

ARTIKEL TINJAUAN: ANALISIS AZADIRAKTIN DALAM EKSTRAK DAN SEDIAAN KRIM TANAMAN MIMBA MENGGUNAKAN HPLC

Bella Puteri Irinda, Rimadani Pratiwi
Program Studi Sarjana Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran,
Jl. Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363
bellaputeriirinda@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman mimba telah digunakan di berbagai negara untuk pengobatan antiparasit dan anti skabies. Sediaan topikal dengan bentuk krim lebih disukai karena banyak keuntungannya, diantaranya yaitu: sederhana dalam pembuatan, mudah dalam penggunaan, serta mudah dicuci. Penetapan kadar azadiraktin dalam ekstrak maupun sediaan seperti krim diperlukan untuk mengetahui dan memastikan kadar sesungguhnya dari azadiraktin terutama dalam sediaan hayati yang dapat dijadikan acuan untuk mengetahui profil bioavailabilitas azadiraktin. Instrumen yang digunakan untuk menetapkan kadar azadiraktin yaitu KCKT. Teknik yang telah dikembangkan untuk menarik azadiraktin dari ekstrak maupun sediaan krim yaitu dengan cara sentrifugasi dan Soxhlet. Variasi kondisi optimasi metode yang memungkinkan untuk digunakan dalam analisis azadiraktin yaitu asetonitril:air (40:60), kolom C-18, laju alir 4.4 mL/min, dan volume injeksi 10 µl serta metanol:air (50:50), kolom C-18, laju alir 2 mL/min, dan volume injeksi 10 µl keduanya menghasilkan waktu retensi yang berdekatan dengan standar.

Kata Kunci: azadiraktin, kckt, ekstraksi, optimasi

ABSTRACT

Neem has been used in many countries for antiparasitic and anti-scabies treatment. Topical cream is preferred because of its advantages, including: simple in making, easy to use, and easy to wash. The determination of the azadirachtin levels in a extract nor a cream is necessary to know the actual levels of azadirachtin especially in the bioavailable preparations which can be used as a reference for the bioavailability profile of azadirachtin. The instrument that can be used to analyze azadirachtin is HPLC. The technique has been developed to pull out azadirachtin from extracts and cream by centrifugation and Soxhlet. The best variation of the conditions for analysis of azadirachtin is acetonitrile: water (40:60), flow rate of 4.4 mL/min, and injection volume of 10 µl resulted in retention time adjacent to the standard, and methanol: water (50:50), a 2 mL/minute flow, and a 10 µl injection volume yields a retention time adjacent to the standard.

Keywords: azadirachtin, hplc, extraction, optimization

Diserahkan: 03 Juli 2018, Diterima 03 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Minyak mimba telah digunakan di berbagai negara untuk pengobatan

antiparasit dan anti skabies. Penelitian terdahulu melaporkan, bahwa penggunaan pasta campuran minyak mimba dan kunyit pada penderita skabies dengan hasil 97%

menunjukkan perbaikan pada 814 pasien setelah terapi selama 3 – 15 hari (Charles & Charles, 1992). Adapun Studi yang pernah dilakukan oleh Tabassam et al., 2008 menunjukkan efektivitas *ointment methanol* dengan ekstrak biji mimba 20% terhadap infestasi *Sarcoptes scabiei* pada domba (Tabassam, 2008).

Kandungan zat aktif yang terdapat pada tanaman mimba antara lain azadiraktin, gedunin, meliacin, nimbolides, nimbidin, nimbin, salanin, valassin, dan tignat (Sharma, et al., 2011).

Sediaan topikal dengan bentuk krim lebih disukai karena banyak keuntungannya, diantaranya yaitu: sederhana dalam pembuatan, mudah dalam penggunaan, mudah dicuci, bentuknya menarik serta menimbulkan rasa nyaman bagi pengguna (Ansel, 1989).

Penetapan kadar azadiraktin dalam sediaan farmasetikal seperti krim diperlukan untuk mengetahui dan memastikan kadar sesungguhnya dari azadiraktin terutama dalam sediaan hayati yang dapat dijadikan acuan untuk mengetahui profil bioavailabilitas azadiraktin. Salah satu instrument yang dapat digunakan untuk meneliti kandungan kadar azadiraktin dalam bentuk sediaan krim yaitu menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Gai, et al., 2011).

Dalam *review* artikel ini akan diuraikan mengenai berbagai kondisi dalam metode

analisis minyak mimba dalam sediaan krim menggunakan HPLC.

Tanaman Mimba

Neem (*Azadirachta indica*) atau tanaman mimba, salah satu tanaman dari keluarga Meliaceae, adalah pohon asli Myanmar. Pohon ajaib ini tumbuh dengan baik di hampir semua jenis lingkungan tanah. Dari semua ekstrak mimba, minyak biji mimba adalah produk yang paling dikenal dan paling populer. Minyak mimba diekstrak dari biji pohon mimba dan memiliki aktivitas sebagai insektisida yang digunakan sebagai bahan obat karena telah digunakan dalam pengendalian hama (Sharma, 2017).

Tanaman mimba adalah satu dari dua dari spesies dalam genus *Azadirachta*, yang sekarang terdapat pula di Afrika Barat dan banyak dibudidayakan di Indonesia sebagai tanaman hias dan obat (Vinot, et.al, 2012).

Klasifikasi tanaman mimba adalah sebagai berikut:.

Kingdom : Plantae
Order : Rutales
Suborder : Rutinae
Family : Meliaceae
Suku : Meliaeeae
Genus : *Azadirachta*
Species : *indica*

(Girish, 2008)

Biji mimba mengandung 30-50% minyak yang terutama digunakan oleh

industri farmasi dalam bentuk sediaan sabun dan juga dapat digunakan sebagai pestisida alami karena banyak mengandung bahan aktif yang disebut triterpen atau Limonoid (Hashmat, et al., 2012). Limonoid merupakan zat aktif yang memiliki aktivitas insektisida dan pestisida. Empat senyawa Limonoid terbaik adalah: azadiraktin, Salannin, Meliantriol, and Nimbin (Hashmat, et al., 2012).

Secara tradisional, sebagian besar orang Nepal menggunakan ranting tumbuhan mimba untuk membersihkan gigi mereka, mengambil sarinya sebagai tonik untuk meningkatkan nafsu makan dan menggunakannya untuk demam atau untuk mengobati cacing usus. Minyak mimba, kulit kayu mimba dan ekstrak daun mimba masing-masing telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengatasi penyakit seperti kusta, cacing usus, gangguan pernapasan, sembelit, dan infeksi kulit (Biswas et al., 2002).

Namun, terlepas dari penggunaannya, ada beberapa laporan tentang aktivitas biologis dan tindakan farmakologis berdasarkan penelitian ilmiah modern, seperti antivirus, antibakteri antijamur, anti-inflamasi dan antipiretik, antiseptik, antiparalitik, dan antioksidan (Ghimeray, 2009).

Tanaman mimba pun telah terbukti tidak mutagenik, *biodegradable*, dan tidak

beracun bagi mamalia (Mordue, et.al., 1993). Tetapi sensitif terhadap udara, sinar matahari, panas, dan kelembaban (Larson, et.al., 1989).

Ekstrak Tanaman Mimba

Bagian tanaman mimba yang dapat digunakan sebagai ekstrak dapat berasal dari daun (Soni, et.al., 2012), dan biji (Deota, et.al., 2000). Ekstrak tanaman mimba dapat digunakan sebagai bahan baku obat herbal. Obat herbal mempunyai peranan penting sebagai salah satu alternatif dalam pemeliharaan kesehatan terutama pada negara berkembang (Soni, et.al., 2012). Pembuatan krim dari ekstrak tanaman mimba dipercaya dapat menambah daya terima oleh masyarakat.

Sediaan Krim

Krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai (Depkes RI, 1995).

Beberapa keuntungan dari penggunaan sediaan krim yaitu cara pemakaian yang relatif mudah, kemungkinan mengurangi efek samping yang ditimbulkan, berefek lokal, menghindari *first pass effect* di hati, dan nyaman digunakan (Bora, 2017).

Syarat-syarat dasar krim yang baik dan ideal adalah stabil secara fisika dan kimia, lunak dan bebas dari pertikel tajam, mudah digunakan, cocok dengan zat aktif, bahan obat dapat terbagi halus dan terdistribusi merata dalam dasar krim, tidak

mengiritasi kulit, tidak mempunyai efek terapi, tidak toksis, mudah dicuci, bebas dari bau yang tidak enak, mempunyai kesanggupan untuk melepaskan zat berkhasiat yang dimasukkan ke dalamnya dan mempunyai pH yang sesuai atau mendekati pH normal kulit yaitu sekitar 4,2-6,5 (Afifah, 2005); 4,8-5,8 (Sukrasno, 2003).

Stabilitas Kimia

Stabilitas sediaan farmasi merupakan salah satu kriteria yang amat penting untuk suatu hasil produksi yang baik. Ketidakstabilan produk obat dapat mengakibatkan terjadinya penurunan sampai dengan hilangnya khasiat obat, obat dapat berubah menjadi toksik atau terjadinya perubahan penampilan sediaan (warna, bau, rasa, konsistensi dan lain-lain) yang dapat merugikan konsumen. (Ansel, 1989) (Lachman, et al., 1994).

Salah satu evaluasi untuk mengetahui stabilitas kimia dari suatu sediaan farmasi yaitu dengan analisis kandungan zat aktif pada sediaan untuk mengukur profil bioavailabilitas dalam rentang waktu penyimpanan tertentu. Instrumen yang dapat digunakan untuk analisis kadar zat dalam suatu sediaan yaitu KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

Ekstraksi Azadiraktin

Tahap sebelum dilakukan analisis terhadap azadiraktin di dalam ekstrak dan sediaan krim tanaman mimba yaitu dilakukan

ekstraksi yang bertujuan untuk menarik azadiraktin keluar dari ekstrak maupun sediaan krim tanaman mimba dengan pelarut tertentu. Metode utama yang sering digunakan untuk ekstraksi berbagai macam tumbuhan yaitu sonikasi, Soxhlet, pemanasan, ekstraksi dengan air panas bertekanan menggunakan solven seperti metanol, etanol, air, atau campuran dari semuanya (Ong, 2004). Pada artikel *review* ini akan lebih membahas tentang 2 metode yang paling utama yaitu diantaranya :

- a. Sonikasi dan Sentrifugasi (Warthen, 1984).

Sentrifugasi merupakan salah satu teknik pemisahan antara 2 zat berdasarkan massa jenis zat tersebut. massa jenis yang lebih besar akan berada di fasa bawah, sedangkan massa jenis yang lebih rendah akan berada di fasa atas. Berdasarkan penelitian Warthen pada tahun 1984, 1 g formula mimba-kaolin dilarutkan dengan 2-10 mL etanol 95% dan disonikasi selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan rendah selama 5 menit menunjukkan hasil yang paling efektif untuk menarik azadiraktin dari formula tersebut. Adapun konsentrasi azadiraktin yang tertarik oleh beberapa pelarut yang berbeda terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Ekstraksi Formula Mimba-Kaolin

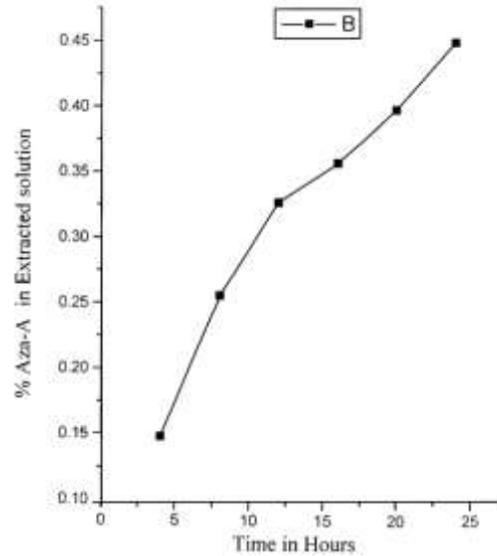
Solven	µg Aza/ 10 µL Solven
95% Etanol	2.80
Metanol:air (85:15)	2.60
Metanol	2.19
Metilen Klorida	1.73
Eter	1.28
Aseton	0.74

b. Soxhlet (Deota, 2000).

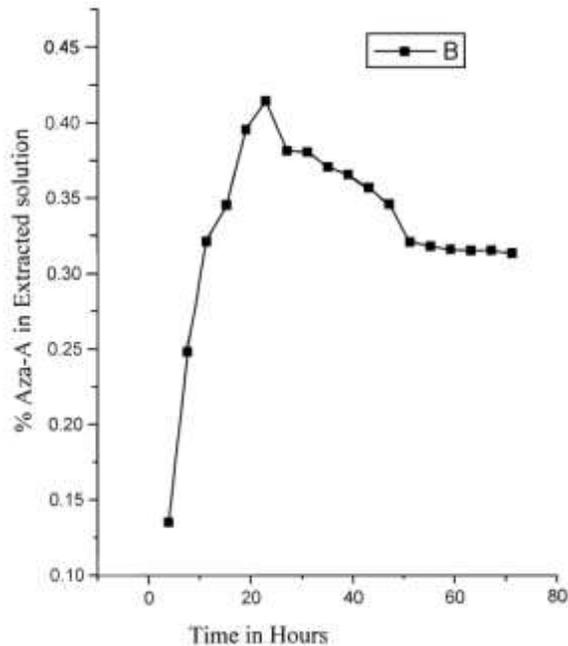
Dalam percobaan ekstraksi menggunakan Soxhlet, kadar azadiraktin (Aza-A) ditentukan dengan menggunakan HPLC-UV. Ekstraksi terhadap ekstrak tanaman mimba dilakukan selama 72 jam dengan interval pengambilam sampel setiap 4 jam. Hasil HPLC-UV menunjukkan bahwa adanya peningkatan kadar azadiraktin dalam larutan yang diekstraksi dengan metode Soxhlet (0,449%) dibandingkan dengan metode

ekstraksi normal (0,386%, setelah enam kali ekstraksi menggunakan metanol) sehingga menunjukkan bahwa metode Soxhlet lebih efisien dibandingkan dengan metode ekstraksi biasa. Grafik pada Gambar 1. dan Gambar 2. menunjukkan bahwa pada ekstraksi menggunakan Soxhlet, jumlah azadiraktin dalam larutan mengalami peningkatan secara bertahap hingga jam ke-24 dan menurun secara bertahap hingga jam ke-72, hal ini mungkin terjadi karena adanya dekomposisi dari azadiraktin.

Gambar 1. Kadar Aza-A selama 24 jam Soxhlet



Gambar 2. Kadar Aza-A selama 72 jam Soxhlet



Optimasi

Optimasi kondisi optimum KCKT diperlukan untuk memilih kondisi KCKT yang sesuai untuk analit yang akan dianalisis. Faktor-faktor yang mempengaruhi kondisi optimasi KCKT yaitu kolom, detektor, fase gerak, laju

alir dan volume injeksi. Adapun kondisi optimasi analisis azadiraktin dari ekstrak dan sediaan krim tanaman mimba yang telah dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kondisi Optimasi Azadiraktin

No.	Kolom	Detektor	Fase Gerak	Laju Alir	Volume Injeksi	Rt
1.	C-18	UV 219	Asetonitril:air (30:70)	1 mL/min	25 µL	Sampel = 2.97 Standar = 3.6 (Soni, et.al, 2012)
2.	C-18	UV 217	Asetonitril: air(40:60)	4.4 mL/min	10 µL	Sampel = 3.5 Standar = 3.4 (Thejavathi, 1995).
3.	C-18	UV 217	Asetonitril:air (35:65)	1 mL/min	20 µL	Sampel = 18.6 Standar = - (Jadeja, 2011).
4.	C-18	UV 217	Metanol:air (60:40)	15 mL/min	1 mL	Sampel = 9.16 Standar = 6.95 (Deota, 2000).
5.	C-18	UV 214	Metanol:air(50:50)	2 mL/min	10 µL	Sampel = 11.46 Standar = 11.53 (Warthen, 1984).

Penggunaan kolom C-18 sebagai fasa diam untuk analisis azadiraktin pada beberapa penelitian karena kolom tersebut memiliki kisaran yang luas untuk selektifitas dan efisiensi. Penggunaan kolom C-18 telah terbukti efisien untuk memisahkan azadiraktin dan kandungan tanaman mimba lainnya (Thejavathi, 1995). Panjang gelombang maksimum azadiraktin pada 217 nm dipilih karena memiliki sensitivitas yang diperlukan untuk mengukur konsentrasi pada sampel (Forim, et.al, 2010). Faktor perbedaan dalam pembacaan absorpsi panjang

gelombang, mengakibatkan adanya perbedaan pemilihan panjang gelombang maksimum. Komposisi fase gerak asetonitril:air dan metanol:air digunakan karena azadiraktin memiliki kelarutan yang baik pada solven tersebut. Azadiraktin dapat terlarut baik pada solven dengan kelarutan sedang sampai tinggi seperti metanol, etanol, diethyl eter, diklorometan, dan etil asetat (Melwita, et.al, 2011). Laju alir merupakan aspek penting dalam suatu pemisahan karena dapat mempengaruhi kecepatan pelarut dan waktu tinggal pada kolom. Semakin tinggi

laju alir, maka volume pelarut yang dibutuhkan akan lebih besar. Pemilihan laju alir ditentukan oleh volume pelarut yang digunakan. Dilihat dari waktu retensi yang dihasilkan, tiap kondisi optimasi tidak menunjukkan rasio waktu retensi antara sampel dan standar yang berjarak terlalu besar. waktu retensi yang optimal yaitu berada pada rentang 2-7 menit, karena waktu tersebut menunjukkan bahwa analit tidak tertahan terlalu lama di kolom, dan tidak mudah keluar dari kolom. Perbedaan waktu retensi dari tiap kondisi optimasi disebabkan karena perbedaan indeks polaritas dari masing-masing solven.

Validasi

Validasi metode analisis merupakan serangkaian penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium dan membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2006).

Pada keadaan optimasi asetonitril:air (40:60), kolom C-18, laju alir 4.4 mL/min, dan volume injeksi 10 μ L menghasilkan data validasi yang terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Validasi Metode Analisis

	Hasil	Acuan
Presisi	$\pm 0.95\%$	< 2% (ICH, 1997).
Recovery	$99.5 \pm 4\%$	95 – 105% (ICH, 1997).

Nilai % *recovery* menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya dalam analit. Angka $99.5 \pm 4\%$ menunjukkan bahwa adanya kedekatan antara konsentrasi analit yang diuji dengan konsentrasi analit yang terdeteksi pada instrumen.

Uji presisi dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu metode analisis untuk menghasilkan keterulangan hasil yang sesuai dalam rentang dan kondisi analisis tertentu. Hasil menunjukkan memiliki koefisien variasi kurang dari 2% yang menunjukkan bahwa metode analisis yang dilakukan memiliki keterulangan yang baik (ICH, 1997).

SIMPULAN

Obat herbal kini sudah memiliki peranan penting sebagai salah satu program perawatan di negara-negara berkembang. Kandungan azadiraktin pada tanaman mimba terbukti sebagai zat potensial untuk mengatasi penyakit kulit seperti skabies. Penggunaan sediaan krim sudah meluas dan lebih disukai oleh masyarakat karena mudah

dipakai dan dapat meminimalisir efek samping. Penetapan kadar azadiraktin dalam sediaan farmasi sangat dibutuhkan dengan alasan pentingnya profil stabilitas kimia dari sediaan tersebut. Salah satu instrument yang dapat digunakan untuk meneliti kandungan kadar azadiraktin dalam bentuk sediaan krim yaitu menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Ekstraksi analit dari pembawanya merupakan rangkaian yang penting dalam metode analisis guna untuk meningkatkan optimasi dari suatu metode. Terdapat beberapa teknik yang dapat dilakukan untuk ekstraksi azadiraktin dalam ekstrak maupun krim tanaman mimba yaitu dengan cara sentrifugasi dan soxhlet. Kondisi optimasi yang perlu diperhatikan dalam analisis yaitu jenis kolom, detektor, fase gerak, laju alir dan volume injeksi. Kondisi optimasi yang telah dilakukan pada penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan kondisi optimasi yang memungkinkan dapat digunakan untuk analisis azadiraktin yaitu asetonitril:air digunakan pada perbandingan 40:60, kolom C-18, laju alir 4.4 mL/min, dan volume injeksi 10 µL, sedangkan untuk fase gerak metanol:air kondisi optimasi terbaik pada perbandingan 50:50, kolom C-18, laju alir 2 mL/min, dan volume injeksi 10 µL keduanya menunjukkan waktu retensi yang tidak jauh berbeda dengan standarnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada, Dr. Rimadani Pratiwi, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing, Rizky Abdullah, Ph.D., Apt. selaku dosen pengampu mata kuliah Metodologi Penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, E., 2005. *Tanaman Obat untuk Mengatasi Hepatitis*. Jakarta: Agormedia PustakBiswas.
- Ansel, H., 1989. *Introduction to Pharmaceutical Dosage Form 4th*. IV ed. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Biswas KI, chattopadhyay R, Banerjee K, Bandyopadhyay U (2002). Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Curr . Sci.* 82(1 1): 1336-1345.
- Bora, et.al. 2017. Recent Advances in Semisolid Dosage Form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and research*. Vol. 5(9): 3594-08.
- Charles, V. & Charles, S., 1992. The Use and Efficacy of *Azadirachta Indica* ADR (Neem) and *Curcuma longa* (Tumeric) in Skabies. *Trop. Geogr. Med.*, Volume 44, pp. 178-181.
- Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. IV penyunt. Jakarta: Dirjen POM, Depkes RI.
- Deota, P.T., et.al. 2000. Estimation and Isolation of Azadirachtin-A from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Kernels Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 23(14): 2225-2235.
- Forim, RF, et.al. 2010. Simultaneous Quantification of Azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian Seeds and Oil of *Azadirachta indica*:

- Application to Quality Control and Marketing. *Analytical Methods*. Vol.2: 860-869.
- Gai, M. N., Alvarez, C., Venegas, R. & Morales, J., 2011. An HPLC Method for Determination of Azadirachtin Residues in Bovine Muscle. *Journal of Chromatographic Science*, Volume 49, pp. 327-331.
- Ghimeray, et.al. 2009. Antioxidant Activity and Quantitative Estimation of Azadirachtin and Nimbin in *Azadirachta indica* A. Juss Grown in Foothills of Nepal. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8(13):3084-3091.
- Girish, K. & B.S., S., 2008. Neem a Green Treasure. *Electronic Journal of Biology*, 4(3), pp. 102-111.
- Harmita, 2006. *Analisis FISiko Kimia*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hashmat, I., A, H. & A, A., 2012. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An Overview. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(16), pp. 76-79.
- Jadeja, G.C. et.al. 2011. Extraction of Natural Insecticide Azadirachtin from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Kernels Using Pressurized hot Solvent. *Journal of Supercritical Fluids*. Vol. 56: 253-258.
- Lachman, L., L. & Kanig, J., 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Larson, R. et.al. 1989. *Focus on Phytochemical Pesticides: The Neem Tree*. Florida: CRC Press Inc.
- Melwita, Elda, Et. al. 2011. Purification of Azadirachtin Via Silica Gel Column Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 34: 2462-2472.
- Mordue, A. et. al. 1993. Azadirachtin: an Update. *Insect Physiology*. Vol.39:903.
- Ong, E.S. 2004. Extraction Methods and Chemical Standarization of Botanical and Herbal Preparations. *Journal of Chromatography*. Vol. 812:23-33.
- Sharma, et. al. 2017. Stabilization of Azadirachtin in Neem Oil Using *Prosopis juliflora*(Leguminosae) as A Botanical Synergist. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*. Vol.4(7): 39-56.
- Sharma, P., L, T., M, B. & V, B., 2011. Review on Neem (*Azadirachta indica*): Thousand Problem One Solution. *Int. Res. J. of Pharmacy*, 2(12), pp. 97-102.
- Soni, Himesh. Et.al. 2012. Characterization of Azadirachtin from ethanolic Extract of Leaves of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacy Research*. Vol. 5(1): 199-201.
- Sukrasno, 2003. *Mimba Tanaman Obat Multifungsi*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Tabassam, S., 2008. Efficacy of Crude Neem Seed Kernel Against Infestation of *Sarcoptes scabiei* var *ovis*. *J. Ethnopharmacol*, 115(2), pp. 284-287.
- Thejavathi, R. et.al. 1995. Determination of Azadirachtin by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Using Anisole as Internal Standard. *Journal of Chromatography*. Vol. 705: 374-379.
- Vinoth B, Manivasagaperumal R, Rajaravindran M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss. *International Journal of Research in Plant Science*. 2012; 2(3): 50-55.
- Warthen, et.al. 1984. Estimation of Azadirachtin Content in Neem Extracts and Formulations. *Journal of Liquid Chromatography*. Vol. 7(3): 591-598.