyak 20 μ L, botol kelima ditambahkan rifampisin (obat TBC) sebanyak 20 μ L sebagai kontrol positif. Selanjutnya kelima botol skrup tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3

minggu. Hasil uji daya hambat ekstrak metanol terhadap bakteri *M. tuberculosis* dapat dilihat pada gambar 1.

3. Hasil dan Pembahasan

Secara kualitatif uji fitokimia ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* diketahui dari intensitas warna yang timbul setelah ditambahkan beberapa pereaksi uji fitokimia. Hasil uji fitokimia terlihat pada Tabel 1.

Table 1. Hasil uji fitokimia ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* (paliasa).

No	Uji Fitokimia	Perubahan warna dengan pereaksi	Ket.
1	Alkaloid		
	- Pereaksi Meyer	kuning – merah	+
	- Pereaksi Wagner	kuning – kuning kehijauan	-
	- Pereaksi Dragendorff	jingga – coklat kemerahan	+
2	Flavonoid		
	- Mg + HCl	bening – coklat merah	+
	- NaOH 10 %	bening – coklat merah	-
3	Triterpenoid	bening – merah kecoklatan	+
	Steroid	bening - ungu	+
4	Fenolik	jingga- hijau kuning	+
5	Saponin	bening - berbuih	+

Keterangan :

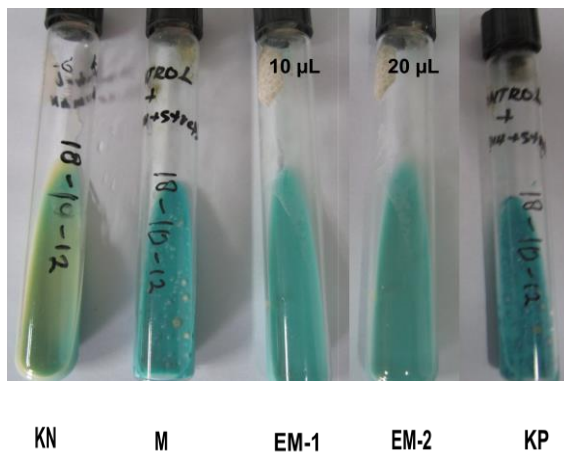
(+) = uji positif (ada)

(-) = uji negatif (tidak ada)

Berdasarkan uji fitokimia ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* diketahui mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, fenolik dan saponin. Dari hasil penelitian lain menunjukkan bahwa kandungan kimia ekstrak daun *M. umbellata* var. *degrabrata* mengandung minyak atsiri, triterpenoid, alkaloid dan flavonoid [16]. Selanjutnya hasil penelitian lain telah dilaporkan bahwa *Kleinhovia hospita* mengandung senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, flavonol, sianidin, kaemferol dan kuersitin [17], senyawa

golongan terpenoid [18] dan senyawa golongan fenolik [19].

Hasil uji bioaktivitas ekstrak metanol terhadap bakteri uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* memperlihatkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* pada konsentrasi 100 ppm dan 200 ppm. Hal ini dapat dijelaskan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak metanol secara kualitatif maupun kuantitatif berperan penting atas membran sel dari bakteri jenis gram negatif dan gram positif [20].



Keterangan :

- KN = Kontrol Negatif (DMSO)
- M = Medium
- EM-1 = Ekstrak Metanol 100 ppm
- EM-2 = Ekstrak Metanol 200 ppm
- KP = Kontrol Positif (rifampisin)

Gambar 1. Daya hambat ekstrak metanol dari kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* (paliasa) terhadap Mikobakterium tuberkulosis

Pengaruh antibiotik dalam ekstrak tanaman terhadap pertumbuhan bakteri mungkin disebabkan oleh faktor berikut diantaranya adalah mekanisme reaksi, struktur kimia atau aktivitas spektrum [21]. Spektrum luas antibiotik dalam tanaman mempengaruhi pertumbuhan berbagai bakteri, baik bakteri jenis gram negatif dan gram positif dengan target dinding sel bakteri atau membran sel atau mengganggu enzim dalam proses sintesis protein pada bakteri [15].

Kandungan fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, saponin, dan beberapa senyawa aromatik lainnya merupakan senyawa metabolit sekunder tanaman yang berperan penting dalam mekanisme pertahanan mikroorganisme terhadap gangguan serangga dan herbivora lainnya [22]. Keberadaan senyawa golongan seperti fenol, tanin, saponin, dan steroid dalam ekstrak dapat bertindak sebagai antimikroba. Senyawa golongan tanin akan mengikat protein yang kaya prolin dan mengganggu proses sintesis protein. Sifat antimikroba dari fenolik antara lain; mendegradasi dinding sel, berinteraksi dengan komposisi dan mengganggu membran sitoplasma, merusak protein membran, merusak mekanisme enzimatik untuk produksi

energi dan metabolisme, serta mengubah serapan hara dan transpor elektron [23]. Sedang senyawa golongan steroid telah dilaporkan memiliki sifat antibakteri, karena steroid menyebabkan terjadinya kebocoran pada liposom [24].

4. Simpulan

- a. Ekstrak metanol kulit batang *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, fenolik dan saponin.
- b. Ekstrak metanol *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* memiliki efek daya hambat terhadap *M. tuberculosis* pada konsentrasi 100 ppm dan 200 ppm
- c. Ekstrak kulit batang *M. umbellata* berpotensi mengandung senyawa yang bersifat anti-tuberkulosis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih, kami sampaikan kepada Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pendidik Dokter Universitas Hasanuddin yang telah memberikan fasilitas untuk melakukan penelitian ini.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Botani, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi (LIPI) Bogor, yang telah mengidentifikasi spesimen tumbuhan ini

Referensi

- Mabberley, D.J., 1997, *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plant*, Second ed. Cambridge University Press, 1 – 874.
- Gan, Li-She, Ren, G., Mo, Jian-Xia, Zhang, Xiang-Yi, Yao, W., and Zhou Chang-Xin, 2009, Cycloartane Triterpenoids from *Kleinhovia hospital* Linn, *J. Nat. Prod.*, 72, 1102–1105.
- Igoli, J. O., Ogaji, O. G., Tor- Anyiin, T. A., Igoli, N.P. (2005). *Medicinal Practices among the Igede people of Nigeria Part II, African Journal of Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2, Ibrahim T. Babalola, Esther A. Adelakun, Yuehong Wang, Francis O. Shode Vol. 1 No. 3 2012 www.phytojournal.com Page | 26
- Babalola, I.T., Adelakun E.A., Wang Y, Shode, F.O., 2012, Anti-TB Activity of *Sterculia setigera* Del., Leaves (*Sterculiaceae*), *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Vol. 1 No. 3, Online Available at www.phytojournal.com.
- Tayeb, R., Alam, G., Wahyudin, E., 2007. Toksisitas Ekstrak Daun Paliasa Jenis *Kleinhovia hospita*, *Melochia umbellata* var. *Degrabrata* dan *M. umbellata* var. *Visenia* Terhadap Larva *A. salina* Leach. *Majalah Obat Tradisional*.
- Raflizar., Adimunca., dan Tuminah, S. 2006. Dekok Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn) Sebagai Obat Radang Hati Akut. *Cermin Dunia Kedokteran*. 50, 10-14.
- Lalo, A., 2003. Perbandingan Efek Ekstrak Metanol Berbagai Jenis Daun Paliasa Terhadap Fyngsi Hati Mencit Jantan, *Skripsi*, Jurusan Farmasi FMIPA Unhas Makassar.
- Erwin, Noor, A., Soekamto, N.H., Harlim T. 2009, Skrining Bioaktivitas Beberapa Bagian Jaringan Tumbuhan Paliasa, *Melochia umbellata* (Houtt). Stapf var. *Degrabrata*. *J. Indonesian Chemica Acta*, Vol. 2, No. 1, Juni 2009.
- Ridhay, A., Noor, A., Soekamto, N.H., dan Harlim, T., 2011. Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Steroid dari Kayu Akar *M. umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* K. *Jurnal Kesehatan Bung*, 1(4): 43 – 46, Desember 2011
- Erwin, Noor, A., Soekamto, N.H., Harlim T. 2010, Penentuan Struktur Molekul Isolat Kayu Batang *Melochia umbellata* (Houtt). Stapf var. *Degrabrata* K (Paliasa) dan Uji Sel Murin Leukimia P-388. *Disertasi, tidak diterbitkan, Program Studi Kimia PPS UNHAS*, Makassar.
- Mann A, Amupitan J.O, Oyewale A.O, Okogun J.I , Ibrahim K, Oladosu P, Lawson I, Olajide I and Nnamdi A (2008). Evaluation of *in vitro* antimycobacterial activity of Nigerian plants used for treatment of respiratory diseases *African Journal of Biotechnology* 7 (11):1630-1636.
- Almagboul, A.Z., Bashiru, A.K., Farouk, A., Salih, A.K. (1988). Antimicrobial Activity of Certain Sudanese Plants Used in Folklorik Medicine: Screening for Antibacterial Activity (1V). *J. Fitoterapia*, Vol. 56 (6) pp.331-337
- Adeniyi, B.A., Groves, M.J., and Gangadharam, P.R., (2004). In Vitro Antimycobacterial Activities of Three Species of Cola Plant extracts (*Sterculiaceae*), *Phytother Res*, 18: 414 – 418.
- Sonibare M. A, Soladoye M.O, Esan O.O, and Sonibare O.O, 2009, “Phytochemical and antimicrobial studies of four species of Cola Schott & Endl. (*Sterculiaceae*),” *African*

- Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 6, no. 4, pp. 518–525.
15. Sowmya G.S., Vinayachandra, Syed Hidayathulla and K.R. Chandrashekar. 2011. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Pterospermum reticulatum* Wight and Arn, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 3,5,2011
 16. Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Yayasan sarana Warna Jaya, Jakarta.
 17. Watson, L., Dalwit, M.J. 1992. The Families of Flowering Plants Sterculiaceae Vent. (online) (<http://www.Sterculiaceae.html>) diakses 20 Maret 2010.
 18. Soekamto, N.H., Noor, A., Dini, I., Rudiansyah and Merry, G. 2008. Coumarin and Steroid Compound from Stem Bark of *Kleinhovia hospita* Linn. *Proceeding on the International Seminar on Chemistry 2008, The Role of Chemistry in The Utilization of Natural Resources*, Bandung 30 – 31 October.
 19. Noor, A., Kumanireng, A.S., 2004. Isolasi dan Identifikasi Konstituen Organik Tanaman Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn) pada Kelarutan Berdasarkan Kelompok Polaritasnya. *TPSDP BATCH II Unhas* Makassar.
 20. Hanaa FM Ali, Hossam S, El-beltagi and Nasr F Nasr. 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry* 10(8):2689-2699.
 21. Calderon C.B, Sabundayo B.P., 2007. Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs. In Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. *CRC Press*. Taylor & Francis group. ISBN 978-0-8247-4100-6.
 22. Bonjar GHS, Nik AK, Aghighi S. 2004. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. *J Biol Sci.*; 4: 405-412.
 23. Shimada T. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *J. Chem. Ecol.* 2006; 32: 1149-1163.
 24. Raquel F. Epan, 2007. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds. *Biochimica et Biophysica Acta.*; 2500–2509.