

Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.)

Antimicrobial Activity of the Extract and Fraction of Red Betel Leaf (Piper betle Linn.)

Julia Reveny
Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara

ABSTRACT

Antimicrobial activity of ethanolic extract of red betel leaf (*Piper betle* Linn.), n-hexane fraction and ethyl acetate against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* had been carried out. Red betel leaf powder was extracted with 80% ethanol, followed fractionate with n-hexane and ethylacetate. The result was tested *in vitro* with agar diffusion method using a steel cylinder. Phytochemical screening test was performed to betel leaf powder, while the extract and each fraction were tested with antimicrobial activity *in vitro*. The thin layer chromatography (TLC) was performed with stationary phase silica gel GF 254 and moving phase of n-hexane: ethyl acetate (8:2), (7:3), (6:4), (5:5) toluene: ethyl acetate (6:4), chloroform: methanol (7:3). Phytochemical screening result indicated the presence of glycosides, triterpenoids/steroids, flavonoids, tannins and anthraquinon. Both of 80% ethanol extract and fractions of red betel leaf (*Piper betle* Linn.) have antimicrobial activity with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethanol extract 80% against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* are 2.5%, 2.5%, 10%. The n-hexane fractions were 20%, 15%, 10% and the ethyl acetate fractions are 2.5%, 1%, 2.5%, while the water fraction did not show any antimicrobial effects. The ethanol extract indicated a higher inhibitory effect in *Escherichia coli*, while the ethyl acetate fraction showed a higher effect on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The TLC results showed the presence of terpenoids/steroids, flavonoids, and tannins in ethanol extract, tannin and flavonoid in ethyl acetate, terpenoid/steroids in n-hexane fraction.

Keywords: Antimicrobial activity, extract, fraction, red betel leaf (*Piper betle* Linn)

PENDAHULUAN

Tumbuhan obat merupakan sumber bahan obat tradisional yang banyak digunakan secara turun-temurun. Salah satu di antaranya adalah sirih, dikenal dengan sirih hijau, sirih merah, sirih hitam, sirih kuning dan sirih perak (Depkes 1980).

Tumbuhan sirih merah ada bermacam-macam, pada penelitian digunakan tumbuhan sirih berbatang merah berdaun hijau (*Piper betle* Linn), termasuk familia Piperaceae. Tumbuhan memiliki kemampuan sebagai antiseptik, antioksidan dan fungisida, juga memiliki sifat menahan pendarahan, penyembuh luka pada kulit, obat saluran cerna dan dapat menguatkan gigi. Sirih merah tumbuh subur di daerah Sumatera Utara, dahulu digunakan untuk upacara adat suku Karo (Depkes 1980).

Secara umum daun sirih mengandung minyak atsiri sampai 4,2% (Kartasapoetra, 1992), senyawa fenil propanoid, dan tanin (Depkes 1989, Mahendra 2005). Senyawa ini bersifat antimikroba dan antijamur yang kuat

dan dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri antara lain *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, dan dapat mematikan *Candida albicans* (Agusta 2000, Hariana 2007)

Daun tanaman sirih dalam pengobatan modern sering dipergunakan sebagai adstrigensia, diuretika dan antiinflamasi, sebagai bahan obat umumnya digunakan dalam bentuk infusa dengan dosis 6% sampai 15% (Kartasapoerta 1992, Moeljanto & Mulyono 2003, Syukur & Hermani 2002). Metode fraksinasi digunakan untuk mendapatkan senyawa-senyawa flavonoid, tannin yang aktif sebagai antimikroba dari ekstrak etanol menggunakan pelarut polar (etilasetat) (Harborne 1987).

Berdasarkan hal di atas dilakukan penelitian mengenai nilai kadar hambat minimum (KHM) secara *in vitro* dengan metode difusi agar. Analisis kandungan kimia dilakukan dengan cara skrining fitokimia dan cara kromatografi lapisan tipis (KLT) menggunakan fase diam plat pra lapis silika gel F 254 dengan fase gerak n-heksan-etilasetat, kloroform-metanol,

toluene-etilasetat dan penampak noda Lieberman-Burchard (LB) untuk senyawa terpenoid/steroid, FeCl_3 untuk senyawa flavonoid dan tanin (Bisset 1994, Harborne 1987, Wagner *et al.* 1984)

Penelitian bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba tumbuhan sirih merah (*Piper betle* Linn.) dari ekstrak etanol fraksi n-heksan dan etilasetat, terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*, pengujian nilai KHM, dan analisis kandungan kimia kromatografi lapisan tipis (KLT) untuk mengetahui golongan senyawa yang diduga mempunyai sifat antimikroba.

METODE

Persiapan sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara purposif, tanpa membandingkan tumbuhannya dengan tumbuhan daerah lain. Sampel yang digunakan daun sirih segar (*Piper betle* Linn.) diperoleh dari daerah Pancur Batu kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara, Medan. Daun sirih segar dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air sampai bersih, dipotong-potong, ditiriskan, dikeringkan, kemudian sampel diblender sampai menjadi serbuk.

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah

Serbuk simplisia dimaserasi dengan etanol 80%, dibiarkan pada suhu kamar ($28^{\circ}\text{--}32^{\circ}\text{C}$) selama 2 hari terlindung dari cahaya dan sering diaduk, kemudian dipisahkan, ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 80% dan dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas sampai diperoleh maserat jernih. Semua maserat diuapkan dengan bantuan alat *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak etanol kental, kemudian ekstrak dikeringkan di *freeze dryer* (-40°C) hingga diperoleh ekstrak kering daun sirih merah.

Pembuatan fraksi n-Heksana, etilasetat dan fraksi air

Ekstrak etanol ditambahkan sedikit pelarut etanol 80%, diaduk sampai larut ditambahkan akuades, kemudian n-heksan, dikocok dan dibiarkan sampai memisah. Fraksi n-heksan dipisahkan, selanjutnya difraksinasi kembali dengan pelarut n-heksan beberapa kali hingga diperoleh fraksi n-heksan yang jernih (tidak memberikan hasil positif dengan pereaksi Lieberman-Burchard), kemudian terhadap sisa ditambahkan pelarut etilasetat (prosedur sesuai dengan fraksinasi n-heksan) sampai diperoleh fraksi etilasetat yang jernih (tidak memberikan hasil positif dengan pereaksi FeCl_3), sisanya diperoleh fraksi air. Fraksi n-heksan, etilasetat, dan fraksi air masing-masing digabung menjadi satu selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* kemudian di *freeze dryer*

(-40°C) hingga diperoleh ekstrak kering fraksi n-heksan, etilasetat dan fraksi air.

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia serbuk daun sirih merah (*Piper betle* Linn.) meliputi pemeriksaan senyawa golongan alkaloida, glikosida (Depkes 1978), steroid/triterpenoid (Harborne 1987), flavonoid (Farnsworth 1996), saponin, tanin dan glikosida antraknon (Depkes 1978). Uji daya hambat Ekstrak dan Fraksi daun Sirih merah

Persiapan mikroorganisme

Pembuatan suspensi standar McFarland (Power & Peggy 1988), apabila kekeruhan hasil suspensi bakteri sama dengan kekeruhan suspensi standar berarti konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml. Kemudian dilakukan pembiakan bakteri dan jamur dengan melakukan pembuatan stok kultur dan persiapan inokulum dari bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans* (Depkes 1995).

Pengujian efek antimikroba secara *in vitro*

Media agar steril dicairkan dan ditunggu hingga suhu mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$, kemudian suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml yang telah diukur kekeruhannya dimasukkan kedalam cawan petri steril, dikocok campuran dan dibiarkan sampai memadat. Pencadangan silinder baja tahan karat diletakkan tegak lurus dengan ketinggian ± 1 cm pada media padat tersebut, lalu pada masing-masing petri dimasukkan konsentrasi 0,1 ml ekstrak kedalam pencadang dengan berbagai variasi konsentrasi. Inkubasi pada suhu $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam untuk bakteri, dan $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 24 - 48 jam untuk jamur (Case 1984, Lay & Sugyo 1992). Penentuan daya hambat dilakukan dengan cara mengukur diameter daerah jernih (*hallo*) disekeliling pencadang menggunakan jangka sorong (Wattimena 1987).

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak etanol, fraksi n-Heksana dan fraksi etilasetat

Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, dan etilasetat dilakukan analisis dengan KLT menggunakan plat pra lapis silika gel F_{254} , dengan fase gerak n-heksan-etilasetat dengan perbandingan: (8:2), (7:3), (6:4), (5:5) dan penampak noda Lieberman-Burchard, kloroform- metanol (7:3), toluen-etilasetat (6:4) dengan penampak noda FeCl_3 .

Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etilasetat masing-masing sebanyak 10 μl ditotolkan dengan jarak 2 cm diantara pentotolan pada plat KLT, dimasukkan dalam bejana kromatografi yang telah jenuh dengan larutan pengembang, kemudian dielusi sampai batas pengembangan. Plat dikeluarkan lalu dikeringkan dan amati di bawah sinar UV, disemprot dengan penampak noda, selanjutnya dipanaskan di oven pada suhu 110°C selama 10 menit, warna yang timbul diamati dan dihitung harga R_f -nya (Harborne 1987, Sastrohamidjojo 1985, Wagner *et al.* 1984).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dilakukan secara maserasi menggunakan pelarut etanol 80%, diharapkan kandungan kimia yang terdapat dalam daun sirih merah dapat tersari sempurna, kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksan dimana senyawa non polar seperti minyak atsiri, terpenoid/steroid, tersari di dalamnya dan senyawa yang polar tersari dalam pelarut etilasetat yaitu senyawa flavonoid dan tanin.

Hasil uji fitokimia daun sirih merah dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan, adanya golongan senyawa: glikosida, steroid/triterpenoid, flavonoid, tanin, dan antrakinon pada daun sirih merah. Adanya kandungan senyawa triterpenoid, flavonoid dan tanin menunjukkan bahwa tumbuhan sirih merah (*Piper betle* Linn.) mempunyai aktivitas sebagai antimikroba (Robinson 1995), yang mampu melawan beberapa bakteri Gram positif dan negatif (Bisset 1994).

Tabel 1. Hasil skrining Fitokimia daun sirih merah (*Piper betle* Linn.).

No.	Uji Fitokimia	Hasil
1	Alkaloid	-
2	Glikosid	+
3	Steroid/Triterpenoid	+
4	Flavonoid	+
5	Tanin	+
6	Saponin	-
7	Antrakinon	+

Keterangan : + = ada senyawa, - = tidak ada senyawa

Tabel 2. Hasil pengujian Ekstrak etanol 80% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

No	Konsentrasi %(b/v) Ekstrak etanol	Diameter hambat pertumbuhan bakteri (mm)*		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	50	27,9	20,7	16,5
2	25	23,6	18,6	15,2
3	20	22,1	17,1	13,9
4	15	21,9	16,3	12,9
5	12,5	21,3	15,5	11,7
6	10	19,0	14,9	9,6
7	7,5	17,0	14,2	-
8	5,0	15,6	11,7	-
9	2,5	14,3	10,2	-
10	1,0	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-

Keterangan :

* = hasil rata-rata tiga kali pengujian (n=6), - = tidak ada hambatan

Senyawa tanin dan flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri untuk melawan *Staphylococcus aureus* (Newall *et al.* 1996). Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80%, fraksi n-heksan dan fraksi etilasetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan jamur *Candida albicans* (Tabel 2, 3, dan 4), sedangkan fraksi air tidak menunjukkan aktivitas antimikroba (Tabel 5).

Senyawa minyak atsiri, tanin, flavonoid, steroid/triterpenoid dan anthrakuinon dapat terekstraksi pada ekstrak etanol ataupun fraksi-fraksinya. Tabel 2 terlihat bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak atau fraksi yang diberikan akan menghasilkan daerah hambat yang semakin besar, hal ini disebabkan semakin banyak zat aktif yang terkandung dalam ekstrak maupun fraksi tersebut.

Tabel 3. Hasil pengujian fraksi etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

No	Konsentrasi %(b/v) Fraksi Etil Asetat	Diameter hambat pertumbuhan bakteri (mm)*		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	50	21,4	19,6	21,2
2	25	19,3	18,9	19,1
3	20	18,3	18,4	17,6
4	15	17,5	17,8	16,9
5	12,5	17,4	17,6	15,7
6	10	16,7	17,2	15,2
7	7,5	16,4	16,4	14,8
8	5,0	16,2	15,3	14,1
9	2,5	13,0	13,6	11,4
10	1,0	-	11,5	-
Kontrol	-	-	-	-

Keterangan : * = hasil rata-rata tiga kali pengujian (n=6), - = tidak ada hambatan

Tabel 4. Hasil pengujian Fraksi n-heksana terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

No	Konsentrasi %(b/v) Fraksi n-heksana	Diameter hambat pertumbuhan bakteri (mm)*		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	50	10,4	12,1	17,0
2	25	9,9	10,5	15,8
3	20	9,2	9,9	14,5
4	15	-	9,4	13,0
5	12,5	-	-	11,6
6	10	-	-	9,3
7	7,5	-	-	-
8	5,0	-	-	-
9	2,5	-	-	-
10	1,0	-	-	-

Kontro	-	-	-	-
1				

Keterangan : * = hasil rata-rata tiga kali pengujian (n=6), - = tidak ada hambatan

Tabel 5. Hasil pengujian Fraksi air terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

No	Konsentrasi %(b/v) Fraksi Air	Diameterambat pertumbuhan bakteri (mm)*		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	50	-	-	-
2	25	-	-	-
3	20	-	-	-
4	15	-	-	-
5	12,5	-	-	-
6	10	-	-	-
7	7,5	-	-	-
8	5,0	-	-	-
9	2,5	-	-	-
10	1,0	-	-	-
kontrol	-	-	-	-

Keterangan : * = hasil rata-rata tiga kali pengujian (n=6), - = tidak ada hambatan

Tabel 5 menunjukkan adanya perbedaan diameterambat pertumbuhan dari ketiga mikroba terhadap ekstrak etanol 80%, fraksi n-heksan dan etilasetat. Ekstrak etanol 80% (Tabel 2) memberikan daya hambatan terbesar pada bakteri *Escherichia coli* dengan KHM 2,5% (14,3 mm), dibanding dengan *Staphylococcus aureus* (10,2 mm), dan efek terendah ditunjukkan pada jamur *Candida albicans* dengan KHM 10% (9,6 mm). Hal ini dapat disebabkan adanya gabungan beberapa golongan senyawa yang saling memperkuat dan mempunyai efektivitas antimikroba pada ekstrak etanol 80%, yaitu minyak atsiri, triterpenoid/steroid, tanin, dan flavonoid (Bisset 1994, Newall 1996). Ini didukung oleh hasil skrining fitokimia dan KLT, yaitu dengan fase gerak n-heksan-etilasetat (8:2) diperoleh Rf 0,41 dan 0,29 (ungu merah), dengan perbandingan (6:4) diperoleh Rf 0,84 dan 0,76 (ungu merah) yang menunjukkan adanya senyawa triterpen/steroid. Sedang dengan fase gerak kloroform-metanol (7:3) diperoleh harga Rf 0,96 dan Rf 0,87 (hijau biru), Rf 0,77 dan 0,63 (biru hitam) menunjukkan adanya senyawa fenol (tanin dan flavonoid) (Harborne 1987, Robinson 1995, Wagner 1984).

Fraksi etilasetat (Tabel 3) memberikan hambatan tertinggi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan KHM 1% (11,5 mm) dan jamur *Candida albicans* KHM 2,5% (11,4 mm), juga *Escherichia coli* pada KHM

2,5% (13,0 mm). Hasil skrining fitokimia dan KLT menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan tanin, dengan fase gerak toluen-etilasetat (6:4) diperoleh harga Rf 0,83 dan Rf 0,66 (biru hitam) serta Rf 0,54 (hijau biru), dengan fase gerak kloroform-metanol (7:3), diperoleh harga Rf 0,96 dan Rf 0,88 (hijau biru), Rf 0,77 dan Rf 0,63 (biru hitam) (Harborne 1987, Robinson 1995, Wagner 1984). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Marline & Erly (2000) juga menyebutkan bahwa senyawa flavonoid dan tanin pada fraksi etilasetat mempunyai efek antimikroba yang kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ini didukung oleh Ditjen POM (1980) yang menyebutkan bahwa pada daun sirih dijumpai senyawa flavonoid dan tanin yang bersifat antimikroba, dan senyawa kavikol yang memiliki daya membunuh bakteri lima kali lebih kuat dari fenol biasa, berarti fraksi etilasetat daun sirih merah dapat menyembuhkan penyakit yang disebabkan oleh adanya ketiga bakteri tersebut. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang terdapat pada kulit sel mati, hidung, mulut, dan luka. *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif yang terdapat dalam saluran cerna sebagai flora normal. Sedang *Candida albicans* adalah jamur yang terdapat di dalam mulut, usus dua belas jari, usus halus, usus besar (Jawetz *et al.* 2001, Pelczar 1986).

Fraksi n-heksan (Tabel 4) menunjukkan daya hambat terendah, dengan konsentrasi yang lebih tinggi diperoleh KHM 20% (9,2 mm) pada bakteri *Escherichia coli*, KHM 15% (9,4 mm) pada *Staphylococcus aureus* dan pada jamur *Candida albicans* KHM 10% (9,3 mm). Pada fraksi n-heksan diduga senyawa triterpenoida/steroida berkurang selama proses pengerjaan, ini menyebabkan aktivitasnya sebagai antibakteri kurang (kecil) dibanding ekstrak etanol dan fraksi etilasetat. Hal ini diperkuat dengan hasil uji KLT, diperoleh hanya 2 noda yang berwarna ungu merah setelah disemprot dengan LB, menggunakan fase gerak n-heksan-etilasetat (8:2) yaitu Rf 0,42 dan Rf 0,30, sedangkan dengan fase gerak n-heksan-etilasetat (6:4), yaitu Rf 0,84 dan Rf 0,74. (Harborne 1987, Wagner 1984).

Tian *et al.* (2009) melaporkan bahwa bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) lebih sensitif dibanding bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) pada fraksi etilasetat yang mengandung senyawa tanin lebih efektif melawan bakteri Gram positif dari pada Gram negatif, sedangkan senyawa flavonoid bersifat sebagai antijamur.

KESIMPULAN

Hasil skrining fitokimia daun sirih merah (*Piper betle* Linn.) diperoleh senyawa glikosida, triterpenoid/steroid, flavonoid, tanin, dan anthraquinon. Ekstrak etanol mempunyai aktivitas antimikroba lebih kuat daripada fraksi etanol dan fraksi n-heksan, sedang fraksi air tidak aktif. Daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan jamur *Candida albicans* berturut-turut diperoleh KHM dari ekstrak etanol 80% (2,5%, 2,5%, dan 10%), fraksi n-heksan (20%, 15%, dan 10%), sedang fraksi etilasetat (2,5%, 1%, 2,5%). Ekstrak etanol 80% memberikan daya antimikroba tertinggi pada bakteri *Escherichia coli* dengan KHM 2,5% (14,3 mm), fraksi etilasetat pada bakteri *Staphylococcus aureus* KHM 1% (11,5 mm) dan *Candida albicans* KHM 2,5% (11.4 mm).

Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak etanol 80%, dan fraksi n-heksan dengan fase gerak n-heksan-tilasetat diperoleh 2 senyawa terpenoid/steroid dengan penampak noda LB, sedang dengan kloroform-metanol (7:3), dan toluen-etilasetat (6:4) dengan penampak noda FeCl₃ diperoleh 4 senyawa fenol (tanin dan flavonoida).

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A. 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Bandung, Penerbit ITB Press.
- Bisset NG. 1994. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals A handbook for practice on a scientific basis*, Medpharm Scientific Publishers, CRC.
- Case C. 1984. *Laboratory Eksperiment in Microbiology*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Departemen Kesehatan RI. 1978. *Materia Medika Indonesia*. Jilid II. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi Ketiga. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1980. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi Keempat. Jakarta.
- Farnsworth NR. 1996. Biological And Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaseutical Science*. **55**. 3: 257-259, 263 Chicago : Reheis Chemical Company.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, terjemahan K. Padmawinata. Edisi II. Bandung : ITB Press.
- Hariana A. 2007. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Edisi ketiga. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Jawetz, Melrick & Adelberg's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah: Mudihardi, E., Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Edisi 1. Surabaya: Salemba Medika.
- Kartsapoerta G. 1992. *Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat*. Cetakan kedua. Jakarta: Penerbit Rineka Cipta.
- Lay BW & Sugyo H. 1992. *Mikrobiologi*. Cetakan pertama. Jakarta: Rajawali Press.
- Mahendra B. 2005. *Jenis Tanaman Obat Ampuh*. Jakarta: Penebar swadaya.
- Marline N & Erly S. 2000. Uji Aktivitas Antibakteri serta Pemeriksaan Senyawa Kimia dari Ekstrak n-Heksan dan Ekstrak Etanol Daun Bandotan (*Ageratum Conzoides* Linn.). *Jurnal Media Farmasi*. **8**.1: 28-34. Fakultas Farmasi USU, Medan
- Moeljanto RD & Mulyono. 2003. *Khasiat & Manfaat Daun Sirih: Obat Mujarab Dari Masa ke Masa*. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.
- Newall, CA, Anderson LA, Phillipson JD. 1996. *Herbal Medicines A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press. London.
- Pelczar MJ Jr. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit UI Press.
- Power DA & Peggy JM. 1988. *Manual of BBL Product ang Laboratory Prosedure*. 6th edition. Maryland Beexon Dickinson Microbiology Systems.

- Robinson T.1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerjemah: K. Padmawinata. Edisi IV. Bandung: ITB Press.
- Sastrohamidjojo H. 1985. *Kromatografi*. Edisi pertama. Penerbit Liberty Yogyakarta.
- Syukur C & Hermani. 2002. *Budidaya Tanaman Obat Komersial*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.
- Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y & Luo J.2009. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Consecutive Extracts from *Galla chinensis* The Polarity Effect The Bioactivities, Food Chemistry.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analisis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Wattimena JR.1987. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.