

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF DAUN *NERIUM INDICUM* MILL.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUND ISOLATED FROM THE LEAVES OF *NERIUM INDICUM* MILL.

Mae Sri Hartati W.^{*}, Subagus Wahyuono^{**}, Wayan T. Artama^{***}

^{*} Bag. Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran; ^{**} Bag. Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi; ^{***} Lab. Biokimia, PAU, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Nerium indicum Mill. (fam. Apocynaceae) merupakan salah satu *Nerium* sp. yang tumbuh di Indonesia sebagai tanaman hias. Secara tradisional, *Nerium* sp. digunakan sebagai antikanker, pengusir serangga, diuretika, antiskabies, antiinfeksi, insektisida dan kardiotonika, tetapi senyawa bioaktif yang bertanggung jawab untuk aktivitas tersebut belum seluruhnya diteliti. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah melakukan isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif dari daun *N. indicum*.

Senyawa bioaktif [t_l = 246-248^o C; LC-50 = 1,36 µg/ml pada BST (*Brine Shrimp Lethality test*)] dari daun *N. indicum* berhasil diisolasi dengan metoda ekstraksi, dan fraksinasi yang dimonitor dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan uji BST.

Identifikasi senyawa bioaktif dilakukan secara spektroskopi (uv, ir, ms dan 2D-nmr). Berdasarkan atas data spektra dan perbandingan dengan senyawa pembanding, maka senyawa bioaktif diidentifikasi sebagai oleandrin atau 16β-asetoksi-3β-oleandrosa-14β-hidroksi-5β-kard-20 (22)-enolida.

Kata kunci : *Nerium indicum*, senyawa bioaktif, BST, oleandrin

ABSTRACT

Nerium indicum Mill. (fam. Apocynaceae) is one of *Nerium* sp. that grows in Indonesia as ornamental. Traditionally, *Nerium* sp. is utilized as anticancer, insect repellant, diuretics, antiskabies, antiinfection, insecticide, and cardiotoxic; however, its bioactive substances responsible for these activities have not yet been fully determined. Therefore, this work was aimed to isolate and identify the most potential bioactive substances present in the leaves of *N. indicum*.

The bioactive compound [mp = 246-248^o C; LC-50 = 1.36 µg/ml on BST (*Brine Shrimp Lethality test*)] was successfully isolated from the leaves using bioactive (BST) guided solvent extraction and partition.

Identification was done spectroscopically methods (uv, ir, ms and 2D-nmr) and by comparison with authentic reference data. The bioactive compound obtained was identified as oleandrin or 16β-acetoxy-3β-oleandrose-5β-card-20(22)-enolide.

Key words: *Nerium indicum*, bioactive compound, BST, oleandrin

PENDAHULUAN

Nerium indicum Mill. (fam. Apocynaceae) atau sering disebut *Nerium odorum* Soland. adalah tanaman yang *indigenous* di India yang kemudian tersebar diseluruh Asia termasuk Indonesia, merupakan

tanaman hias yang ditanam di halaman rumah dan sering ditanam dipinggir jalan, laporan penelitian untuk *N. oleander* antara lain sebagai diuretika, antiskabies, (Widjajakusuma, 1993).

Berdasarkan atas data pustaka, penelitian terhadap daun *N. indicum* belum dilakukan, tetapi telah banyak penelitian dilakukan terhadap species yang lain misalnya *Nerium oleander* yang tumbuh di daratan Eropa. Mempunyai kasiat antijamur, ekspektoran, insektisida, antiinflamasi, antivirus dan kardiotonik (Perry, 1980; Siddiqui *et al.* 1997). Zia *et al.* (1995), dan melaporkan bahwa tanaman ini dapat digunakan sebagai analgetika dan depresan susunan syaraf pusat, kemudian secara spesifik disebutkan bahwa tanaman ini diperkirakan dapat untuk pengobatan pada leukemia (Hartwell, 1982; Boiso *et al.*, 1993).

Keberadaan beberapa senyawa di dalam *N. oleander* telah dilaporkan antara lain triterpen 12, 13-dihidrourolat (Siddiqui *et al.*, 1989), nerizosida, 16-dehidroadinerigenin (Siddiqui *et al.*, 1997), oleanderol, asam oleanderolat, kanerin, neriumin, kanerodion, (Begum *et al.*, 1997) dan neridiginosida (Begum *et al.*, 1999).

Brine Shrimp Lethality test (BST) adalah salah satu metoda *bioassay* yang digunakan untuk memonitor dalam melakukan ekstraksi, partisi, fraksinasi dan isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam (Troter II *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin dan Ferrigni, 1983; Gu *et al.*, 1995). Penelitian pendahuluan dengan uji BST terhadap beberapa tanaman telah dilakukan oleh Subagus dan Mae (1998), hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform daun *N. indicum* sangat potensial sebagai sumber senyawa bioaktif. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa bioaktif dari daun *N. indicum* dan menentukan LC-50 pada BST.

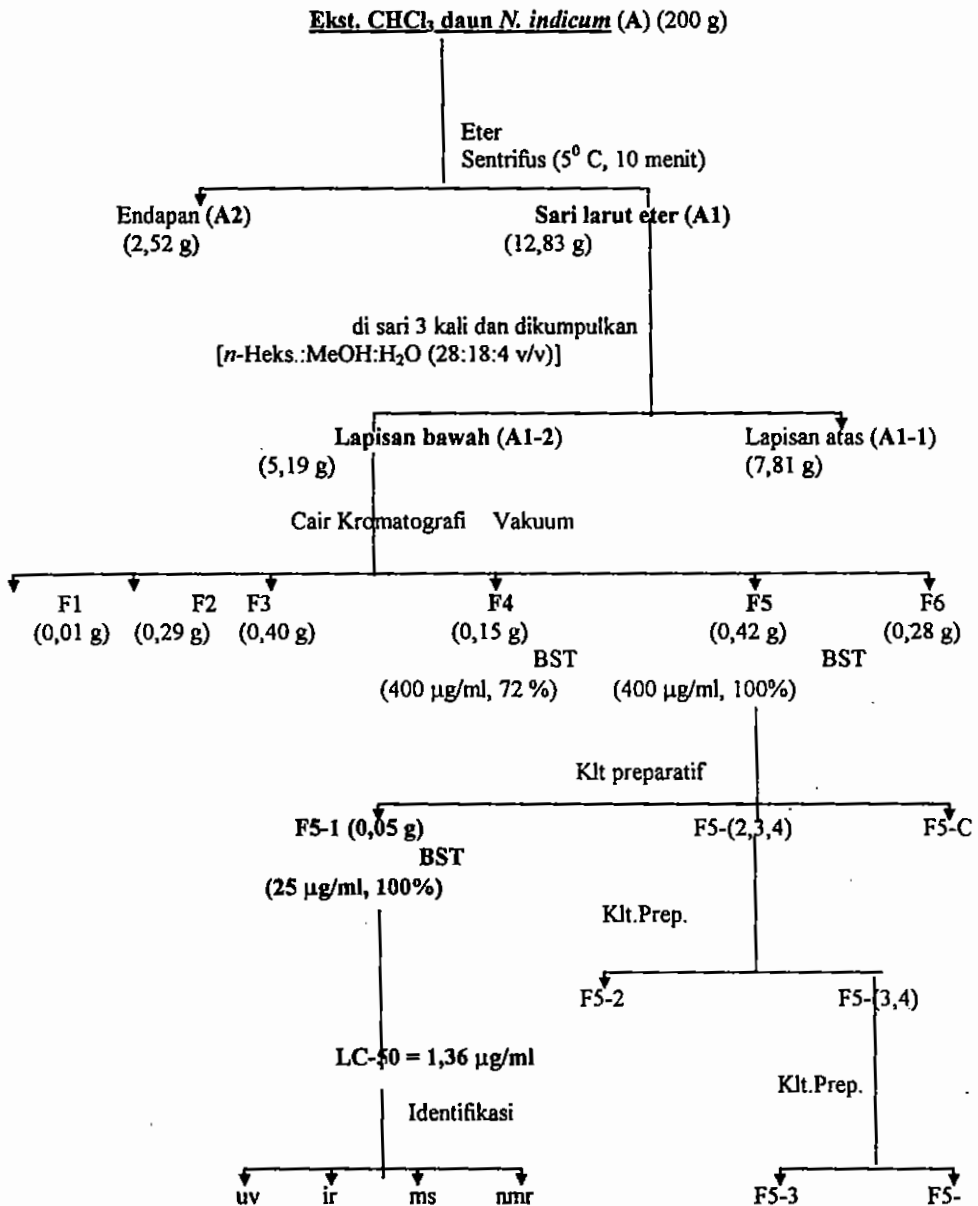
METODOLOGI

Bahan : Ekstrak kloroform daun *N. indicum* yang bahannya diambil dari kampung Ambarukmo, Yogyakarta, pada tanggal 25 September 1998 dan tumbuhan dideterminasi di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pelarut organik yang digunakan adalah berderajat teknik yang didestilasi ulang. Kromatografi lapis tipis dengan SiO₂ GF-254 (E Merck). Telur *Artemia salina* Leach (*Premium Extra Brine Shrimp Eggs*, HS no. 0511.99.600, Seagull International, The Great Salt Lake, USA). Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*, Lessafre 290703 Marc, France), Air laut Buatan (ALB).

Alat : Spektrofotometer ultraviolet (Shimadzu UV-365), Spektrofotometer inframerah (Perkin Elmer Spectrum 1000), Spektrom massa resolusi tinggi (*hrms = high resolution mass spectrum*) diperoleh dengan pengion *Electron Impact* yang dicatat pada Varian MAT 311, kemudian spektrum nuklir magnetik resonansi (nmr) di ambil dengan Bruker HX 500, dengan TMS sebagai standar internal. Spektrum massa dan nmr dilakukan di University of Mississippi, MS 38677, USA].

Jalan penelitian : Secara skematis, jalan penelitian dapat dilihat di Gambar 1. Serbuk daun *N. indicum* (200 g) dimaserasi dengan CHCl₃ (600 ml), pada penyaringan dan penguapan pelarut diperoleh ekstrak CHCl₃ kering (14,50 g)(A). Ekstrak CHCl₃ kering disari dengan eter yang pemisahannya dilakukan dengan sentrifugasi (5^o C, selama 10 menit) diperoleh endapan (2,52 g)(A2) dan sari larut eter (12,83 g)(A1). Sari larut eter yang ternyata aktif dengan BST dilakukan *three funnels partition* [*n*-heksana:MeOH:H₂O (28:18:4 v/v)] sehingga diperoleh 2 lapisan [lapisan atas (7,81 g)(A1-1) dan lapisan bawah (5,19 g)(A1-2)]. Lapisan bawah yang ternyata aktif difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi vakum cair (kvc) diperoleh 24 fraksi yang kemudian berdasarkan atas pengamatan R_f dan kromatogram KLT digabung menjadi 6 fraksi (F1-F6). Uji BST (500 dan 200 µg/ml) terhadap 6 fraksi tersebut menunjukkan bahwa F5 paling aktif. Isolasi senyawa bioaktif dilakukan pada F-5 secara preparatif KLT [fasa diam SiO₂ GF-254, fasa gerak (CHCl₃:EtOAc = 5:3 v/v)] dikembangkan 2 kali, diperoleh senyawa murni F5-1, yang kemudian ditentukan strukturnya secara spektroskopi (uv, ir, ms dan nmr) dan ditentukan LC-50 nya. Dari F5 diperoleh juga senyawa murni F5-2, F5-3 dan F5-4, tetapi ketiga senyawa ini tidak aktif.

Uji bioaktivitas dilakukan dengan BST, menggunakan prosedur yang dikerjakan oleh Meyer *et al.*, (1982), McLaughlin dan Ferrigni (1983) yang sudah dimodifikasi.



Gambar 1. Skema pemisahan/isolasi senyawa bioaktif F5-1 dan hasil dalam (%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kloroform menunjukkan aktivitas lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanol daun *Nerium indicum* pada uji bioaktivitas dengan BST (*Brine Shrimp Lethality test*), karena ekstrak kloroform sampai dosis 500 µg/ml masih mampu membunuh 100% larva *Artemia salina* sedangkan ekstrak metanol pada dosis yang sama hanya mampu membunuh 54% larva *A. salina* (Subagus dan Mae, 1998). Oleh karena

itu ekstrak kloroform daun *N. indicum* dipilih untuk diteliti lebih lanjut tentang isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif yang terdapat didalamnya.

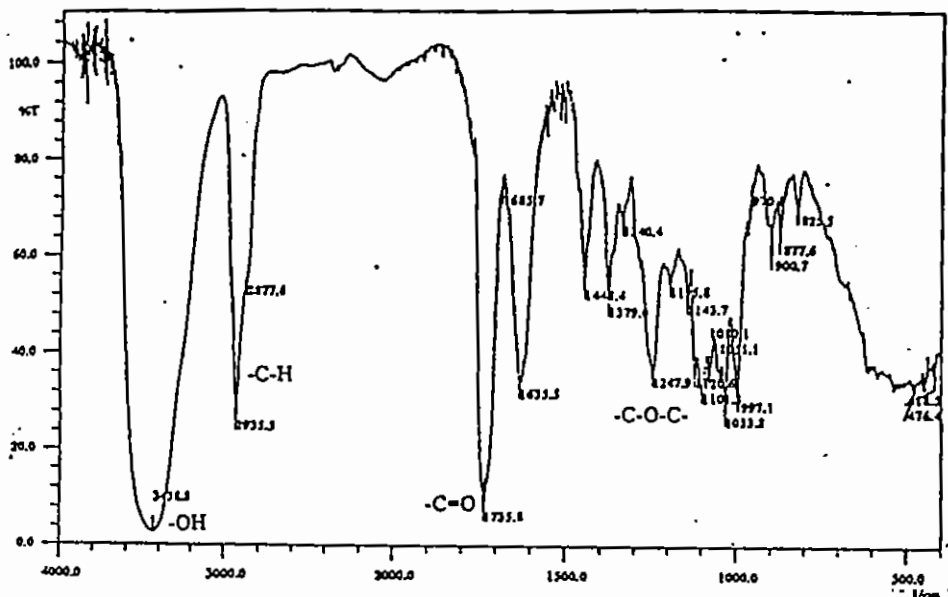
Gambar 1 menunjukkan alur isolasi senyawa bioaktif, yang dimonitor sesuai kromatogram dari KLT) dan BST utamanya pada dosis 500 µg/ml, kemudian melalui fraksinasi lebih lanjut, diperoleh fraksi-fraksi yang mempunyai kromatogram KLT yang lebih sederhana; dan diperoleh dosis uji untuk BST lebih kecil dibandingkan dosis uji dari fraksi sebelumnya. Hal ini disebabkan karena senyawa bioaktif lebih terkonsentrasi pada fraksi-fraksi tertentu. Tabel I menunjukkan bahwa penurunan dosis uji yang dilakukan terhadap fraksi-fraksi (F1-F6) menjadi 200 µg/ml, hanya F5 yang masih mampu menunjukkan aktivitas (100%) pada dosis tersebut. Berdasarkan atas KLT, F5 hanya berisi 4 buah senyawa [F5-1 (rf. 0,90); F5-2 (rf. 0,80); F5-3 (rf. 0,75) dan F5-4 (rf. 0,70); fasa diam: SiO₂ GF-254 fasa gerak: EtOAc 100%]. Kemudian dengan preparatif KLT, senyawa F5-1 dapat dipisahkan dari campuran F5-2, F5-3 dan F5-4.

Tabel I. Hasil uji bioaktivitas dengan BST (*Brine shrimp lethality test*)

Bahan uji	Dosis µg/ml	Kematian larva <i>A. salina</i> (%)
Ekstrak kloroform (A)	1500	100
	1000	100
	500	100
	200	100
Fraksi larut eter (A1)	500	100
Fraksi tidak larut eter (A2)	500	40
Fraksi lapisan atas (A1-1)	500	22
Fraksi lapisan bawah (A1-2)	500	100
Fraksi F1	500	86
Fraksi F2	500	86
Fraksi F3	500	82
Fraksi F4	500	100
Fraksi F5	400	72
	300	48
	200	42
	500	100
Fraksi F6	400	100
	300	100
	500	94
Senyawa F5-1	200	100
	100	100
	75	100
	50	100
	25	100
	10	98
	5	80
	3	58
	1	34
	0,5	26
0,25	12	
Senyawa F5-2	200	68
	100	64
Senyawa F5-3	200	62
	100	56
	10	12
Senyawa F5-4	200	98
Senyawa F5-C	100	66

Penurunan dosis uji untuk F5-1 menjadi 100, 75, 50, 25, 10, 5, 3, 1, 0,5 dan 0,25 µg/ml, memberikan hasil uji juga menurun (*dose dependent*). Harga LC-50 senyawa F5-1 dapat ditentukan dengan probit analisis yaitu 1,36 µg/ml. Senyawa F5-1 berbentuk kristal seperti jarum dengan titik lebur (tl) 246-248° C.

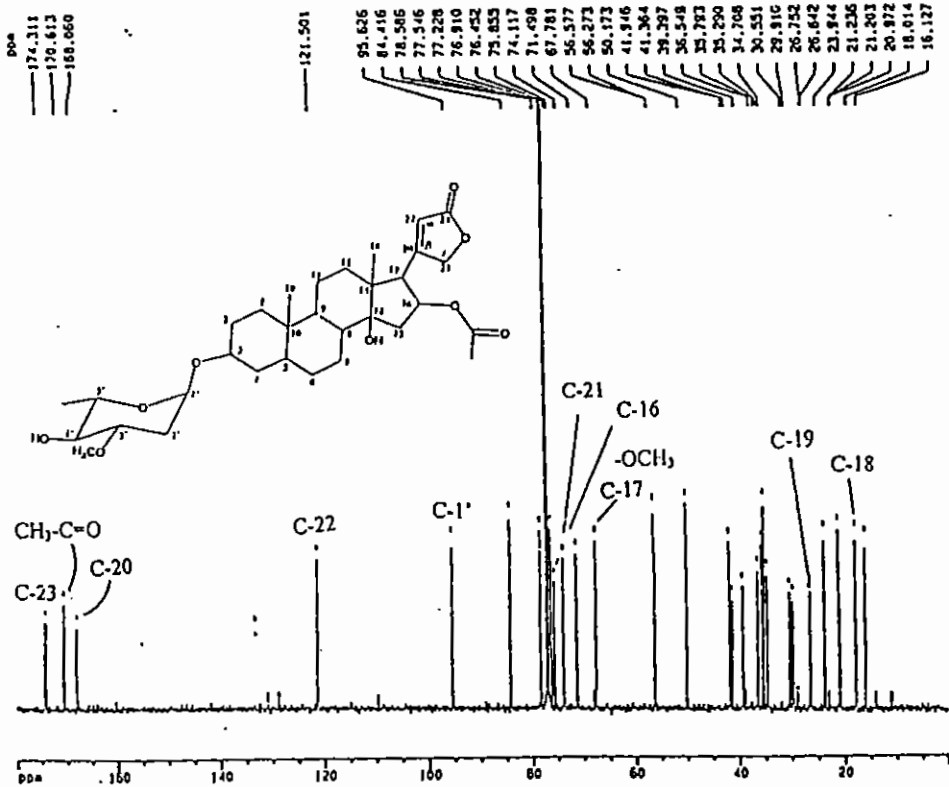
Spektrum ultraviolet (uv, dalam metanol) F5-1 menunjukkan serapan maksimum pada λ 241 nm yang karakteristik adanya gugus α, β tidak jenuh dari suatu γ-lakton yang tidak terkonjugasi (Silverstein *et al.*, 1981). Spektrum inframerah (ir) (KBr pellet) (Gambar 2) menunjukkan adanya gugus -OH (3438 cm⁻¹), alkan (2935, 2877 cm⁻¹), ester -C=O (1735 cm⁻¹), dan serapan dari α, β tidak jenuh dari suatu γ-lakton, nampak pada panjang gelombang lebih tinggi (1738 cm⁻¹) (Silverstein *et al.*, 1981; Dryer, 1965). Keberadaan ikatan -C-O-C- terlihat pada pita serapan pada 1248 cm⁻¹.



Gambar 2. Spektrogram Infraamerah (Ir) senyawa bioaktif F5-1

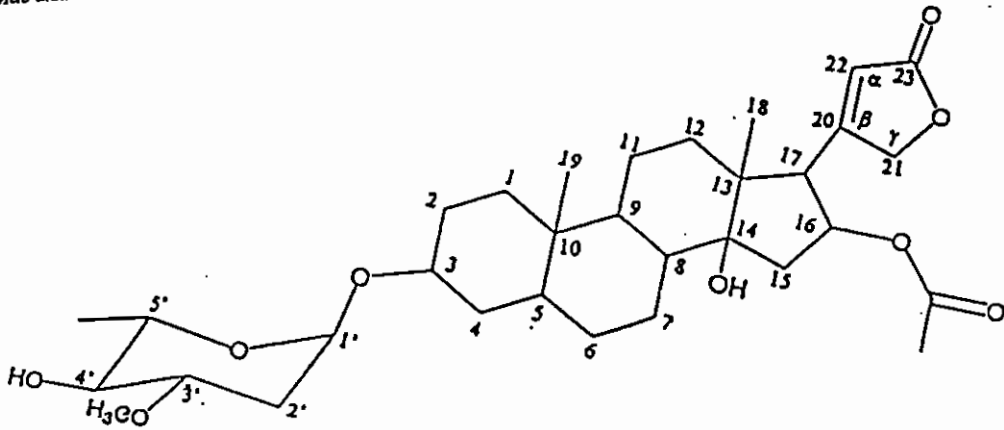
Spektrum massa resolusi rendah (*EI-low resolution mass spectrum*) dengan pengion elektron dampak menginformasikan bahwa bobot molekul senyawa F5-1 adalah *m/z* 576, dan spektrum massa resolusi tinggi (*high resolution mass spectrum*) menginformasikan bahwa F5-1 mempunyai elemen penyusun C₃₂H₄₈O₉. Dengan demikian derajat ketidak jenuhan (*Degree of Unsaturation*) yaitu jumlah ikatan rangkap dan lingkaran/cincin adalah 9.

Spektrum ¹³C-Nuklir Magnetik Resonans (CDCl₃-TMS, 500 MHz) dari F5-1 (Gambar 3) menunjukkan adanya 32 karbon, kemudian teknik APT (*Attached Proton Test*) diketahui bahwa 6 atom C tidak mengikat atom H [2 -C=O ester (δ, 174,3 dan 170,6 ppm), 1 alken tersubstitusi (δ, 168 ppm), 1 atom C karbinol (δ, 84,4 ppm)]; kemudian dengan teknik DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) (Paudler, 1987) diketahui terdapat 10 karbon metilena (-CH₂), 10 karbon metina (-CH) yang salah satu diantaranya gugus alken tidak tersubstitusi (δ, 121,5 ppm) dan 3 gugus metil (-CH₃) yang salah satunya adalah metil grup dari gugus asetil (δ, 21,20 ppm).

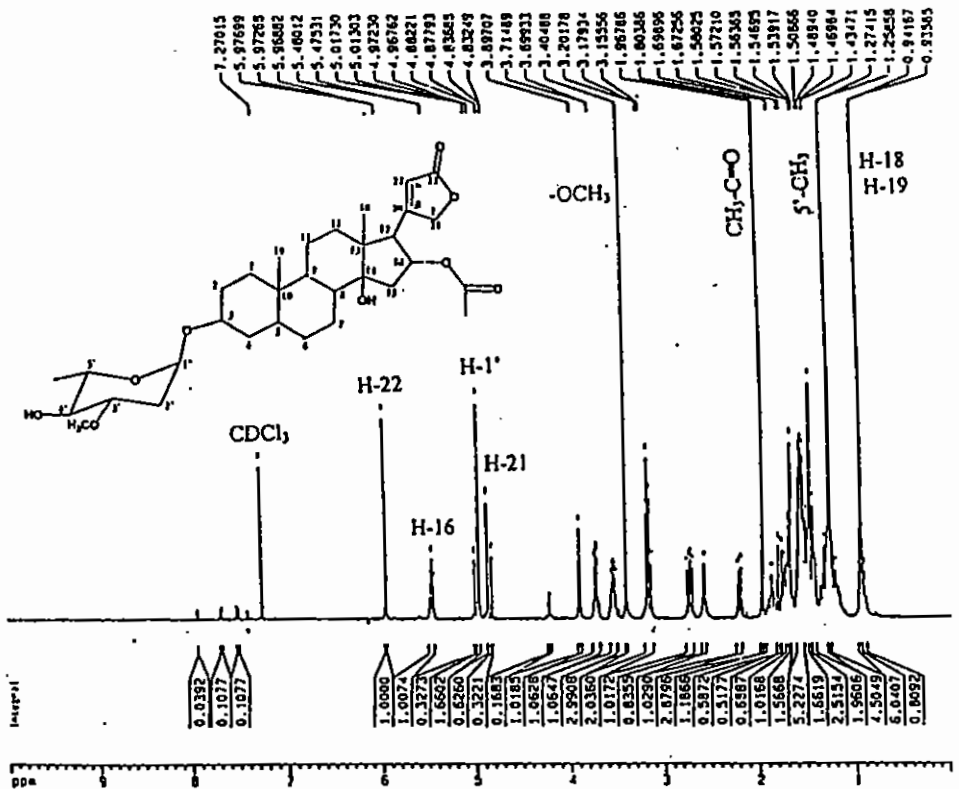


Gambar 3. Spektrum ^{13}C -nmr (CDCl_3 -TMS, 500 MHz) senyawa bioaktif F5-1

Berdasarkan atas pergeseran kimiawi dari metine ($-\text{CH}$) yang relatif *down field*, teridentifikasi sebagai metin-oksi, maka dipastikan terdapat gugus gula pada struktur kardenolida. Berdasarkan atas bobot molekul, dan elemen penyusun senyawa F5-1 maka identifikasi senyawa ini mengarah kepada Oleandrin (Gambar 4). F5-1. Oleh karena itu, berdasarkan data keberadaan α, β tidak jenuh dari suatu γ -laktone, gugus gula, gugus asetil dan data khemotaksonomi dari *Nerium* sp. maka identifikasi F5-1 mengarah pada kerangka suatu kardenolida. Berdasarkan atas bobot molekul, dan elemen penyusun senyawa F5-1 maka identifikasi senyawa ini mengarah kepada Oleandrin (Gambar 4)



Gambar 4. Struktur kimia Oleandrin (F5-1)



Gambar 5. Spektrum H-NMR senyawa bioaktif F5-1

Struktur absolut senyawa F5-1 diperoleh dari spektrum 1D dan 2D ¹H-Nuklir Magnetik Resonans (CDCl₃-TMS, 500 MHz) (Gambar 5). Spektrum ¹H-NMR F5-1 menunjukkan adanya proton =CH- [δ, 5,98 (s), 1H] teridentifikasi sebagai H-22. Berdasarkan atas data dengan teknik HETCOR (Wuthrich, 1986)

diketahui bahwa H-22 terikat pada karbon dengan pergeseran kimia pada δ 121,50 ppm di ^{13}C -NMR; demikian juga terhadap proton pada δ 5,48 ppm (1H, dt) yang teridentifikasi sebagai H-16 terikat pada C-16 (δ , 75,86 ppm). Pergeseran kimia yang *downfield* dari H-16 ini disebabkan karena bentuk ring yang pentasiklik, dan dipengaruhi oleh sifat penarik electron dari 2 gugus $\text{C}=\text{O}$ (asetil dan γ -laktone dari α , β tidak jenuh). Kedua puncak proton pada δ , 4,97 (1H) dan 4,83 ppm (d, $J=18,0$; 1,5 Hz) mengikat karbon yang sama (C-21) yang nampak pada pergeseran kimia δ , 74,11 ppm.

Tabel I. Pergeseran Kimia ^{13}C dan RMI ^1H

No.	No. Atom C	Pergeseran ^{13}C (ppm)	Pergeseran ^1H (ppm)
1.	3'	174,3	--
2.	10,	174,3	--
3.	13,	174,3	--
4.	14,	174,3	--
5.	dan 2 ester	170,6	--
6.	4,(karbinol)	168	--
7.	5'(alken - substitusi	84,4	--
8.	2' $-\text{CH}_2-$	168	H-2' = 1,94 (m)
9.	1	168	
10.	2	168	
11.	4	168	
12.	6	168	
13.	7	168	
14.	11	168	
15.	12	168	
16.	15	168	
17.	21	168	H-21 = 4,97 dan 4,83
18.	1'($-\text{CH}-$)	121,5	H-1' = 1,94, 1,68 (m)
19.	3'	121,5	H-3' = 3,40 (s)
20.	4'	121,5	
21.	5'	121,5	H-5' = 3,96 (d,q)
22.	3	121,5	H-3 = 3,90, (br,s)
23.	5	121,5	
24.	8	121,5	
25.	9	121,5	
26.	16	121,5	H-16 = 5,48
27.	17	121,5	H-20 = 4,97 dan 4,83
28.	20	121,5	
29.	22	21,20	H-22 = 5,98H
	$-\text{CH}_3$	21,20	H-19 = 0,93, H=

Proton gula mempunyai pergeseran kimiawi yang karakteristik, sehingga signal pada δ , 4,92 ppm (1H, dd, $J=9,5$; 1,5 Hz) teridentifikasi sebagai proton gula (H-1'), yang nampak pada teknik COSY terjadi *couple* dengan H-2' [δ , 1,94 (m); 1,68 (m) ppm] dan *coupled* dengan H-3 [(δ , 3,90 (br,s)] pada percobaan dengan teknik NOESY. Proton H-5' memberikan signal pada δ , 3,56 (d,q) terintegrasi sebagai 1H, kemudian puncak pada δ , 3,33 ppm merupakan signal dari H-3'. Gugus metoksi ($-\text{OMe}$) yang terikat pada C-3' muncul singlet pada δ 3,40 ppm, sedangkan gugus metil dari asetil nampak singlet pada δ 1,97 ppm. Pada daerah pergeseran kimiawi yang *up field*, tampak 3 signal dari gugus metil yaitu pada δ , 0,93 (s, H-

18); 0,94 (s, H-19) ppm, dan satu gugus -Metil dublet pada δ , 1,26 (d) ppm adalah metil yang terikat pada C-5'.

Berdasarkan atas data spektroskopi diatas dan dibandingkan dengan data-data publikasi dari senyawa-senyawa sejenis (Siddiqui *et al.*, 1997; Begum *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 1993) maka senyawa bioaktif F5-1 disimpulkan sebagai oleandrin atau 16 β -asetoksi-3 β -oleandrosa-14 β -hidroksi-5 β -kard-20(22)-enolida.

KESIMPULAN

Senyawa bioaktif yang paling potensial (F5-1) dari daun *Nerium indicum* Mill. mempunyai LC-50 = 1,36 μ g/ml, dan berdasarkan atas data spektroskopi (uv, ir, ms, nmr) serta perbandingan dengan data di literatur maka senyawa tersebut diidentifikasi sebagai oleandrin (16 β -asetoksi-3 β -oleandrosa-14 β -hidroksi-5 β -kard-20(22)-enolida.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dihaturkan kepada:

1. Fakultas Pasca Sardjana, Universitas Gadjah Mada atas dana TMPD yang diberikan kepada kami (Mae S. H. W) sebagai mahasiswa S-2 bidang ilmu Farmasi.

2. Prof. Mark T. Hamann Ph.D. dari University of Mississippi, USA, atas bantuan data spektra HRMS (*High Resolution Mass spectra*) dan 1-D & 2-D nmr spectra senyawa F5-1

DAFTAR PUSTAKA

Begum, S., Sultana, R. and Siddiqui, B. S., 1997, Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 44(2) 329-332

Begum, S., Siddiqui, B. S., Sultana, R., Zia, A., and Suria, A., 1999, Bio-active cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 50, 435-438

Boisio, M. L., Esposito, M., and Metlo, F., 1993, Separation and identifying features of the cardiac aglycones and glycosides of *Nerium oleander* L. flowers by thin-layer chromatography, *Minerva Med.*, 84(11), 627-632

Cabrera, G. M., Deluca, M. E., Seldes, A. M., Gros, E. G., Oberti, J. C., Crockett, J., and Gros, M. L., 1993, Cardenolide glycosides from the roots of *Mandevilla pentlandia*, *Phytochemistry*, 32(5), 1253-1259

Dyer, J. P., 1965, *Application of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey

Gu, Z. M., Zeng, L., Schwendler, J. T., Wood, K. V. and McLaughlin, J. L., 1995, New Bioactive adjacent bis-THF annonaceous acetogenins from *Annona bullata*, *Phytochemistry*, 40(2), 467-477

Hartwell, J. L., 1982, *Plant Used Against Cancer*, p. 407, Quartermen Publications Inc., Lawrence, Massachusetts

McLaughlin, J. L., and Ferrigni, N. R., 1983, Potato discs and brine shrimp : Two simple bioassays for antitumor prescreening and fractionation monitoring, *Proceeding of Symposium on Discovery and Development of Naturally occurring antitumor agents*, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, 9-12

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient general bioassay for active plant constituents, *J. Med. Plant. Res.*, 45, 31-34

- Paudler, W. W., 1987, *Nuclear Magnetic Resonance, General concepts and applications*, John Wiley & Sons, New York
- Perry, L. M., 1980, *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, 27, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts
- Siddiqui, S., Begum, S., Siddiqui, B. S., and Hafeez, F., 1989, Kanerin and 12,13-dihydrourosolic acid, two new pentacyclic triterpenes from the leaves of *Nerium oleander*, *J. Nat. Prod.*, 52(1), 57-62
- Siddiqui, B. S., Sultana, R., Begum, S., Zia, A., Suria, A., 1997, Cardenolides from the methanolic extract of *Nerium oleander* leaves possessing central nervous system depressant activity in mice, *J. Nat. Prod.*, 60, 540-544
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., and Morrill, T. C., 1981, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Ed., John Wiley & Sons Inc., New York
- Subagus Wahyuono dan Mae Sri Hartati W., 1998, *Brine shrimp lethality test (BST)* dari bahan tanaman yang dilaporkan dapat digunakan sebagai antikanker, *Majalah Obat Tradisional*, 3(6), 142-153
- Troter II, R. T., Logan, M. H., Rocha, J. M., and Boneta, J. L., 1983, Ethnography and bioassay: Combined methods for a preliminary screen of home remedies potential pharmacological activity, *J. Ethnopharmacol.*, 8, 113-119
- Widjakusuma, H., 1993, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid ke-2, 74-75, Pustaka Kartini
- Wuthrich, K., 1986, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York
- Zia, A., Siddiqui, B. S., Begum, S., Siddiqui, S., and Suria, A., 1995, Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 49(1), 33-39