

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIBAKTERI DARI DAUN PETAI CINA (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.)

IDENTIFICATION OF ANTIBACTERIAL COMPOUNDS ISOLATED FROM *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.) LEAVES

Ari Sartinah^{1*}, Puji Astuti², Subagus Wahyuono²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Hassanuddin, Makasar

²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Tumbuhan merupakan salah satu sumber daya alam yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional adalah petai cina (*Leucaena leucocephala*). Secara etnobotani, masyarakat Indonesia telah memanfaatkan daun petai cina sebagai obat-obatan diantaranya sebagai obat luka dan obat bengkak. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan secara ilmiah melalui isolasi dan identifikasi senyawa antibakteri dari daun *L. leucocephala*. Serbuk kering daun *L. leucocephala* diekstraksi dengan menggunakan Soxhlet secara bertingkat yang dimulai dengan washbenzen dan diikuti dengan metanol. Kedua ekstrak kental diuji aktivitas antibakterinya pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* 25922 menggunakan metode difusi agar dan dilihat profil KLT-nya. Ekstrak yang menunjukkan aktifitas terhadap *S. aureus* difraksinasi menggunakan kromatografi vakum cair dengan fase gerak yang berbeda yakni washbenzen dan kombinasi washbenzen dan etilasetat. Masing-masing fraksi yang diperoleh diuji aktivitas antibakterinya dan dilihat profil KLT-nya. Senyawa aktif pada fraksi aktif diisolasi dengan kromatografi lapis tipis preparatif (p1a, p2a, p3a). Senyawa aktif (p2a) yang diperoleh diuji kemurniannya secara KLT dengan tiga macam variasi fase gerak. Identifikasi struktur menggunakan spektrofotometer UV, IR, GC-MS dan NMR. Spektrum UV-Vis isolat p2a kloroform menampakkan serapan λ_{max} 214 nm, ini menunjukkan tidak adanya gugus kromofor. Spektrum inframerah menunjukkan serapan pada 3409,4 cm^{-1} (OH), 2928,2 cm^{-1} ($CH_{alifatik}$), 2854,3 cm^{-1} ($CH_{alifatik}$), 1575,5 cm^{-1} (C=C), 1416,4 cm^{-1} (CH_2), 1385,0 cm^{-1} (CH_3), 1258,3 cm^{-1} dan 1082,3 cm^{-1} (C-O). Spektra GC-MS menunjukkan ion molekul pada m/z 482 ($M + H^+$) dan ion fragmen pada m/z 427 ($M + H^+$). Spektra ¹H-NMR ($CDCl_3$) menunjukkan resonansi pada δ 0,8; 1,4; 1,6; 2,0; 2,3; 3,6; 4,2 dan 5,4 ppm. Spektra ini mengindikasikan sebuah senyawa lupeol.

Kata-kata kunci : *L. leucocephala* (Lam.) de Wit., senyawa antibakteri, isolasi.

ABSTRACT

Plants are important natural resources widely explored for maintaining health and treatment of diseases. One of them is *Leucaena leucocephala* leaf which is used as traditional medicine. Indonesian has used this leaf to treat wound and inflammation. This study was conducted to isolate and identify antibacterial compounds from *L. leucocephala* leaves. Dry powder of this leaf was extracted using washbenzen by Soxhletation method followed by methanol extraction. Both extracts were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* 25922 and analysed by TLC. Positive extract to *S. aureus* was further separated by vacuum liquid chromatography using different combination of washbenzene and ethyl acetate followed by analysis using TLC. Each fraction was tested for antibacterial activity and analysed by TLC. The positive fraction was further separated by TLC-preparative, assigned as p1a, p2a, p3a. The active compound (p2a) was tested for its purity using TLC with various mobile phase. Its structure was identified using combination data of UV-Vis and IR spectrophotometry, GC-MS and NMR. Based on UV-Vis data, this compound showed the absence of chromophoric group. IR data showed adsorption at 3409,4 cm^{-1} (OH), 2928,2 cm^{-1} ($CH_{aliphatic}$), 2854,3 cm^{-1} ($CH_{aliphatic}$), 1575,5 cm^{-1} (C=C), 1416,4 cm^{-1} (CH_2), 1385,0 cm^{-1} (CH_3), 1258,3 cm^{-1} and 1082,3 cm^{-1} (C-O). GC-MS data showed molecule ion at m/z 482 ($M + H^+$) and fragmented ion at m/z 427 ($M + H^+$). ¹H-NMR ($CDCl_3$) spectrum showed resonance at δ 0,8; 1,4; 1,6; 2,0; 2,3; 3,6; 4,2 and 5,4 pp, suggesting that this compound is lupeol.

keywords : *L. leucocephala* (Lam.) de Wit., antibacterial compounds, isolation

PENDAHULUAN

Keanekaragaman tumbuhan Indonesia merupakan kekayaan alam yang patut disyukuri. Tumbuhan merupakan salah satu sumber daya alam yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Hingga saat ini menurut perkiraan badan kesehatan dunia (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan tradisional termasuk penggunaan obat yang berasal dari tumbuhan (Radji, 2005). Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional adalah petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit).

Secara etnobotani, masyarakat Indonesia telah memanfaatkan daun petai cina sebagai obat-obatan diantaranya sebagai obat luka. Daun petai cina juga sudah dikenal masyarakat sebagai obat bengkak. Pemanfaatannya dengan cara dikunyah-kunyah atau diremas-remas, kemudian ditempelkan pada bagian yang bengkak (Wahyuni, 2006). Masyarakat Meksiko dan Zimbabwe memanfaatkan daun petai cina untuk pakan ternak yang dapat meningkatkan produksi susu ternak (Saucedo, dkk., 1980; Nherera, dkk., 1998). Di Peru, kulit batang, dan bunga petai cina digunakan sebagai antiseptik (Bussmann, dkk., 2010). Di Thailand, pucuk daun petai cina digunakan untuk mengobati diare (Chanwitheesuk, dkk., 2005).

Petai cina mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, mimosin, leukanin, protein, asam lemak dan serat (Skerman, 1977; Gupta dan Atreja, 1998; Khamseekhiew, dkk., 2001). Kajian bioaktivitas ekstrak kulit batang tanaman petai cina telah dilaporkan aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* (Bussmann, dkk., 2010).

Penyakit infeksi merupakan salah satu persoalan kesehatan global. Data WHO menunjukkan bahwa infeksi virus, bakteri, jamur, parasit merupakan penyebab kematian terbesar di dunia (Mathers, 2005). Demikian pula data Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2006 menunjukkan bahwa penyakit infeksi seperti infeksi pernapasan dan diare merupakan penyakit

difokuskan dalam bidang bioteknologi, namun riset obat-obatan yang bersifat eksploratif menjadi hal yang tidak boleh dimarginalkan. Selain karena pertimbangan ekonomis dan faktor keamanan (*safety*) yang relatif baik, pemanfaatan obat-obatan yang berasal dari alam juga telah banyak terbukti dan teruji (Saiful, 2005), apalagi dengan beragamnya tumbuhan di Indonesia senantiasa menggelitik kita untuk mengeksplorasinya.

Tumbuhan petai cina diketahui potensial untuk dikembangkan lebih lanjut pada penyakit infeksi (Bussmann, dkk., 2010). Namun sejauh ini evaluasi sifat antimikrobia tanaman petai cina yang telah dilaporkan masih pada tingkatan skrining. Belum ada laporan yang mengkaji senyawa kimianya dan mengevaluasi sifat antibakterialnya. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa yang aktif sebagai antibakteri.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan yaitu: daun tanaman petai cina (*L. leucocephala*), washbenzene (tehnis), washbenzene (p.a), metanol (tehnis), metanol (p.a), etilasetat (tehnis), etil asetat (p.a), kloroform (p.a), n-heksan (p.a) (E. Merck), silika gel 60 GF₂₅₄, plat KLT (E. Merck), aquades, media *Nutrient Agar* (NA), biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, kertas Wathman no. 1, kertas saring, serum sulfat.

Spektrofotometer UV-Vis (MILTON ROY SPECTRONIC 3000 ARRAY), spektrofotometer IR (PERKIN ELMER FTIR 100), ¹H-NMR (DELTA2 dengan frekuensi 500 MHz), GC-MS (GCMS-QP2010S SHIMADZU), peralatan gelas, alat Soxhlet, inkubator, autoklaf, *rotary evaporator*, cawan petri, cawan porselin, ose, autoklaf, lampu ultraviolet panjang gelombang 336 nm dan 254 nm, pipa kapiler, mikropipet, oven, seperangkat alat *Vacuum Liquid Chromatography*, dan bejana pengembang KLT preparatif.

Cara Kerja

Ekstraksi

Serbuk kering daun petai cina (300 gram) disari secara bertingkat menggunakan 2 pelarut yang berbeda polaritasnya, dimulai washbenzene dan kemudian dengan metanol. Serbuk disokhlet dengan 1 L washbenzene selama 24 jam, filtrat ditampung dan ampasnya diangin-anginkan sampai terbebas dari bau washbenzene dan disokhlet lagi dengan metanol sebanyak 1 L. Sokhletasi dihentikan setelah pelarutnya tampak jernih. filtrat diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak (Tabel I). Kedua ekstrak yang

*Korespondensi : Ari Sartinah
Fakultas Farmasi Universitas Hassanuddin
Makassar
Email : ari.chemphar@gmail.com

yang sering diderita oleh masyarakat Indonesia (Anonim, 2008). Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan obat penyakit infeksi khususnya antibakteri tetap merupakan hal yang sangat penting. Meskipun upaya penemuan obat-obatan antibakteri pada zaman sekarang banyak

diperoleh diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi agar.

Fraksinasi

Sebanyak 2 gram ekstrak aktif tersebut dikeringkan dengan silika gel 60 PF₂₅₄ Merck sampai menjadi serbuk kering. Bagian bawah *sinterglass* dimasukkan kertas saring, kemudian diisi dengan serbuk fase diam silika gel 60 PF₂₅₄ Merck sampai mencapai ketinggian $\pm \frac{1}{2}$ dari tinggi *sinterglass* sambil divakum, serbuk sampel ditaburkan di atasnya dan permukaan serbuk ditutup lagi dengan kertas saring. Elusi dilakukan dengan fase gerak washbenzen : etilasetat (washbenzen 100 %; 19:1; 19:1; 15,7:1; 13,3:1; 11,5:3; 9:1; 8:1; 8:2; 5:5) v/v sambil divakum (Tabel II). Hasil fraksinasi tersebut ditampung dan dikeringkan, selanjutnya dilihat profil KLTnya. Hasil fraksinasi yang menunjukkan pola bercak yang sama disatukan menjadi satu fraksi.

Isolasi

Fraksi yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang paling besar ditotolkan membentuk pita memanjang diatas plat KLTP. Selanjutnya plat tersebut diangin-anginkan sampai semua pelarutnya menguap. Plat tersebut dimasukkan dalam bejana yang berisi larutan pengembang washbenzen : etilasetat (8 : 1 v/v). Setelah pengembangan selesai, plat dikelurkan dari dalam bejana pengembang lalu diangin-anginkan lagi selama ± 30 menit. Untuk mengetahui bercak pita yang akan dikerok, plat tersebut diamati di bawah sinar UV atau dengan pereaksi semprot lalu ditandai pita-pita yang terbentuk. Pita-pita yang terbentuk hasil preparatif dikerok dan dikumpulkan serta dilarutkan dengan pelarut metanol:kloroform (1:1 v/v). Selanjutnya disaring dengan menggunakan penyaring vakum, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

Uji aktivitas antibakteri senyawa aktif

Isolat-isolat yang diperoleh dari KLTP dilarutkan dalam kloroform dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* dengan menggunakan metode difusi agar. Sebanyak 10 μ L isolat dengan konsentrasi 100 mg/mL (loading 1000 μ g) ditotolkan di atas paper disk. Isolat yang memiliki aktivitas antibakteri dimurnikan kembali

dengan KLTP dengan larutan pengembang washbenzen : etilasetat (15 : 1 v/v). sehingga diperoleh senyawa tunggal dan diuji aktifitas antibakterinya terhadap *S. aureus*.

Pemeriksaan kemurnian dengan KLT

Senyawa yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang paling besar selanjutnya dilakukan pemeriksaan kemurnian secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan 3 macam fase gerak yang berbeda yakni kloroform:etilasetat (15 : 1 v/v), washbenzene : etilasetat (14 : 1 v/v) dan n-heksan : etilasetat (5 : 1 v/v).

Identifikasi struktur senyawa

Isolat aktif diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, IR, ¹H-NMR dan GC-MS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan uji aktivitas antibakteri ekstrak

Hasil uji aktivitas antibakteri dari kedua ekstrak tersebut menunjukkan bahwa ekstrak washbenzene hanya aktif terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 sedangkan ekstrak metanol tidak aktif terhadap kedua bakteri baik *S. aureus* ATCC 25923 maupun *E. coli* ATCC 25922. Hal ini ditunjukkan dengan diameter zona hambat ekstrak washbenzene 250, 500 dan 1000 μ g berturut-turut adalah 7,13; 8,46 dan 9,07 mm sedangkan ekstrak metanol tidak memberikan hambatan. Ekstrak washbenzen yang hanya aktif terhadap *S. aureus* disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif yang mengakibatkan perbedaan penetrasi ekstrak uji ke dalam bakteri tersebut.

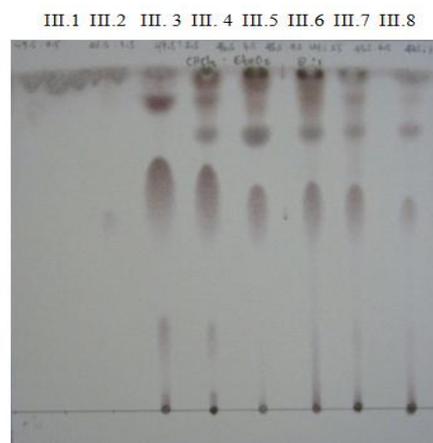
Dinding sel *S. aureus* (bakteri Gram positif) memiliki struktur dinding sel dengan banyak lapisan peptidoglikan dan relatif sedikit lipid sedangkan *E. coli* (bakteri Gram negatif) mempunyai struktur lebih kompleks, dimana terdapat membran luar yang melindungi peptidoglikan yakni fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (lapisan luar) (Jawetz, *et al.*, 1980; Pratiwi, 2008). Akibatnya, ekstrak uji sulit untuk menembus dan mengganggu integritas dinding sel bakteri tersebut.

Tabel I. Hasil ekstraksi serbuk daun petai cina

No.	Pelarut Penyari	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1.	Washbenzene	30,03	10,01
2.	Metanol	52,15	17,38

Tabel II. Hasil fraksinasi ekstrak WB daun petai cina

No.	WB (mL)	EtOAc (mL)	Perbandingan WB : EtOAc	Fraksi
1.	100	0	100% WB	I
2.	95	5	19:1	II
3.	95	5	19:1	III
4.	94	6	15,7:1	IV
5.	93	7	13,3:1	V
6.	92	8	11,5:3	
7.	90	10	9:1	VI
8.	88,88	11,12	8:1	
9.	80	20	8:2	VII
10.	50	50	5:5	



Gambar 1. Profil KLT hasil KCV F III dengan menggunakan fase gerak kloroform-etilasetat (8 : 1 v/v), fase diam silika gel 60 F254, yang dideteksi dengan pereaksi Serium Sulfat.

Fraksinasi, Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Isolat

Ekstrak washbenzene selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dan didapatkan 7 fraksi gabungan yaitu I, II, III, IV, V, VI dan VII (Tabel II).

Fraksi III merupakan fraksi yang paling aktif dengan diameter zona bening yang paling besar yakni 20,23 mm. Dari 7,5 g ekstrak washbenzen diperoleh 2 g FIII. Selanjutnya fraksi III difraksinasi lagi dengan kromatografi cair vakum untuk meminimilisir campuran senyawa yang terdapat dalam fraksi tersebut. Hal ini terlihat pada Gambar 1.



Gambar 2. Profil KLT pita 2 setelah di KLTP menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dengan eluen kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v) dengan pereaksi Serum Sulfat.



Gambar 3. Aktivitas antibakteri p1a, p2a, p3a loading 1000 µg daun petai cina pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923, C adalah kloroform sebagai kontrol negatif dengan diameter paper disk 6 mm.

Fraksi yang memberikan profil KLT yang sama atau mirip digabung, yakni fraksi III.3, III.4, III.5, III.6, III.7 dan III.8. Kemudian gabungan fraksi tersebut dilakukan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), yang dimaksudkan untuk memeriksa jumlah pita yang terbentuk. Dimana dari hasil KLT preparatif diperoleh sebanyak 5 pita. Pita 1 dan 2 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dengan diameter hambatan rata-rata sebesar 11,4 mm dan 12,8 mm. Pita 2 yang menunjukkan aktifitas paling besar dicek kemurniaanya dengan plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 F₂₅₄ menggunakan fase gerak kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v). Berdasarkan profil KLT masih ada yang tersisa ditempat penotolan (Gambar 2), oleh karena itu perlu dimurnikan lagi dengan menggunakan KLTP. Dari hasil KLTP pita 2 di peroleh 3 pita. Pita-pita yang terbentuk kemudian dikerok, dilarutkan dengan kloroform dan dipisahkan dengan cara disaring menggunakan vakum lalu hasilnya diuapkan sampai pelarutnya

menguap semua. Isolat-isolat tersebut kemudian diuji kembali aktivitas antibakterinya terhadap *S. Aureus*. Hasil uji aktivitas bakteri ditampilkan pada Gambar 3. Dari gambar di atas terlihat bahwa isolat p2a yang paling aktif dengan diameter hambatan sebesar 25,2 mm.

Pemeriksaan kemurnian secara kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan 3 macam fase gerak yang berbeda yakni kloroform:etilasetat (15 : 1 v/v), washbenzene : etilasetat (14 : 1 v/v) dan n-heksan : etilasetat (5 : 1 v/v). Berdasarkan profil KLT, isolat aktif memberikan bercak tunggal dielus dengan berbagai variasi fase gerak (data tidak diperlihatkan). Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa isolat tersebut telah murni secara KLT.

Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri

Berdasarkan analisis data spektra UV, IR , GC-MC dan ¹H-NMR, isolat yang diperoleh mengarah pada senyawa lupeol (Gambar 4).

Spektra ultra violet senyawa aktif hasil isolasi menunjukkan adanya absorbansi maksimum pada panjang gelombang (λ maks) 214 nm. Lupeol menunjukkan serapan pada λ maks (MeOH) 210 nm (Igoli, dkk., 2008).

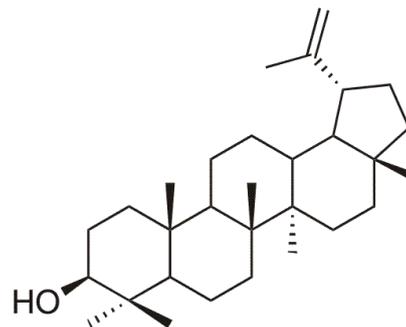
Spektra IR menunjukkan serapan kuat (*strong*) pada $3409,4\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan pita uluran OH, hal ini mengindikasikan adanya gugus (-OH) dan diperkuat dengan adanya pita serapan sedang (*moderat*) pada $1082,3\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan ikatan C-O dan serapan yang lemah (*weak*) pada $1285,3\text{ cm}^{-1}$. Vibrasi C-H luar bidang tak jenuh ditunjukkan pada 904 cm^{-1} sedangkan serapan pada 1575 cm^{-1} merupakan vibrasi ikatan rangkap C=C tak terkonjugasi. Vibrasi *stretching* dan *bending* dari metil (CH_3) ditunjukkan pada $2928,2$ dan serapan pada $2854,3\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya -CH bending yang merupakan hidrokarbon alifatik siklik (lingkar) dan dipertegas adanya serapan pada daerah $1416,4\text{ cm}^{-1}$ untuk metilen dan $1385,0\text{ cm}^{-1}$ untuk metil (Silverstein dkk., 1991). Data ini memperkuat struktur senyawa lupeol.

Data GC-MS memberikan fragmen 427 (M+H)^+ yang mengarah pada senyawa lupeol, dimana lupeol memiliki bobot molekul $426,3868\text{ g/mol}$.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi umum bahwa isolat yang diperoleh bukan merupakan senyawa aromatik. Hal ini ditunjukkan dengan *chemical shift* yang hanya sampai pada daerah 5 ppm. Proton metil, metilen alifatik dan proton olefinat ditunjukkan dengan *chemical shift* pada daerah 0,8 - 1,1 ppm dan 1,6 - 2,8 ppm.

Proton metil ditunjukkan pada daerah δ 0,87; 0,98; 1,10 ppm. Proton metilen, metin pada siklopentana dan metil olefinat ditunjukkan pada daerah 1,61; 2,07; 2,3; 2,8 ppm. Menurut Igoli, dkk. (2008) proton pada daerah δ 0,75 - 1,64 ppm merupakan proton *rest*. Ada enam metil tersier pada δ 0,76 - 1,03 ppm (Wahyuono, 1985).

Tipikal signal cincin lupan pentasiklik dengan proton olefinat ditunjukkan dengan *chemical shift* pada daerah δ 5,4 dan 4,2 ppm. Proton hidroksimetin pada daerah δ 3,6 ppm. Berdasarkan semua data-data spektrum pendukung yang tersebut diatas, maka dapat diidentifikasi bahwa puncak 1 isolat p2a dari daun petai cina kemungkinan adalah senyawa lupeol.



Gambar 4. Lupeol.

KESIMPULAN

Ekstrak washbenzen daun petai cina aktif terhadap bakteri *S. aureus*.

Senyawa yang terkandung pada isolat aktif antibakteri dari daun petai cina diperkirakan adalah lupeol.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2008, *Indonesia Country Profile 2007*, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Bussman, R. W., Glenn, A., Sharo, D., 2010, Antibacterial Activity of Medical Plants of Northern Peru - Can Traditional Applications Provide Leads for modern Science?, *Indian J. of Traditional Knowledge*, 9(4): 742-743.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N., 2005, Screening of Antioxidant Activity and Antioxidant Compounds of Some edible Plants of Thailand, *J. Food Chemistry*, 92 : 491-497.
- Direktusarakom, S., 2004, Application of Medicinal Herbs to Aquaculture in Asia, *Walailak J Science & Tech*, 1(1): 7-14.
- Igoli, John, O. dan Alexander, G.I., 2008, Friedelanone and Other Triterpenoid from *Hymenocardia acida*, *International journal of Physical Science*, 9(6): 156-158.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. dan Adelberg, E.A., 1982, *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*, edisi 14, diterjemahkan oleh Bonang, EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Mathers, C. D. dan Loncar, D., 2005, *Updated Projections of Global Mortality and Burden of Disease, 2002-2030: Data Sources, Methods and Results*, Evidence and Information for Policy World Health Organization.
- Nhereraa, F.V., Ndlovua L.R. dan Dzowelab, B.H., 1998, Utilisation of *Leucaena diversifolia*, *Leucaena esculenta*, *Leucaena pallida* and *Calliandra calothyrsus* as nitrogen supplements for growing goats fed maize stover, *Animal Feed Science and Technology*, 74: 15-28.

- Pratiwi, S. T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Radji, M., 2005, Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3 : 113-126.
- Robinson, T., 1995, Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi, ITB Press, Bandung.
- Saiful, 2005, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Daun Galinggang (*Cassia alata* Linn). *Tesis*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Saucedo, G., Alvarez, Jimenez dan Arriaga., 1980, *Leucaena leucocephala* as a Supplement for Milk Production on Tropical Pastures with Dual Purpose Cattle, *Trop Animal Product*, 5: 1.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. dan Morrill, T.C., 2002, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Seventh Edition., Jhon Wiley & Sons Inc., USA.
- Skerman, P.J., 1977, Tropical Forage Legumes, *FAO: Plant Production and Protection Series No. 2*.
- Wahyuono, S., 1985, Phytochemical Investigation of *Amsonia grandiflora* Family Apocynaceae, *Thesis*, The University of Arizona.
- Wahyuni, 2006, Efek Antiinflamasi Infusa Daun Petai Cina pada Tikus Jantan Galur Wistar, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UMS, Surakarta.