

## Antibacterial Activity of N-hexane and Diethyl Ether Fraction of *Piper betle* L. Leaf Against *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Bacteria

Dewi Andini Kunti Mulangri<sup>✉</sup>, Ria Ayu Ningrum, Nafilatul Imliyyah

Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Jl. Menoreh Tengah X/22 Sampangan, Semarang, Jawa Tengah, 50236, Indonesia

### Info Artikel

Diterima November 2021

Disetujui Desember 2021

Dipublikasikan Mei 2022

#### Keywords:

Antibacterial  
*Piper betel* leaf  
Diethyl ether fraction  
N-hexane fraction  
Difusi cakram

### Abstrak

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masih sering menjadi penyebab infeksi superfisial dan sistemik. Fraksinasi ekstrak daun sirih hijau dilakukan untuk mendapatkan senyawa yang lebih sederhana dibandingkan ekstrak kasarnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi n-heksan dan fraksi dietil eter daun sirih hijau terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ekstrak daun sirih hijau yang diperoleh difraksinasi dengan n-heksan dan dietileter. Fraksi n-heksan (FH) dan fraksi dietileter (FD) dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menggunakan konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2,0 dan 2,5 mg/disk. Kertas cakram Kloramfenikol 30  $\mu$ g/disk sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif. Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan mengamati zona hambat di sekitar kertas cakram yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Zona hambat kemudian diukur diameter daerah hambat (DDH). Hasil uji menunjukkan ada aktivitas antibakteri pada FH dan FD daun sirih hijau terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* ditandai adanya zona hambat di sekitar kertas cakram pada semua konsentrasi. Rata-rata DDH yang dihasilkan terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing sebesar 10,89–12,58 mm dan 7,28–11,93 mm untuk FH daun sirih hijau dan 6,51–11,89 mm dan 8,43–15,18 mm untuk FD daun sirih hijau.

### Abstract

*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria are still cause of superficial and systemic infections. Fractionation of green betel leaf extract was carried out to obtain simpler compounds than the crude extract. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of the n-hexane fraction and the diethyl ether fraction of green betel leaf against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The extract of green betel leaf was fractionated with n-hexane and diethyl ether. The n-hexane fraction (HF) and diethyl ether fraction (DF) were tested for antibacterial activity using the disc diffusion method and the concentrations used were 0.5; 1; 1.5; 2; and 2.5 mg/disc. Chloramphenicol paper disc 30  $\mu$ g/disc as a positive control and DMSO as a negative control. Data analysis was carried out descriptively by observing the inhibition zone around the paper disc which indicated the presence of antibacterial activity. The inhibition zone has measured the diameter of the inhibition area. The test results showed that there was antibacterial activity in the HF and DF of green betel leaf against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria, indicated by the presence of an inhibitory zone around the paper disc at all concentrations. The average diameter of the inhibition area produced against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 10.89–12.58 mm and 7.28–11.93 mm for green betel of HF and 6.51–11.89 mm and 8.43–15.18 mm for green betel of DF, respectively.

## Pendahuluan

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masih sering menjadi penyebab infeksi superfisial dan sistemik (Frickmann *et al.*, 2019). Bakteri *E. coli* merupakan salah satu patogen nosokomial paling umum penyebab infeksi saluran kemih. Bakteri *S. aureus* merupakan agen infeksi yang bertanggungjawab secara signifikan terhadap mortalitas dan morbiditas (Bachir dan Abouni, 2015).

Fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter dari ekstrak daun sirih hasil optimisasi metode purifikasi terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan diameter daerah hambat masing-masing 8 mm dan 9 mm (Wijaya *et al.*, 2018). Penelitian lain dari Nazah (2019), membuktikan bahwa fraksi *n*-heksan daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 250, 500 dan 750 mg/mL dengan nilai DDH 8,88 – 9,40 mm. Fraksi *n*-heksan pada penelitian tersebut diperoleh dengan cara mengekstraksi serbuk simplisia daun sirih hijau menggunakan pelarut *n*-heksan kemudian dilakukan pemisahan senyawa secara kromatografi lapis tipis (KLT). Diharapkan dengan adanya hasil optimisasi metode purifikasi pada penelitian Wijaya *et al.* (2018) akan mendapatkan kandungan senyawa aktif yang lebih besar dari fraksi-fraksi daun sirih hijau sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakterinya.

Dalam penelitian Wijaya *et al.*, (2018), juga melakukan pengujian skrining fitokimia dengan metode KLT dan hasilnya menunjukkan baik fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter daun sirih mengandung golongan senyawa terpenoid, golongan fenol dengan inti katekol dan golongan fenol sederhana. Daun sirih hijau dikenal mengandung minyak atsiri. Turunan senyawa eugenol dan kavikol yang terkandung dalam minyak atsiri daun sirih hijau yang diduga memiliki khasiat sebagai *antiacne* (Wirasuta dan Paramita, 2016). Adanya kandungan senyawa kimia dalam fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter ekstrak daun sirih diharapkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap spesies bakteri lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

## Metode

### Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Sirih Hijau

Daun sirih hijau diambil dengan cara memanen beberapa daun yang masih utuh, segar, dan tidak berpenyakit. Daun sirih hijau yang telah dicuci kemudian diangin-anginkan semalaman. Keesokan harinya daun sirih hijau tersebut dikeringkan menggunakan almari pengering pada suhu 50°C selama beberapa waktu sampai diperoleh kadar air <10% (Suliantari *et al.*, 2008). Daun sirih hijau yang telah kering kemudian dijadikan serbuk dengan alat penyerbuk. Serbuk simplisia daun sirih hijau yang digunakan untuk ekstraksi sebanyak 1 kg.

### Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang sesuai dimana 1 bagian serbuk simplisia ditambahkan dengan 10 bagian pelarut (Kemenkes RI, 2017). Serbuk daun sirih hijau ditimbang sebanyak 1 kg kemudian ditempatkan dalam toples kaca tertutup dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 7500 mL. Toples kaca yang telah terisi tadi ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 3 hari pada suhu ruang di tempat yang terlindung dari cahaya matahari dengan beberapa kali pengadukan. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas. Filtrat yang diperoleh ditampung. Selanjutnya ampas direndam kembali selama 2 hari untuk dilakukan proses remaserasi dengan menambahkan etanol 96% sebanyak 2500 mL. Setelah 2 hari, kemudian disaring menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring. Seluruh filtrat yang diperoleh ditampung menjadi satu, kemudian diuapkan menggunakan penguap vakum putar pada suhu 50°C (Depkes RI, 1986) dengan kecepatan 60 rpm, sehingga diperoleh ekstrak kental daun sirih hijau yang bebas dari pelarut.

### Pembuatan Fraksi *n*-Heksan dan Fraksi Dietileter Ekstrak Daun Sirih Hijau

Pembuatan fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter daun sirih hijau menggunakan metode fraksinasi cair-cair atau *Liquid-Liquid Extraction* (LLE). Ekstrak kental etanol daun sirih hijau ditimbang sebanyak 20 g kemudian dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 12 mL hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Setelah itu ditambahkan air sebanyak 388 mL dan pelarut *n*-heksan sebanyak 400 mL, kemudian dilakukan penggojogan selama ±15 menit hingga homogen lalu didiamkan hingga terbentuk 2 fase. Fase atas adalah fase *n*-heksan dan fase bawah adalah fase etanol-air. Kedua fase ditampung dalam wadah yang berbeda. Selanjutnya fase etanol-air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah lalu ditambah pelarut *n*-heksan. Penambahan pelarut *n*-heksan dihentikan ketika fase *n*-heksan sudah jernih, kemudian fase etanol-air diambil sebanyak 200 mL, lalu dilanjutkan proses fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut dietileter

sebanyak 200 mL. Pemisahan dilakukan hingga fase dietileter menjadi jernih. Fraksi *n*-heksan (FH) dan fraksi dietileter (FD) masing-masing diuapkan dengan penguap vakum putar pada suhu 40°C dengan kecepatan 60 rpm sehingga diperoleh fraksi *n*-heksan (FH) dan fraksi dietileter (FD) daun sirih hijau (Wijaya *et. al.*, 2018).

#### Pengujian Aktivitas Antibakteri

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dibiakkan terlebih dahulu pada media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil bakteri uji yang telah diremajakan sebelumnya dengan kawat ose secukupnya dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 *Mc Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/ mL (Cavalieri *et al.*, 2005). Suspensi bakteri uji sebanyak 1500  $\mu$ L dicampur dengan 10 mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi kemudian diambil sebanyak 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam media MHA 22,5 mL lalu digoyang-goyangkan supaya suspensi merata. Media MHA dituang ke dalam cawan petri lalu ditunggu hingga memadat.

Larutan stok dengan konsentrasi 2,5 mg/disk dibuat dengan ditimbang masing-masing fraksi (fraksi *n*-heksan dan fraksi dietil eter) sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan dengan DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) hingga 2 mL. Larutan uji 2 mg/disk, 1,5 mg/disk, 1 mg/disk, dan 0,5 mg/disk dari masing-masing fraksi dibuat dengan cara diambil sebanyak 0,32 mL; 0,24 mL; 0,16 mL; dan 0,08 mL dan ditambahkan DMSO absolut hingga 0,4 mL (Aslah *et. al.*, 2019). DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel uji sehingga DMSO ini digunakan sebagai kontrol negatif. Kontrol negatif ini bertujuan untuk mengetahui bahwa pelarut tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga zona hambat yang dihasilkan bukan karena pelarutnya tetapi karena zat ujinya. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol 30  $\mu$ g/disk (Aslah *et. al.*, 2019). Kontrol positif berfungsi sebagai validasi metode pengujian yang digunakan. Adanya aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh kontrol positif menandakan bahwa metode penelitian yang digunakan valid (Widyanigtias *et al.*, 2014). Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi kertas cakram.

Masing-masing kertas cakram ditetesi 10  $\mu$ L larutan uji (0,5 mg/disk, 1 mg/disk, 1,5 mg/disk, 2 mg/disk, dan 2,5 mg/disk,) kemudian ditempelkan di atas permukaan media MHA yang telah berisi bakteri uji. Kontrol positif berupa cakram kloramfenikol 30  $\mu$ g/disk langsung diaplikasikan ke media MHA yang telah berisi bakteri uji, sedangkan kontrol negatifnya dilakukan sama seperti aplikasi larutan uji. Setelah itu didiamkan selama kurang lebih 15–20 menit agar larutan uji berdifusi ke dalam media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Parameter adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram kemudian diamati, diukur, dan dihitung rata-rata Diameter Daerah Hambat (DDH) menggunakan jangka sorong.

#### Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan mengukur Diameter Daerah Hambat (DDH) dari zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan jangka sorong. Adanya zona hambat menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Zona hambat radikal bersifat bakterisid yaitu bakteri telah benar benar mati ditandai dengan zona yang jernih atau bening. Sedangkan zona hambat iradikal bersifat bakteristatik yaitu bakteri hanya dihambat saja sehingga pertumbuhannya masih bisa terjadi ditandai dengan zonanya terlihat keruh (tidak terlalu jernih/bening).

#### Hasil dan Pembahasan

##### Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Ekstrak etanol daun sirih hijau yang diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi 1 kg serbuk simplisia sebanyak 246 gram. Fraksi *n*-heksan daun sirih hijau yang diperoleh sebanyak 8 g, sedangkan fraksi dietileter daun sirih hijau yang diperoleh sebanyak 0,9 g.

##### Uji Aktivitas Antibakteri

Kemampuan suatu bahan antibakteri dalam meniadakan kehidupan bakteri tergantung pada konsentrasi bahan yang digunakan (Schlegel, 1994). Berdasarkan tabel I dan II, menunjukkan bahwa semua konsentrasi baik pada FH dan FD daun sirih hijau menghasilkan zona hambat. Terlihat pula semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, maka semakin besar zona hambat yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ajizah (2004), bahwa semakin besar konsentrasi suatu bahan antibakteri maka semakin besar pula aktivitas antibakterinya karena semakin banyak kandungan senyawa antibakteri yang terkandung dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Fahdi (2018) yang juga meneliti aktivitas antibakteri dengan menggunakan ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri

*Escherichia coli* dimana diameter daerah hambat (DDH) yang dihasilkan semakin besar diikuti semakin besarnya konsentrasi larutan uji yang digunakan. Namun, jika dilihat dari hasil zona hambat yang dihasilkan dengan menggunakan konsentrasi yang sama antara penelitian Fahdi (2018) dengan penelitian ini, hasil fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter daun sirih hijau lebih baik dibandingkan ekstrak etanol daun sirih hijau. Penelitian Fahdi (2018), ekstrak etanol daun sirih hijau konsentrasi 20% menghasilkan rata-rata DDH 7,15 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*, sedangkan fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter dengan konsentrasi 2 mg/disk (setara dengan 20%) masing-masing menghasilkan rata-rata DDH 12,11 mm dan 11,08 mm. Hal ini menunjukkan bahwa proses fraksinasi lebih baik dalam menghasilkan daya hambat dibandingkan dengan proses ekstraksi karena mampu memberikan diameter daerah hambat yang lebih besar.

**Tabel 1.** Diameter daerah hambat FH dan FD daun sirih hijau terhadap bakteri *E. coli*. Diameter kertas cakram 6 mm

Sampel	Konsentrasi (mg/disk)	Diameter daerah hambat (mm)				Tipe zona
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata±SD	
Fraksi n-heksan	0,5	11,00	11,00	10,68	10,89±0,18	Radikal
	1	12,00	11,10	11,00	11,37±0,55	Radikal
	1,5	12,40	12,00	11,30	11,90±0,56	Radikal
	2	12,70	12,12	11,50	12,11±0,60	Radikal
	2,5	13,54	12,20	12,00	12,58±0,64	Radikal
Kloramfenikol	0,03	21,00	21,08	20,00	20,69±0,60	Radikal
DMSO	-	-	-	-	-	-
Fraksi dietileter	0,5	6,70	6,40	6,42	6,51±0,17	Radikal
	1	9,50	9,42	9,22	9,38±0,14	Radikal
	1,5	10,00	10,10	10,00	10,03±0,05	Radikal
	2	11,10	11,14	11,00	11,08±0,07	Radikal
	2,5	12,00	12,40	11,26	11,89±0,58	Radikal
Kloramfenikol	0,03	20,00	20,00	19,00	19,67±0,58	Radikal
DMSO	-	-	-	-	-	-

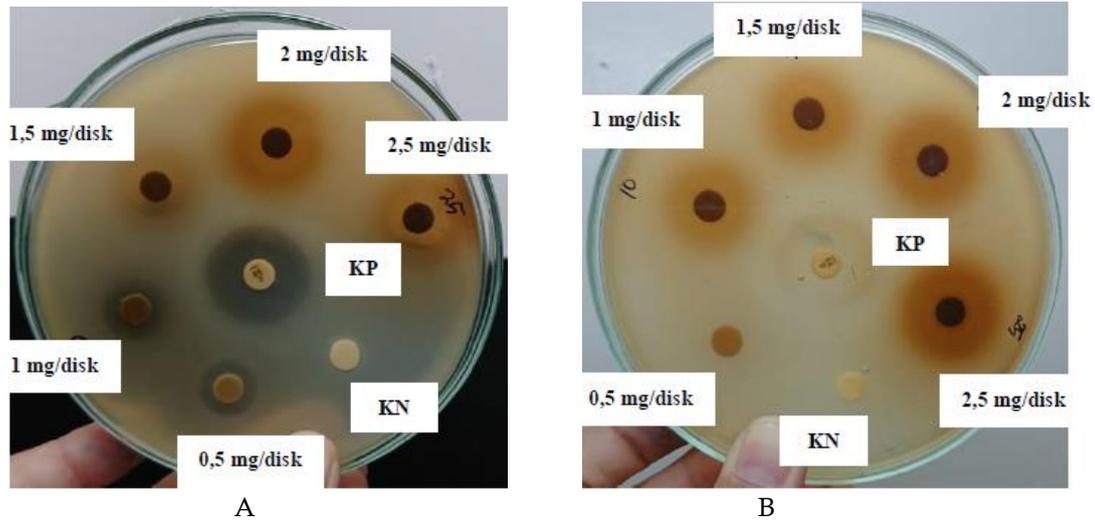
**Tabel 2.** Diameter daerah hambat FH dan FD daun sirih hijau terhadap bakteri *S. aureus*. Diameter kertas cakram 6 mm

Sampel	Konsentrasi (mg/disk)	Diameter daerah hambat (mm)				Tipe zona
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata±SD	
Fraksi n-heksan	0,5	7,25	7,12	7,48	7,28±0,18	Radikal
	1	9,42	8,00	8,00	8,47 ± 0,82	Radikal
	1,5	11,00	11,00	10,00	10,67±0,58	Radikal
	2	11,70	12,30	11,00	11,67±0,65	Radikal
	2,5	12,50	12,00	11,30	11,93±0,60	Radikal
Kloramfenikol	0,03	17,00	16,50	18,30	17,27±0,93	Radikal
DMSO	-	-	-	-	-	-
Fraksi dietileter	0,5	9,00	8,30	8,00	8,43±0,51	Radikal
	1	12,50	11,00	11,30	11,60±0,79	Radikal
	1,5	12,82	11,46	11,80	12,03±0,71	Radikal
	2	13,64	12,62	14,00	13,42±0,72	Radikal
	2,5	15,60	14,54	15,40	15,18±0,56	Radikal
Kloramfenikol	0,03	18,64	19,00	18,00	18,55±0,51	Radikal
DMSO	-	-	-	-	-	-

Penelitian yang dilakukan oleh Wijaya *et. al.* (2018) menunjukkan bahwa fraksi dietileter daun sirih hijau pada konsentrasi 750 mg/mL terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan menghasilkan zona hambat sebesar 9 mm, sedangkan pada penelitian ini, fraksi dietileter daun sirih hijau dengan konsentrasi 1 mg/disk (setara dengan 100 mg/mL) sudah mampu menghasilkan zona hambat sebesar 9,38 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi dietil eter lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* (Gram negatif) dibanding bakteri *P. acnes* (Gram positif). Hasil yang berbeda tersebut disebabkan karena adanya perbedaan komposisi dan struktur dinding sel dari masing-masing bakteri. Ekstrak etanol daun sirih hijau pada konsentrasi 50 µg/mL memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dengan nilai DDH sebesar  $8,9 \pm 0,21$  mm (Kaveti *et al.*, 2011). Jika diamati

dari hasil penelitian tersebut, maka ekstrak etanol daun sirih hijau lebih berpotensi dibandingkan FH dan FD daun sirih hijau. Namun pada penelitian tersebut ada perbedaan metode ekstraksi yang digunakan yaitu sokletasi sedangkan pada penelitian ini adalah maserasi. Hasil uji aktivitas antibakteri yang berbeda dengan penelitian sebelumnya dapat dikarenakan waktu panen daun sirih hijau yang berbeda, metode pengeringan daun yang berbeda (Wijaya *et al.*, 2018), metode ekstraksi dan metode purifikasinya. Hasil aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter daun sirih hijau terhadap bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Nilai DDH dan tipe zona hambat dari fraksi *n*-heksan dan fraksi dietil eter terhadap bakteri *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

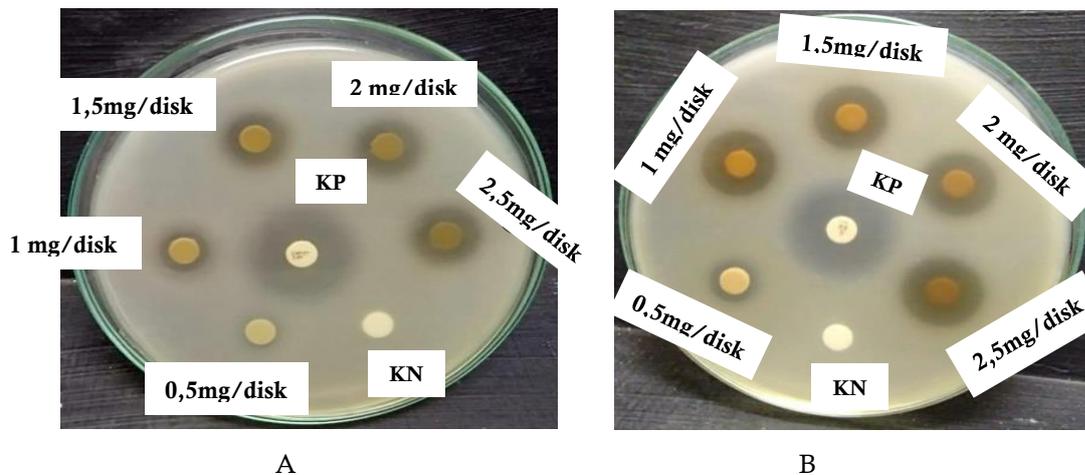


**Gambar 1.** Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan (A) dan fraksi dietileter (B) ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *E. coli*

Keterangan

KP = Kontrol Positif, KN= Kontrol Negatif

Penelitian Fahdi (2018), melaporkan ekstrak etanol daun sirih hijau terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 20% diperoleh nilai DDH sebesar 8 mm. Jika dibandingkan dengan penelitian ini dari fraksi *n*-heksan dan fraksi dietileter menggunakan konsentrasi yang sama yaitu 2 mg/disk setara dengan 20% diperoleh rata-rata nilai DDH sebesar 11,67 mm dan 13,42 mm. Hal ini menunjukkan bahwa dilakukan proses fraksinasi memberikan aktivitas antibakteri yang lebih besar dari pada ekstraknya.



**Gambar 2.** Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan (A) dan fraksi dietileter (B) ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *S. aureus*

#### Keterangan

KP = Kontrol Positif, KN= Kontrol Negatif

Penelitian Wijaya *et. al.* (2018), melaporkan hasil uji aktivitas antibakteri dari fraksi n-heksan dan fraksi dietileter daun sirih hijau menggunakan metode difusi cakram pada konsentrasi 750 mg/ml memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan nilai DDH masing-masing sebesar 8 mm dan 9 mm. Jika dibandingkan dengan penelitian ini dari hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan dan fraksi dietileter daun sirih hijau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 1 mg/ disk setara dengan 100 mg/ml sudah mampu memberikan aktivitas antibakteri dengan rata-rata nilai DDH masing-masing sebesar 8,47 mm dan 11,60 mm. Adanya perbedaan nilai DDH yang diperoleh terhadap bakteri *P. acnes* lebih kecil dibandingkan dengan terhadap bakteri *S. aureus*, dikarenakan terdapat profil pertahanannya yang berbeda, sehingga akan memperngaruhi aktivitas antibakterinya. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan dan fraksi dietil eter dapat dilihat pada Gambar 2.

#### Simpulan

Fraksi n-heksan daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan nilai DDH masing-masing sebesar 10,89–12,58 mm dan 7,28–11,93 mm; sedangkan fraksi dietileter daun sirih hijau sebesar 6,51–11,89 mm dan 8,43–15,18.

#### Daftar Referensi

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae* 1(1): 36.
- Aslah, A.P., Lolo, W.A., & Jayanto, I., 2019. Aktivitas Antibakteri dan Analisis KLT-Bioautografi dari Fraksi Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Pharmacon*. 8(2): 508–513.
- Bachir G. & Abouni B. 2015. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs: Escherichia coli and Staphylococcus aureus* most common source of infection. Editors: A. Méndez-Vilas.
- Cavaliere S.J., Harbeck R.J., McCarter Y S., Ortez J H., Rankin I.D, Sautter R.L, Sharp S.E., & Spiegel C.A. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society of Microbiology: 40.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986, *Sediaan Galenik*, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, 5–17.
- Fahdi F. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Public Community*. 11(1): 47–50.
- Frickmann, H. Hahn, A. Berlec, S. Ulrich J. Jansson M., Schwarz N.G., Warnke P. & Podbielski A. 2019. On the Etiological Relevance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in Superficial and Deep Infections – A Hypothesis-Forming, Retrospective Assessment, *European Journal of Microbiology and Immunology*, 9 (2019) 4: 124–130.
- Kavet B., Tan L., Sarnia, Kuan T.S., & Baig M., 2011, Antibacterial Activity Of *Piper Betel* Leaves. *International Journal of Pharmacy Teaching & Practices*. 2(3): 129-132.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Kesehatan. Jakarta. 531.
- Schlegel, H.G. 1994. *Mikrobiologi Edisi Keenam*. UGM Press, Yogyakarta.
- Suliantari, Jenie, B.S.L., Suhartono, M.T., & Apriyantono, A., 2008, Aktivitas Antibakteri Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri Patogen Pangan, *Jurnal Teknol dan Industri Pangan*, 19(1): 1 – 2.
- Widyaningtiyas, N.M.S.R., Yustiantara, P.S. & Paramita, N.L.P.V. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Terpurifikasi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Farmasi Udayana*. 3(1): 51 – 52.
- Wijaya, W.A. Paramita, N.L.P.V. & Susanti, N.M.P. 2018. Optimasi Metode Purifikasi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) yang Memiliki Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*, *Jurnal Kimia*, 12(1): 38 – 40.

Wirasuta, I M. A. G. & Parammita, N. L. P. V. 2016. Anti-acne Biomarker Identification of Essential Oil *Piper betle* L. Folium. *Asean Microbial Biotechnology Conference*.