

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle* L.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus epidermidis* DAN *Escherichia coli* SERTA UJI BIOAUTOGRAFINYA

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRACT OF GREEN BETEL LEAF (*Piper betle* L.) AGAINST *Staphylococcus epidermidis* AND *Escherichia coli* BACTERIA AND BIOAUTOGRAPHIC TESTS

Ahsana Nadia Zahra¹, Maryati^{1*}

¹Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail correspondence : maryati@ums.ac.id

Abstrak

Dikirim : 24 Agustus 2024 Disetujui : 27 Agustus 2024 Dipublikasikan : 31 Agustus 2024

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dimanfaatkan dan dipercaya sebagai bahan obat alternatif dalam mengobati berbagai jenis penyakit. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* serta mengidentifikasi golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dalam ekstrak etanol daun sirih hijau. Ekstraksi daun sirih hijau (*Piper betle* L.) menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi disk, identifikasi golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji bioautografi. Kadar ekstrak etanol yang digunakan adalah 2, 4, 6, dan 8 mg/disk. Kontrol positif menggunakan Erythromycin dan Ciprofloxacin serta pelarut DMSO 50% digunakan sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan seri konsentrasi 2 mg/disk, 4 mg/disk, 6 mg/disk, dan 8 mg/disk menghasilkan rata-rata zona hambat 9,5; 12; 15,12; dan 15,62 mm. Sedangkan hasil terhadap *Escherichia coli* dengan seri konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/disk menghasilkan rata-rata zona hambat 10,25; 15,12; 15,87; dan 16,25 mm. Uji KLT memberikan hasil bahwa daun sirih hijau mengandung golongan senyawa fenol, saponin dan alkaloid. Hasil uji bioautografi menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* adalah golongan senyawa fenol pada Rf 0,8 dan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* adalah golongan senyawa alkaloid pada Rf 0,7.

Kata Kunci: *Piper betle* L, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, Antibakteri

Abstract

Green betel leaf (*Piper betle* L.) is utilized and believed to be an alternative medicine in treating various types of diseases. This study aims to determine the antibacterial activity of green betel leaf ethanol extract against *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* bacteria and identify the group of compounds that have antibacterial activity in green betel leaf ethanol extract. Extraction of green betel leaf (*Piper betle* L.) using 96% ethanol solvent with maceration method. Antibacterial activity test was carried out by disk diffusion method, identification of compound groups that have antibacterial activity was carried out by bioautography test. The ethanol extract levels used were 2 mg/disk, 4 mg/disk, 6 mg/disk, and 8 mg/disk. Positive control used Erythromycin and Ciprofloxacin and 50% DMSO solvent was used as negative control. The results of this study indicate the presence of

antibacterial activity of green betel leaf ethanol extract against *Staphylococcus epidermidis* with a concentration series of 2 mg/disk, 4 mg/disk, 6 mg/disk, and 8 mg/disk producing an average inhibition zone of 9.5 mm; 12 mm; 15.12 mm; and 15.62 mm. While the results against *Escherichia coli* with a concentration series of 2 mg/disk, 4 mg/disk, 6 mg/disk, and 8 mg/disk produced an average inhibition zone of 10.25 mm; 15.12 mm; 15.87 mm; and 16.25 mm. The KLT test results show that green betel leaves contain phenol, saponin and alkaloid compound groups. Bioautography test results show that compounds that have antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* are phenol compounds at Rf 0.8 and compounds that have antibacterial activity against *Escherichia coli* are alkaloid compounds at Rf 0.7.

Keywords: *Piper betle* L., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, Antibacterial

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi bakteri pada kulit salah satunya disebabkan oleh peningkatan aktifitas Glandula sebacea ketika seseorang menginjak masa pubertas dan memproduksi sejumlah sebum melebihi kebutuhan kulit yang dapat memicu munculnya gangguan kulit yaitu acne vulgaris atau jerawat (Wasitaatmodjo, 2010). Penyumbatan pori-pori kulit dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada kantong nanah (Sifatullah & Zulkarnain, 2021). Bakteri lain pemicu terjadinya jerawat yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes* (Dermawan *et al.*, 2015).

Penggunaan antibiotik sebagai obat jerawat telah digunakan secara luas. Efek negatif konsumsi antibiotik yang tidak terkontrol dan berlebihan dalam jangka waktu lama menyebabkan mikroorganisme mejnadi resisten terhadap berbagai antibiotik (*multidrug-resistance*). Akibatnya pengobatan kurang efektif, kenaikan angka morbiditas dan mortalitas pasien, serta peningkatan biaya pengobatan (Pratiwi, 2017). Bahan alam sebagai obat tradisional semakin populer di Indonesia. Obat tradisional dianggap lebih murah dan ekonomis serta memiliki efek samping yang lebih kecil daripada obat kimia. Banyak orang beralih ke pengobatan tradisional yang berasal dari alam karena biaya pengobatan modern yang tinggi (Noventi & Carolia, 2016).

Daun sirih dengan nama ilmiah *Piper betle* memiliki banyak manfaat. Penelitian Nouri & Nafchi (2014) menyebutkan sirih hijau memiliki kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan mekanisme kerja melibatkan penghambatan sintesis dinding sel, mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma, serta menghambat sintesis protein dan asam nukleat (DNA/RNA) (Sinuraya *et al.*, 2019). Studi sebelumnya menunjukkan bahwa minyak dan ekstrak alkohol dari daun sirih berfungsi sebagai antiinsektisida, antijamur, dan antibakteri (Premachandra *et al.*, 2014). Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki peluang untuk dikembangkan sebagai bahan alam alternatif untuk mengobati jerawat. Ekstrak daun sirih hijau menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dibuktikan dengan pengujian metode difusi disk, yang menghasilkan diameter dari zona hambat 7,01; 8,92; 13,28; dan 21,08 mm (Hermanto *et al.*, 2023). Ekstrak daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, dengan zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 30% dan 60% masing-masing sebesar 7,78 mm dan 7,30 mm (Nabila *et al.*, 2020).

Kebaruan dari penelitian yang dilakukan adalah perbedaan seri konsentrasi ekstrak daun sirih hijau, kadar etanol, tempat pengambilan daun sirih hijau dan bahan penelitian yang digunakan. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, maka dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* serta dilakukan uji bioautografi untuk mengetahui senyawa terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu ilmu pengetahuan dan masyarakat dalam mengembangkan kembali penggunaan obat tradisional, khususnya daun sirih hijau sebagai antibakteri.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat gelas (Iwaki), mikropipet (Scorex), pipa kapiler, bejana KLT, Laminar Air Flow (CV. Srikandi Laboratory and Medical equipment), autoclave (Hirayama), vortex mixer (Thermolyne Maxi Mix II), waterbath (Mettler), rotary evaporator (IKA RV 10 Digital), Hot stir plate (Thermo Scientific Cimatec), shaking incubator (New Brunswick Scientific Excella E24), incubator (Mettler BE500).

Bahan

Daun sirih didapatkan dari tanaman milik warga di daerah Tuwak, Gonilan, Kartasura, Sukoharjo, bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UMS, media MHA (Medium Mueller Hinton), media BHI (Brain Heart Infusion), blank disk (Liofilchem), disk antibiotik (Oxoid), standar McFarland 0,5 Dimetilsulfoksida (DMSO), silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), kloroform, metanol, etil asetat, pereaksi semprot.

Persiapan dan Determinasi Daun Sirih Hijau

Determinasi tanaman daun sirih hijau dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Pembuatan Simplisia Daun Sirih Hijau

Daun sirih hijau dicuci menggunakan air mengalir, lalu ditiriskan. Kemudian dirajang atau dipotong kecil-kecil untuk memperkecil ukuran dan mempermudah proses pengeringan dalam almari pengering selama 2 hari pada suhu 50-60° C (Kursia *et al.*, 2016).

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Simplisia daun sirih dengan berat 250 g diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2500 mL. Proses maserasi dilakukan selama 3×24 jam dengan pengadukan setiap 1×24 jam dan remaserasi satu kali. Setelah itu, maserat disaring menggunakan kertas saring dan corong Buchner, kemudian dikonsentrasikan dengan rotary evaporator pada kecepatan 90 rpm dan suhu 60° C untuk memisahkan ekstrak dari pelarut. Selanjutnya, ekstrak dikonsentrasikan di atas penangas air (*waterbath*) hingga diperoleh ekstrak kental, yang kemudian digunakan untuk pengujian selanjutnya (Sakramentia *et al.*, 2019).

Hasil ekstraksi daun sirih hijau didapatkan suspensi gel berwarna coklat sebanyak 30,6 g yang selanjutnya akan digunakan pada uji aktivitas antibakteri. Hasil rendemen ekstrak etanol

daun sirih hijau didapatkan sebesar 12,27 %. Sedangkan untuk hasil rendemen fraksi air serta fraksi etil asetat berturut turut adalah 76 % dan 78,6 %.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan, dibungkus menggunakan kertas dan ditutup dengan aluminium foil berisikan kapas lalu dimasukkan ke dalam oven selama 2 jam pada suhu 170° C (Paputungan *et al.*, 2019).

Penyiapan Sampel

Stok sampel dibuat dengan menimbang sebanyak 5 g ekstrak kental yang kemudian akan dilarutkan dalam 5 mL DMSO. Selanjutnya dibuat pengenceran sampel 20 mg/disk, 40 mg/disk, 60 mg/disk dan 80 mg/disk dari stok sampel. DMSO 50% digunakan dalam melarutkan ekstrak kental sesuai dengan konsentrasi untuk pengujian (Handrianto, 2018).

Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mueller Hinton Agar (MHA). Media ini disiapkan dengan melarutkan 38 g serbuk MHA dalam 1000 mL aquades. Setelah larutan menjadi bening dan homogen dengan pemanasan di atas hot stir plate, dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 1,5 jam (Ayen *et al.*, 2017). Setelah dikeluarkan dari dalam autoclave, dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak ± 25 mL, ditunggu hingga mengeras, ditutup rapat, diberi label penandaan dan disimpan dalam almari pendingin. Sedangkan untuk media BHI (*Brain Heart Infusion*) sebanyak 37 g dilarutkan dalam 1000 mL aquades, diaduk dengan spatula sampai homogen, dituang ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak ± 5 mL dan dimasukkan ke dalam autoclave pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 1,5 jam untuk proses sterilisasi lalu disimpan dalam almari pendingin.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dari media biakan BHI, dengan cara menginokulasi bakteri biakan hasil streak plate dengan cara mengambil sejumlah koloni dengan ose bulat, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator shaker dengan kecepatan 2000 rpm selama 1×24 jam. Hasil dari pembuatan suspensi bakteri uji yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* yang telah diinokulasi, diambil 100 μ L kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi kosong, selanjutnya ditambahkan NaCl 0,9% sebagai larutan garam fisiologis hingga konsentrasi bakteri $0,5 \times 10^8$ CFU per mL dibandingkan dengan standar kekeruhan larutan McFarland 0,5 (Paputungan *et al.*, 2019).

Uji Sensitivitas Bakteri

Suspensi bakteri uji diambil sebanyak 200 μ L dan diratakan dengan spreader secara merata pada permukaan media MHA. Setelah mengering, disk antibiotik dimasukkan ke dalam cawan petri, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam dan diamati zona hambat yang terbentuk dalam cawan petri (Sakrumentia *et al.*, 2019).

Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri diambil 200 μ L dan diratakan dengan spreader pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) secara merata, ditunggu hingga mengering dan di masukkan *blank disk* yang sudah ditetesi dengan 10 μ L ekstrak daun sirih hijau dengan berbagai seri konsentrasi, 10 μ L DMSO sebagai kontrol negatif, disk Erythromycin dan Ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Orientasi dan replikasi dilakukan sebanyak 3x. Tiap cawan petri dilabeli dan

diberi keterangan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati zona hambat yang terbentuk dalam cawan petri (Sakramentia *et al.*, 2019).

Uji KLT- Bioautografi

Identifikasi kandungan kimia pada daun sirih hijau dilakukan menggunakan sistem KLT, dengan fase diam berupa silica gel 60 GF254 dan fase gerak berupa campuran Kloroform:Metanol (1:1). Plat silica gel GF254 dipotong dengan ukuran 1×7 cm dan kemudian diaktifkan dengan pemanasan di oven pada suhu 105°C selama 10 menit untuk menghilangkan kelembapan dari plat KLT (Made *et al.*, 2017).

Fase gerak dipersiapkan dan ditunggu hingga jenuh di dalam bejana. Ekstrak yang ditotolkan pada plat KLT terlebih dahulu difraksinasi cair-cair dengan air dan etil asetat. Sebanyak 5 g ekstrak dilarutkan dalam 20 mL aquades hangat, kemudian dipartisi dengan etil asetat 20 mL menggunakan corong pisah yang nantinya akan digunakan dalam penotolan.

Dalam penelitian ini digunakan metode bioautografi kontak, di mana kromatogram yang telah dielusi ditempatkan di atas permukaan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan 200 µL suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Kromatogram dibiarkan dalam cawan petri selama 30 menit, kemudian diangkat dari media dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil analisis senyawa antibakteri ditunjukkan dengan munculnya zona jernih pada area kromatogram, yang menandakan adanya zona hambat (Owu *et al.*, 2020).

Analisis Data

Data yang telah dikumpulkan dianalisis menggunakan Program SPSS versi 25 dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk menilai dampak konsentrasi ekstrak terhadap kemampuan hambat pertumbuhan bakteri uji. Jika ditemukan perbedaan, uji lanjut *Mann-Whitney* dilakukan untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antara setiap kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman Daun Sirih Hijau

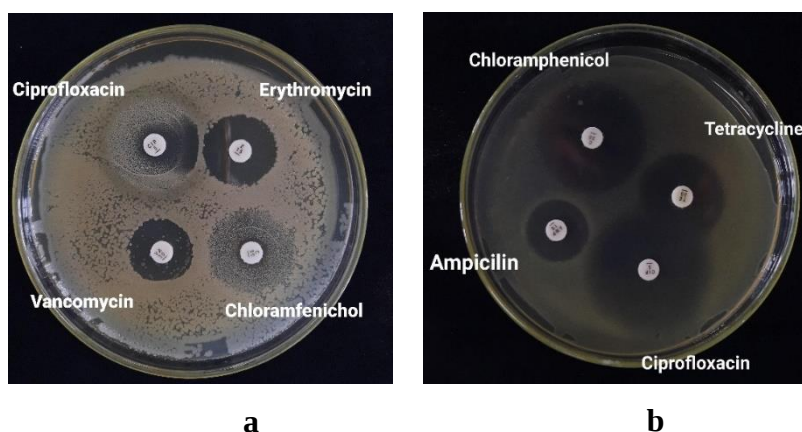
Determinasi telah dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Sebelas Maret Surakarta, dengan nomor surat 107/UN27.9.6.4/Lab/2023. Hasil kunci determinasi 1b-3b-11b-20b-21b-22b-23b menunjukkan sampel benar *Piper Betle* E.

Hasil Uji Sensitivitas Bakteri terhadap Antibiotik

Uji sensitivitas dilakukan untuk mengetahui sensitivitas bakteri uji terhadap antibiotik serta untuk mengetahui efektivitas suatu antibiotik dan menguji respons bakteri terhadap antibiotik. Hasil sensitivitas bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk, semakin besar diameter zona hambat, semakin terhambat pertumbuhan bakteri. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) telah menetapkan kelas kerentanan antimikroba yang berbeda berdasarkan hasil pengujian. Kategori tersebut meliputi resisten, intermediat, atau sensitif. Area disekeliling cakram disk yang tidak ditemukan pertumbuhan bakteri, disebut zona hambat.

Mikroba sensitif adalah mikroba yang sangat peka terhadap antibiotik. Intermediat terjadi ketika respons mikroba terhadap antibiotik menunjukkan adanya pergeseran dari keadaan sensitif menjadi sedikit kurang sensitif, tetapi belum mencapai tingkat resistensi penuh. Resistensi adalah saat mikroba sudah tidak peka atau kebal terhadap antibiotik (Artati *et al.*,

2016). Uji sensitivitas bakteri dilakukan menggunakan metode Kirby and Bauer dengan menempatkan empat jenis antibiotik pada setiap bakteri. Sensitivitas *Staphylococcus epidermidis* terlihat dari terbentuknya zona hambat disekitar disk antibiotik Vancomycin, Erythromycin dan Ciprofloxacin, namun tidak terbentuk zona hambat di sekitar Chloramphenicol. Sedangkan *Escherichia coli* dilihat dengan terbentuknya zona hambat di sekitar disk antibiotik Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Tetracycline, dan Ampicilin. Hasil uji sensitivitas dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Uji Sensitivitas Bakteri (a) *Staphylococcus epidermidis* dan (b) *Escherichia coli* terhadap Antibiotik

Tabel 1. Hasil Uji Sensitivitas Bakteri *Staphylococcus epidermidis* terhadap Antibiotik

Bakteri	Antibiotik	Standar Kepekaan Antibiotik (mm)			Hasil Uji	
		Sensitif	Intermediet	Resisten	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vancomycin	≥ 12	10-11	≤ 9	18	Sensitif
	Chloramphenicol	≥ 18	13-17	≤ 12	9	Resisten
	Erythromycin	≥ 23	14-22	≤ 13	20	Intermediet
	Ciprofloxacin	≥ 21	16-20	≤ 15	17	Intermediet

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020)

Tabel 2. Hasil Uji Sensitivitas Bakteri *Escherichia coli* terhadap Antibiotik

Bakteri	Antibiotik	Standar Kepekaan Antibiotik (mm)			Hasil Uji	
		Sensitif	Intermediet	Resisten	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan
<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacin	≥ 21	16-20	≤ 15	32,5	Sensitif
	Chloramphenicol	≥ 18	13-17	≤ 12	30	Sensitif
	Tetracycline	≥ 19	15-18	≤ 14	25	Sensitif
	Ampicillin	≥ 14	12-13	≤ 11	18	Sensitif

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020)

Berdasarkan hasil uji sensitivitas (Tabel 1&2) selanjutnya untuk uji aktivitas antibakteri digunakan kontrol positif Erythromycin dan Ciprofloxacin. Pada tahap ini, dalam menentukan dasar pemilihan antibiotik yang digunakan untuk kontrol positif. Jika terdapat antibiotik yang menghasilkan zona hambat terbesar, tetapi tidak sensitif maka dipilih antibiotik yang menghasilkan zona hambat lain meskipun tidak terbesar, tetapi sensitif. Sehingga pada *Staphylococcus epidermidis* seharusnya dipilih Vancomycin dengan diameter zona hambat 18 mm tetapi sensitif, bukan Erythromycin dengan diameter zona hambat 20 mm tetapi Intermediet. Hal ini dilakukan berdasarkan kepekaan dari antibiotik, bukan dari zona hambat yang dihasilkan.

Hasil Uji Aktivitas Bakteri terhadap Ekstrak

Uji dilakukan dengan menggunakan metode difusi disk (kertas cakram) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* masing-masing dengan konsentrasi 20 mg/disk, 40 mg/disk, 60 mg/disk dan 80 mg/disk. Pada penelitian ini kontrol positif digunakan Erythromycin dan Ciprofloxacin, dipilih karena kedua antibiotik tersebut memberikan hasil diameter zona hambat terbesar dengan kepekaan tinggi. Sedangkan kontrol negatif digunakan pelarut DMSO 50%. Dimetil sulfoksida (DMSO) dipilih untuk melarutkan ekstrak yang digunakan dalam pengujian karena merupakan pelarut ekstrak yang baik tanpa memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji (Katrin *et al.*, 2015). Kontrol negatif dibuat untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas pada pelarut.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau terhadap *Staphylococcus epidermidis*

Konsentrasi ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata (mm) ($\bar{x} \pm SD$)	Kategori zona hambat
	R1	R2	R3	R4		
20 mg/disk	10	10	8	10	9,5 $\pm$ 1,00	Sedang
40 mg/disk	12	13	10	13	12 $\pm$ 1,41	Kuat
60 mg/disk	15	15,5	14	16	15,12 $\pm$ 0,85	Kuat
80 mg/disk	16	16,5	14	16	15,62 $\pm$ 1,10	Kuat
DMSO	6	6	6	6	6 $\pm$ 0,00	Tidak ada
Erythromycin	16	15	11	17	14,75 $\pm$ 2,62	Kuat

Keterangan: Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm

Penelitian oleh Davis & Stout (1971) mengategorikan daya antibakteri berdasarkan diameter zona bening menjadi empat kriteria: sangat kuat (zona hambat $\geq$ 20 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), sedang (zona hambat 5-10 mm), dan lemah (zona hambat $<$ 5 mm). Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri uji, sama, yaitu sedang sampai kuat. Konsentrasi 20 mg/disk memiliki daya hambat sedang, sedangkan konsentrasi 40 mg/disk, 60 mg/disk, 80 mg/disk memiliki daya hambat kuat. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kadar konsentrasi mana yang paling aktif dan dapat menghambat pertumbuhan kedua bakteri dan pengujian dilakukan sebanyak 4 $\times$ pengulangan.

Tabel 3 menunjukkan bahwa diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus epidermidis* paling tinggi dan mendekati diameter zona hambat kontrol positif terdapat pada konsentrasi 80 mg/disk sebesar 15,62 mm dan terkecil yaitu konsentrasi 20 mg/disk sebesar 9,5 mm. Tabel 4 menunjukkan bahwa diameter zona hambat *Escherichia coli* tertinggi, yang mendekati

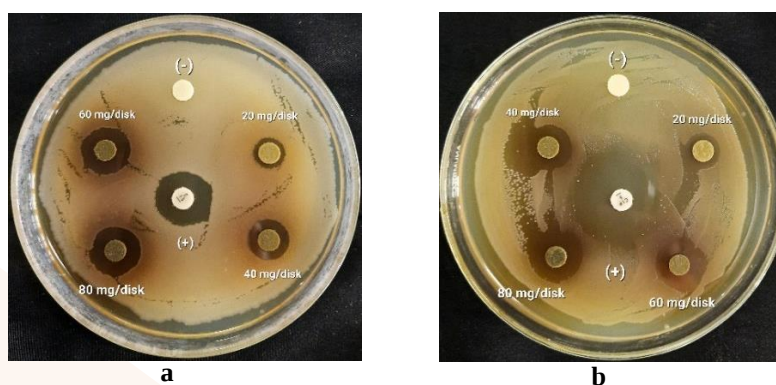
diameter zona hambat kontrol positif, terjadi pada konsentrasi 80 mg/disk dengan ukuran 16,25 mm, sedangkan yang terkecil ditemukan pada konsentrasi 20 mg/disk dengan ukuran 10,25 mm. Hasil ini membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirih hijau, semakin besar pula kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli*.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau terhadap *Escherichia coli*

Konsentrasi ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata (mm) ($\bar{x} \pm SD$)	Kategori zona hambat
	R1	R2	R3	R4		
20 mg/disk	11	10	10	10	10,25 $\pm$ 0,5	Sedang
40 mg/disk	17	15	14,5	14	15,12 $\pm$ 1,31	Kuat
60 mg/disk	16	16	16,5	15	15,87 $\pm$ 0,62	Kuat
80 mg/disk	15	16	17	17	16,25 $\pm$ 0,95	Kuat
DMSO	6	6	6	6	6 $\pm$ 0,00	Tidak ada
Ciprofloxacin	30	30	31	32,5	30,87 $\pm$ 1,81	Sangat kuat

Keterangan: Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm

Setelah pengukuran dilakukan, diperoleh diameter zona hambat untuk masing-masing konsentrasi serta kategorinya. Berdasarkan Tabel 3 dan Tabel 4, dapat dilihat bahwa pada konsentrasi terendah yaitu 20 mg/disk, pertumbuhan bakteri sudah dapat terhambat dengan rata-rata zona hambat sebesar 9,5 dan 10,25 mm untuk kedua bakteri uji. Konsentrasi 80 mg/disk terbukti sebagai konsentrasi ekstrak yang optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli*, karena menunjukkan zona hambat tertinggi.



Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau terhadap (a) *Staphylococcus epidermidis* dan (b) *Escherichia coli*

Peningkatan konsentrasi ekstrak menghasilkan diameter zona hambat yang semakin luas, yang menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri meningkat sejalan dengan peningkatan kadar ekstrak daun sirih. Diameter zona hambat dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk kecepatan difusi, sifat media agar yang digunakan, jumlah organisme yang diinokulasi, kecepatan pertumbuhan bakteri, konsentrasi bahan kimia, serta kondisi selama inkubasi (Rahmadeni *et al.*, 2019). Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil Uji KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat digunakan untuk menegaskan senyawa kimia yang terkandung pada tumbuhan. Nilai R_f dan warna noda yang diperoleh pada KLT dapat membantu mengidentifikasi senyawa yang terkandung. Penampak bercak dimaksudkan untuk mengidentifikasi senyawa dalam kromatogram dengan cara melihat perubahan warna yang terjadi, dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L)

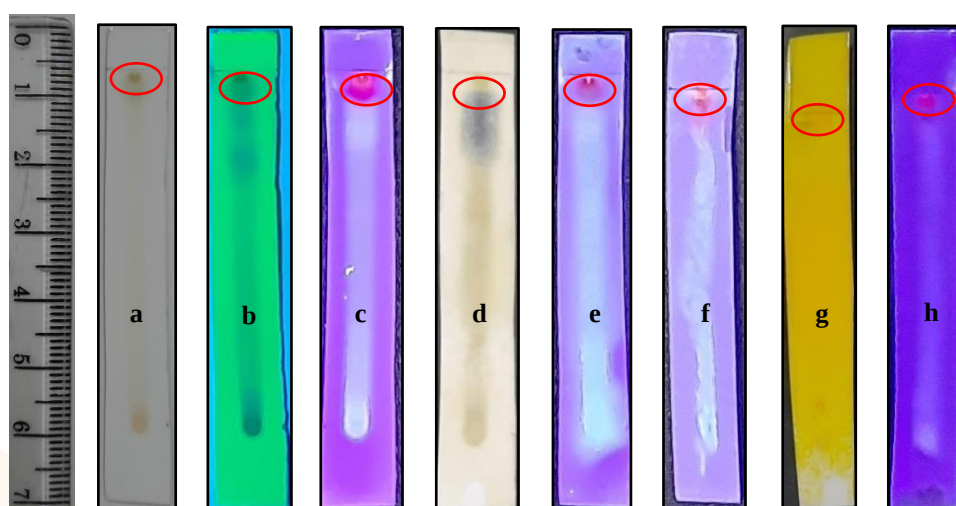
Pereaksi	Pengamatan			Senyawa Aktif	R_f	Hasil
	Sinar tampak	UV 254	UV 366			
Sebelum disemprot	-	-	-	-	0,76	-
$FeCl_3$	Bercak hitam-ungu tua	Fluoresensi biru	Fluoresensi biru	Tanin, fenolik	0,8	(+)
$AlCl_3$	Bercak kuning	Fluoresensi hijau	Fluoresensi biru	Flavonoid	0,84	(-)
Liebermann Burchard	Bercak coklat	Fluoresensi hijau	Fluoresensi biru	Saponin	0,84	(+)
Dragendorff	Bercak jingga	Fluoresensi hijau	Coklat	Alkaloid	0,76	(+)
Vanilin-Asam sulfat	Bercak coklat	Fluoresensi biru	Fluoresensi ungu	Terpenoid	0,84	(-)

Hasil uji KLT ekstrak etanol daun sirih hijau pada Tabel 5 menunjukkan bahwa dengan menggunakan pereaksi $FeCl_3$ menghasilkan warna hitam atau ungu tua bermakna positif mengandung senyawa golongan fenolik. Adapun penggunaan pereaksi $AlCl_3$ tidak membentuk noda berfluoresensi kuning pada lampu UV 366 nm bermakna negatif mengandung senyawa golongan flavonoid. Sedangkan pereaksi *Lieberman-Burchard* menunjukkan warna hijau berarti positif mengandung golongan senyawa saponin. Selanjutnya Pereaksi *dragendorff* memberikan warna jingga dengan latar belakang kuning yang bermakna positif mengandung alkaloid. Pereaksi vanillin-asam sulfat tidak menimbulkan warna hijau atau jingga bermakna negatif mengandung senyawa golongan terpenoid. Nilai R_f yang ideal berkisar antara 0,2 hingga 0,8. Jika nilai R_f berada di luar rentang tersebut, visualisasi bercak yang dihasilkan dari pelarut dapat terganggu. Selain itu, penotolan yang terlalu besar dapat mengurangi resolusi, dan penotolan yang tidak tepat dapat menyebabkan bercak menyebar dan menghasilkan noda yang saling tumpang tindih (tailing), yang pada akhirnya dapat mengganggu hasil analisis (Fikamilia & Mita, 2020). Tidak ditemukan senyawa flavonoid pada daun sirih kemungkinan karena adanya *human error* pada prosedur pelaksanaan. Kegagalan dalam penjenjuran bejana akan menghasilkan pemisahan yang buruk dan hasil yang tidak reproduisibel.

Menurut Harborne (1987), deteksi senyawa fenol dengan menambahkan $FeCl_3$ sebagai penampak bercak dapat menghasilkan warna yang kuat, seperti hijau, merah, coklat, ungu, biru, atau hitam. Deteksi flavonoid dapat menyebabkan peredaman fluoresensi pada sinar UV 254 dan menampilkan fluoresensi berwarna kuning, hijau, atau biru. Intensitas atau warna fluoresensi ini dapat meningkat atau berubah dengan penambahan penampak bercak (Wagner & Bladt, 1996). Setelah dilakukan prosedur KLT diketahui bahwa daun sirih hijau memiliki beberapa kandungan senyawa aktif metabolit sekunder seperti fenolik, saponin dan alkaloid. Hal ini didukung oleh penelitian Alydrus & Khofifah (2022) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol 96% daun sirih hijau mengandung senyawa fenolik dan turunannya dan memiliki

aktivitas antibakteri. Pada penelitian Azahar *et al.*, (2020) senyawa fenolik yang dimaksud dalam daun sirih adalah kavicol, hidroksichavicol, kavibetol, kavibetol asetat dan eugenol. Beberapa penelitian yang lain juga melaporkan bahwa daun sirih hijau terkandung senyawa bioaktif seperti 4-allyl resorcinol, kavibetol, dan hidroksi-kavicol (Rahmah *et al.*, 2023). Efek antibakteri dari tanaman sirih hijau disebabkan oleh kandungan minyak atsiri pada daun sirih hijau, yang terdiri dari komponen utama fenolik serta beberapa turunannya, seperti eugenol dan kavicol (Ali *et al.*, 2018).

Kandungan minyak atsiri dalam daun sirih dapat memberikan aroma khas daun sirih dan memiliki sifat antibakteri yang sangat kuat (Widiyastuti *et al.*, 2016). Minyak atsiri bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat pembentukan membran atau dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan atau pembentukan dinding sel yang tidak sempurna. Komponen aktif seperti gugus hidroksil (-OH) dan karbonil pada minyak atsiri berperan dalam sifat antibakterinya, berinteraksi dengan sel bakteri melalui adsorpsi dan membentuk kompleks dengan protein, yang pada kadar rendah dapat menyebabkan denaturasi protein dan pada kadar tinggi dapat mengakibatkan koagulasi protein dan lisis sel membrane (Rachmawaty *et al.*, 2016).



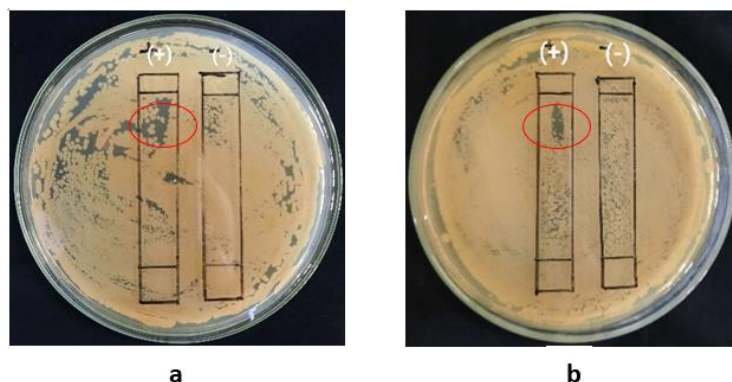
Gambar 3. Hasil KLT Kloroform: Metanol (1:1) Fraksi Air Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L), (a) Hasil elusi KLT pada sinar tampak sebelum disemprot, (b) Hasil elusi KLT pada sinar UV 254 nm sebelum disemprot, (c) Hasil elusi KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot, (d) Hasil semprot reagen FeCl_3 pada sinar tampak, (e) Hasil semprot reagen AlCl_3 pada UV 366 nm, (f) Hasil semprot reagen Liebermann-Burchard pada UV 366 nm, (g) Hasil semprot reagen Dragendorff pada sinar tampak, (h) Hasil semprot reagen Vanilin-Asam sulfat pada UV 366 nm. Keterangan : Lingkaran merah adalah bercak utama yang muncul.

Pada penelitian ini perbandingan fase gerak yang terlalu polar akan mengakibatkan bercak kromatogram terlalu jauh terelusi, tidak dapat terbaca dan tidak dapat teridentifikasi secara baik sehingga menghasilkan nilai R_f mendekati 1. Penggunaan fase gerak Kloroform: Metanol (1:1) dinilai kurang efektif dalam pemisahan. Hal ini juga berkaitan dengan pemilihan fase diam polar seperti silica gel, polaritas suatu fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang nantinya akan berdampak pada perolehan nilai R_f . Berdasarkan identifikasi minyak atsiri tanaman daun sirih hijau positif mengandung minyak atsiri ditunjukkan dengan

nilai R_f 0,55 dengan R_f pembanding eugenol yaitu 0,61. Profil *fingerprint* senyawa golongan fenol ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn.) ditunjukkan pada R_f 0,19; 0,42; dan 0,62 (Susanti *et al.*, 2017). Senyawa fenolik dan tanin juga ditemukan dari ekstrak etanol daun *Piper betle* L. Senyawa fenol diuji dengan metode ekstraksi refluks (metode dengan bantuan pemanasan) yang dianalisis menggunakan instrumen Kromatografi lapis tipis (KLT) mendapatkan hasil identifikasi dengan pereaksi warna menunjukkan terdapat tiga spot yang positif senyawa golongan fenolik, teridentifikasi disekitar R_f 0.19; 0.42; dan 0.62 (Ningrum, 2023).

Hasil Uji Bioautografi

Penentuan jenis senyawa antibakteri dilakukan dengan mengamati nilai R_f dan perubahan warna yang muncul setelah penyempotan, serta membandingkan zona bening yang terbentuk pada media agar (Rahminiwati *et al.*, 2023). Hasil R_f zona hambat yaitu 0,8 pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri adalah golongan senyawa fenol (Gambar 4). Sedangkan 0,7 pada bakteri *Escherichia coli* dengan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri adalah golongan senyawa alkaloid. Hal ini disebabkan oleh warna yang muncul pada reaksi ekstrak, yang mengindikasikan adanya senyawa fenolik dan alkaloid. Senyawa dengan aktivitas antibakteri pada titik penotolan diperkirakan termasuk golongan fenolik dan menunjukkan warna hitam-ungu tua saat diuji dengan $FeCl_3$. Sedangkan alkaloid menunjukkan warna jingga setelah disemprot dengan Dragendorff.



Gambar 4. Hasil Bioautografi Fase Gerak Kloroform: Metanol (2:2) Fraksi Daun Sirih Hijau, (a) *Staphylococcus epidermidis* dan (b) *Escherichia coli*. Lingkaran merah adalah zona hambat.

Analisis Data

Data penelitian yang didapatkan selanjutnya dianalisis dengan uji statistik berupa uji *Kruskal-Wallis*. Sebelum dilakukan uji tersebut, maka harus dilakukan uji normalitas untuk memastikan data berdistribusi normal atau tidak serta uji homogenitas untuk mengetahui varians yang serupa atau tidak. Uji *Kruskal Wallis* merupakan uji non-parametrik yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji *one way ANOVA* jika asumsi kenormalan tidak terpenuhi. Hasil uji normalitas dengan nilai p untuk *Staphylococcus epidermidis* adalah 0,000 dan *Escherichia coli* 0,012. Hasil uji menyatakan bahwa nilai ($p < 0,05$) yang berarti kedua data tersebut tidak terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji homogenitas diperoleh nilai p untuk *Staphylococcus epidermidis* 0,077 sedangkan *Escherichia coli* 0,082. Hasil uji menunjukkan

nilai ($p > 0,05$), yang mengindikasikan bahwa data penelitian ini bersifat homogen. Berdasarkan hasil uji normalitas dan uji homogenitas, data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen. Pengujian selanjutnya menggunakan Uji *Kruskal-Wallis* dilakukan untuk mengevaluasi perbedaan rata-rata zona hambat antar perlakuan. Berdasarkan hasil uji *Kruskal-Wallis* nilai p untuk *Staphylococcus epidermidis* 0,002 sedangkan *Eschericia coli* 0,001. Hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan rata-rata zona hambat dengan konsentrasi ekstrak ($p < 0,05$). Untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan nyata, maka dilanjutkan Uji *Man-whitney U* (Tabel 6 dan Tabel 7).

Tabel 6. Uji Man-Whitney U Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Kelompok	2 mg/disk	4 mg/disk	6 mg/disk	8 mg/disk	Kontrol negatif (DMSO)	Kontrol positif (Erythromycin)
2 mg/disk	-	0,044*	0,018*	0,017*	0,011*	0,018*
4 mg/disk	-	-	0,020*	0,019*	0,013*	0,146
6 mg/disk	-	-	-	0,297	0,014*	0,770
8 mg/disk	-	-	-	-	0,013*	0,767
Kontrol negatif (DMSO)	-	-	-	-	-	0,014*
Kontrol positif (Erythromycin)	-	-	-	-	-	-

*Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok uji ($p < 0,05$)

Tabel 7. Uji Man-Whitney U Bakteri *Eschericia coli*

Kelompok	2 mg/disk	4 mg/disk	6 mg/disk	8 mg/disk	Kontrol negatif (DMSO)	Kontrol positif (Ciprofloxacin)
2 mg/disk	-	0,018*	0,017*	0,017 *	0,011*	0,017*
4 mg/disk	-	-	0,306	0,180	0,014*	0,020*
6 mg/disk	-	-	-	0,454	0,013*	0,019*
8 mg/disk	-	-	-	-	0,013*	0,019*
Kontrol negatif (DMSO)	-	-	-	-	-	0,013*
Kontrol positif (Ciprofloxacin)	-	-	-	-	-	-

*Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok uji ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil uji *Man Whitney U Staphylococcus epidermidis* menunjukkan ($p < 0,05$) yang berarti data tersebut signifikan atau memiliki perbedaan yang bermakna dengan konsentrasi lain. Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa diameter zona hambat *Staphylococcus epidermidis* dengan konsentrasi 2 mg/disk memiliki perbedaan yang bermakna dengan konsentrasi 4 mg/disk, 6 mg/disk, 8 mg/disk, kontrol negatif dan kontrol positif. Sedangkan konsentrasi 4 mg/disk memiliki perbedaan bermakna dengan konsentrasi 6 mg/disk, 8 mg/disk, dan kontrol negatif namun tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol positif. Selanjutnya konsentrasi 6 mg/disk tidak terdapat perbedaan bermakna dengan konsentrasi 8 mg/disk dan kontrol positif namun memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol negatif. Adapun konsentrasi 8 mg/disk memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol

negatif tetapi tidak memiliki perbedaan bermakna pada kontrol positif dan terakhir kontrol negatif memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol positif.

Hasil uji *Mann-Whitney* untuk bakteri *Escherichia coli* (Tabel 7) menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada konsentrasi 2 mg/disk memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan konsentrasi 4 mg/disk, 6 mg/disk, 8 mg/disk, serta semua kontrol. Konsentrasi 4 mg/disk tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan konsentrasi 6 mg/disk dan 8 mg/disk, tetapi memiliki perbedaan signifikan dengan semua kontrol. Selain itu, konsentrasi 6 mg/disk tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan konsentrasi 8 mg/disk, namun memiliki perbedaan signifikan dengan semua kontrol. Adapun konsentrasi 8 mg/disk memiliki perbedaan yang bermakna dengan semua kontrol dan terakhir kontrol negatif memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol positif. Diameter zona hambat *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* menunjukkan bahwa kontrol negatif kedua bakteri tersebut memperlihatkan hasil yang sama yaitu memiliki perbedaan yang bermakna terhadap kontrol positif dan berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih hijau, yaitu 2 mg/disk, 4 mg/disk, 6 mg/disk, dan 8 mg/disk (Tabel 3 dan Tabel 4).

DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk. DMSO (Dimetil sulfoksida) adalah suatu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa non polar maupun polar. DMSO tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Amalia *et al.*, 2016). Kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kontrol positif dan berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih hijau. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik Erythromycin dan Ciprofloxacin karena kedua antibiotik tersebut memberikan hasil diameter zona hambat terbesar dengan interpretasi intermediat dan sensitif berdasarkan standar CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Penemuan ini mendukung hipotesis penelitian bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli*.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sirih hijau positif mengandung tanin, fenolik, saponin, dan alkaloid. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* dapat dihambat ekstrak etanol daun sirih hijau dengan konsentrasi 80 mg/disk dengan rata-rata 15,62 mm pada *Staphylococcus epidermidis* dan 16,25 mm pada *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi disk.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali A., Chong C.H., Mah S.H., Abdullah L.C., Choong T.S.Y. dan Chua B.L., 2018, Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried piper betle extracts, *Molecules*, 23 (2), 1–15.
- Alydrus N.L. dan Khofifah N., 2022, Efektifitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper Betle L) Terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Inhealth : Indonesian Health Journal*, 1 (1), 56–61.
- Ayen R.Y., Rahmawati dan Mukarlina, 2017, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* H . B . K) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* IHB B 379 dan *Shigella flexneri*, *Protobiont*, 6 (3), 123–129.

- Azahar N.I., Mokhtar N.M. dan Arifin M.A., 2020, *Piper betle*: a review on its bioactive compounds, pharmacological properties, and extraction process, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991 (1)
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Edition. CLSI supplement M100.*, 30th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Depkes R., 2020, *Farmakope Indonesia Edisi VI 2020*, 6 ed., Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Fikamilia H. dan Mita S.R., 2020, Identifikasi Bahan Kimia Obat dalam Obat Tradisional Stamina Pria dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis, *Farmaka*, 18 (2), 16–25. Terdapat di: <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/25955>.
- Handrianto P., 2018, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Jamur Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Journal of Pharmacy and Science*, 3 (1), 47–49.
- Harborne J.B., 1987, *Phytochemical Methods A guide to modern techniques of plant analysis* Third edition, Third Edit., Chapman & Hall, University of Reading, UK.
- Hermanto L.O., Nibenia J., Sharon K. dan Rosa D., 2023, Review Artikel : Pemanfaatan Tanaman Sirih (*Piper betle* L.) Sebagai Obat Tradisional , *PHRASE (Pharmaceutical Science) Journal*, 3 (1), 33–42. Terdapat di: <http://openjournal.wdh.ac.id/index.php/Phrase/index>.
- Kursia S., Lebang J.S., Taebe B., Burhan A., R Rahim W.O., Tinggi Ilmu Farmasi Makassar S., Selatan S. dan Farmasi Kebangsaan Makassar A., 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 3 (2), 72–77. Terdapat di: <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/article/view/8643>.
- Made N., Susanti P., Putu L., Kusuma M. dan Manurung H.S., 2017, Identifikasi Senyawa Golongan Fenol dari Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) dengan Metode KLT-Spektrofotodensitometri, *Journal of Biological Sciences*, IV (1), 108–113. Terdapat di: <http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa%0AIDENTIFIKASI>.
- Nabila A.A., Aisyah R., Sutrisna E.M. dan Dewi L.M., 2020, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Farmasi*, 344–359.
- Ningrum Y.E.M., 2023, Literature review : Efektivitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Sebagai Alternatif Alami Antibakteri. Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, *Skripsi*, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nouri L. dan Nafchi A.M., 2014, Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract, *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 254–259. Terdapat di: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.044>.
- Noventi W.R.-4272-2-P. pdfa. dan Carolia N., 2016, Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L .) sebagai Alternatif Terapi Acne vulgaris The Potential of Green Sirih Leaf (*Piper betle* L .) for Alternative Therapy Acne vulgaris, *Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Lampung*, Vol. 5 (1), Hal. 140.
- Owu N.M., Fatimawali dan Jayanti M., 2020, Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle* L .) Terhadap Bakteri Streptococcus mutans , 12 (28), 145–152.

- Paputungan W.A., Lolo W.A. dan Siampa J.P., 2019a, Aktivitas Antibakteri dan Analisis KLT-Bioautografi dari fraksi Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A), *Froehner* , 8, 516–524.
- Pratiwi R.H., 2017, Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik, *Jurnal Pro-Life*, 4 (3), 418–429.
- Premachandra D., Mampitiyarachchi H. dan Ebssa L., 2014, Nemato-toxic potential of Betel (*Piper betle* L.) (*Piperaceae*) leaf, *Crop Protection*, 65, 1–5. Terdapat di: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.004>.
- Rachmawaty F.J., Mahardina D.A.C., Nirwani B., Nurmasitoh T. dan Bowo E.T., 2016, Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Gram Positif dan Gram Negatif, *JKKI – Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 12–20. Terdapat di: <https://journal.uui.ac.id/JKKI/article/view/543>.
- Rahmadeni Y., Febria F.A. dan Bakhtiar A., 2019, Potensi Pakih Sipasan (*Blechnum orientale*) sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* dan Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 6 (2), 224.
- Rahmah N.L., Mustapa Kamal S.M., Sulaiman A., Taip F.S. dan Siajam S.I., 2023, Subcritical water extraction of total phenolic compounds from *Piper betle* L. leaves: effect of process conditions and characterization, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17 (6), 5606–5618. Terdapat di: <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02068-3>.
- Rahminiwati M., Supardi A.R. dan Siti Mahyuni, 2023, Sinergisme aktivitas antibakteri ekstrak biji bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan bioautografi, *Current Biomedicine*, 2 (1), 1–12.
- Sakramentia L.B., Nurul dan Fajar, 2019, Uji Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Madu terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*, *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 10, 16–21.
- Sifatullah N. dan Zulkarnain, 2021, Jerawat (Acne vulgaris): Review Penyakit Infeksi Pada Kulit, *Prosiding Biologi Achieving the Sustainable Development Goals*, (November), 19–23. Terdapat di: <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb>.
- Sinuraya T.S.D., Yiswaty D. dan Nursyirwani, 2019, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sinularia* sp . Terhadap Bakteri Patogen (*Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , dan *Pseudomonas aeruginosa*), *Skripsi*, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Pekanbaru.
- Susanti N.M.P., Dewi L.P.M.K., Manurung H.S. dan Wirasuta I.M.A.G., 2017, Identification Of Phenol Compound In Green Piper betle Leaf Ethanol Extract By The TLC-Spectrophotodensitometry, *Jurnal Metamorfosa*, 4 (1), 108–113.
- Wagner H. dan Bladt S., 1996, *Plant Drug Analysis* , A Thin Layer Chromatography Atlas Second edition, second., *Springer*, Germany.
- Wasitaatmodjo S., 2010, *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*, 7 ed. Menaldi, S. L. S. et al., ed., Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.