

# PERBANDINGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH TERHADAP *Staphylococcus epidermidis* DENGAN METODE DISK DAN SUMURAN

## Comparison of Antibacterial Activity of Red Betel Leaf Extract on *Staphylococcus epidermidis* by Disc and Well Methods

Yuhanida Ratnasari, \*Riandini Aisyah, \*EM Sutrisna, \*Listiana Masyita Dewi

<sup>1</sup>Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

\*Dosen, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

E-mail: ryuhanida@gmail.com

### ABSTRAK

*Staphylococcus epidermidis* merupakan salah satu penyebab utama penyakit infeksi. Pengobatan dengan antibiotik saat ini banyak yang resisten. Sebagai alternatif, dapat digunakan daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai antibakteri karena mengandung senyawa antioksidan. Uji antibakteri perlu dilakukan untuk membuktikan aktivitas antibakteri suatu zat. Uji antibakteri dapat dilakukan dengan metode disk dan sumuran, dimana keduanya merupakan jenis metode yang sama dan memiliki tujuan akhir yang sama, yakni mengukur diameter zona hambat, namun memiliki prosedur kerja yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun sirih merah terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan perbandingan efek antibakterinya dengan metode disk dan sumuran. Penelitian dilakukan dengan desain posttest only control group design. Kontrol positif yang digunakan adalah Tetrasiklin 30µg sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah Tween 80 10%. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada konsentrasi 30% dan 60% dengan diameter rata-rata 7,8mm dan 7,3mm pada metode disk dan konsentrasi 30% dengan diameter rata-rata 6,6mm pada sumuran. Perbandingan efek antibakteri dengan metode disk dan sumuran pada uji analisis data menunjukkan nilai  $p=0,209$ . Hal ini menunjukkan ekstrak etanol 96% daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* namun tidak memiliki perbedaan efek antibakteri dengan metode disk dan sumuran.

**Kata Kunci:** *Staphylococcus epidermidis*, ekstrak sirih merah, sumuran, disk difusi

### ABSTRACT

*Staphylococcus epidermidis* is one of the main causes of infectious diseases. Treatment with antibiotics today is resistant. As an alternative, red betel leaf (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) can be used as an antibacterial because it contains antioxidant compounds. Antibacterial test needs to be done to prove the antibacterial activity of a substance. Antibacterial test can be done by the disk and wells method, both of which are the same type of method and have the same ultimate goal, which is to measure the diameter of the inhibition zone, but have different work procedures. This study aims to determine the antibacterial activity of 96% ethanol extract of red betel leaf on *Staphylococcus epidermidis* bacteria and comparison of its antibacterial effects by the disk and well method. The study was conducted using a posttest only control group design. The positive control used was Tetracycline 30 µg while the negative control used was Tween 80 10%. The results showed antibacterial activity at concentrations of 30% and 60% with an average diameter of 7.8mm and 7.3mm in the disk method and 30% concentration with an average diameter of 6.6mm in the well method. Comparison of antibacterial effects by the disk and well method in the data analysis test showed a value of  $p = 0.209$ . This shows that 96% ethanol extract of red betel leaf has antibacterial activity on *Staphylococcus epidermidis* but does not have different antibacterial effects by the disk and wells method.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, red betel leaf extract, well method, disc diffusion

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih menjadi masalah utama di berbagai negara berkembang, termasuk Indonesia (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2011). Agen infeksius dapat berupa virus, parasit, jamur, dan bakteri. Salah satu bakteri yang paling sering menimbulkan infeksi adalah *Staphylococcus epidermidis*. (Chessa, *et al.*, 2015). Hal ini disebabkan oleh keberadaan bakteri di epitel kulit manusia sebagai flora normal yang tidak mungkin dapat dieradikasi secara total (Jawetz, *et al.*, 2013)

Antibiotik dapat digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Saat ini, antibiotik banyak digunakan secara irasional sehingga menjadi resisten atau kebal terhadap bakteri (Candrasari, *et al.*, 2012). Sebagai alternatif, banyak digunakan tanaman herbal yang dianggap relatif lebih aman, efektif, dan efisien dibandingkan dengan obat yang berbahan dasar kimia (Maftunah, *et al.*, 2015)

Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai antibakteri adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). Daun sirih merah mengandung senyawa antibakteri, yaitu flavonoid, alkaloid, tannin, terpenoid dalam minyak atsiri, dan saponin yang berfungsi sebagai senyawa antibakteri. (Parfati & Windono, 2016)

Untuk membuktikan aktivitas antibakteri dapat dilakukan uji antibakteri. Salah satu uji antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi. Contoh metode difusi yaitu metode disk dan sumuran (Jawetz, *et al.*, 2013). Keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan.

Metode disk merupakan metode yang paling sering digunakan dalam penelitian. Kelebihan metode disk yaitu dapat dilakukan pengujian secara lebih banyak dalam satu kali percobaan serta tenaga dan biaya yang dikeluarkan lebih ringan. Kekurangan metode disk yaitu tidak dapat diketahui secara pasti penghambatan bakterisid atau

bakteriostatik yang terjadi (Haryati, *et al.*, 2017).

Metode sumuran lebih jarang digunakan dalam penelitian karena sulitnya proses perlakuan, namun hasilnya akan lebih mudah dilakukan pengukuran luas zona hambat yang dibentuk karena isolat bakteri akan terbentuk sampai bawah (Haryati, *et al.*, 2017). Kedua metode ini termasuk metode yang sama dan memiliki tujuan yang sama yaitu untuk mengamati diameter zona hambat antibakteri, namun memiliki langkah kerja yang berbeda. (Balouri, *et al.*, 2015)

Penelitian sebelumnya tentang penggunaan metode ujiantibakteri juga telah dilakukan, namun didapatkan hasil yang bertentangan. Hartini, *et al.*, pada tahun 2017 melakukan penelitian menggunakan ekstrak alpukat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* untuk membandingkan dua metode ujiantibakteri, disk dan sumuran, zona hambat didapatkan lebih besar dengan metode sumuran. Penelitian selanjutnya

oleh Er, *et al.*, pada tahun 2018 juga membandingkan kedua metode tersebut menggunakan minyak esensial berbagai tanaman pada *Rhizobium sp.* namun zona hambat didapatkan lebih besar dengan metode disk difusi.

Menjadi suatu hal yang menarik bagi peneliti untuk kembali membandingkan dua metode tersebut dengan melihat aktivitas antibakterinya pada daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiv & Pav) terhadap bakteri *Staphylococcus epidemidis*.

#### **METODE**

Penelitian ini bersifat penelitian eksperimental laboratorik dengan desain penelitian *post test only controlled group design* dan dilakukan pada bulan September 2019 sampai bulan Januari 2020 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Mikrobiologi FK UMS.

Daun sirih merah diambil dari kebun milik warga di Dusun Tegalmulyo, Desa Pabelan, Kecamatan Kartasura, Kabupaten Sukoharjo. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium

Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret untuk memperoleh kepastian spesies tanaman yang diaksud untuk diteliti.

Daun sirih merah dikeringkan menggunakan oven selama 3 hari kemudian dihaluskan menggunakan blender. Ekstrak sirih merah dibuat dengan cara maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam daun sirih merah yang telah di blender dengan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam dengan perbandingan 1:3. Ekstrak kemudian disaring dan dilakukan evaporasi dengan *rotatory evaporator* dan dievaporasi kembali dengan menggunakan *waterbath* sehingga terbentuk ekstrak kental.

Penelitian sebelumnya tentang aktivitas ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 5% dengan pelarut etanol 70% (Anugrah, 2017). Pada penelitian ini

larutan uji diencerkan dengan menggunakan Tween 80 10% hingga mendapatkan konsentrasi 7,5%, 15%, 30%, dan 60%. Kontrol positif yang digunakan adalah tetrasiklin 30µg. Kontrol negatif yang digunakan adalah Tween 80 10%.

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci sampai bersih kemudian dikeringkan dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf untuk alat berbahan kaca pada tekanan 1 atm dan suhu 121<sup>0</sup>C selama 20 menit. Alat-alat yang tidak tahan panas dapat disterilkan dengan dibungkus menggunakan kain selanjutnya dioven pada temperatur 160<sup>0</sup>-180<sup>0</sup> C selama 60 menit.

Bakteri yang digunakan diambil dari biakan murni *Staphylococcus epidermidis* dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diberi larutan NaCl 0,9% kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu: 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> bakteri/ml.

Uji antibakteri kemudian dilakukan dengan cara mengambil suspensi *Staphylococcus epidermidis*, kemudian secara merata dioleskan pada semua media agar. Pada metode disk, masing-masing kelompok perlakuan, diambil ekstrak 20µl kemudian teteskan pada disk dan keringkan. Disk kemudian diletakkan pada media agar yang telah siap. Pada metode sumuran lubang sumuran dibuat dengan diameter 6mm sesuai dengan ukuran disk. Kemudian ekstrak dimasukkan pada lubang pada tiap kelompok perlakuan.

Media bakteri ditutup rapat, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24jam. Diameter zona hambat dihitung dengan jangka sorong.

Penelitian ini sudah diajukan dan disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi dengan nomor 1.411/XII/HREC/2019.

Hasil penelitian kemudian diuji statistik menggunakan program analisis data. Pada setiap metode baik disk atau

sumuran uji normalitas data dilakukan dengan uji *Saphiro Wilk*. Uji Homogenitas dilakukan dengan dengan uji *Levene*. Kemudian dilakukan uji hipotesis dengan uji non parametrik *Kruskall Wallis*. Uji *Post hoc Mann-Whitney* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan aktivitas antibakteri. Perbandingan aktivitas antibakteri dengan metode disk dan sumuran dilakukan dengan uji *Kruskall Wallis*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

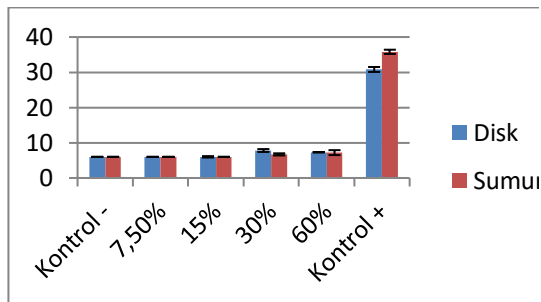
**Tabel 1. Hasil Uji antibakteri dengan metode disk**

Konsentrasi	Diameter Zona Hambat tiap (mm)				
	1	2	3	4	Rata-rata
(-)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
(+)	30,5	31,7	30,9	30,0	30,8±0,7
7,5%	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
15%	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
30%	7,7	7,7	8,0	7,7	7,8±0,2
60%	7,0	7,1	7,2	7,9	7,3±0,4

**Tabel 2. Hasil uji antibakteri dengan metode sumuran**

Konsentrasi	Diameter Zona Hambat (mm)				
	1	2	3	4	Rata-rata
(-)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
(+)	35,2	36,0	36,6	35,5	35,8±0,6
7,5%	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
15%	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0 ±0
30%	7,0	6,4	6,8	6,3	6,6±0,3
60%	7,5	6,0	6,0	7,2	6,8±0,7

**Grafik 1. Perbandingan efek antibakteri dengan metode disk dan sumuran**



**Tabel 3. Hasil uji analisis data dengan uji *Kruskall Wallis***

Uji <i>Kruskall Wallis</i>	Nilai p
Metode disk	0,000
Metode sumuran	0,002
Perbandingan metode disk dan sumuran	0,209

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa zona hambat terbentuk pada konsentrasi ekstrak 30%, dan 60% dengan hasil rata-rata 7,8mm dan 7,3 mm dengan metode disk. Data pada tabel 2 menunjukkan bahwa zona hambat terbentuk pada konsentrasi ekstrak 30% dan 60% dengan hasil rata-rata 6,6mm dan 6,8mm dengan metode sumuran. Kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat menandakan bahwa efek antibakteri bukan berasal dari pengencer yang digunakan.

Data hasil penelitian kemudian dilakukan uji analisis data. Tabel 1 dan 2 kemudian dianalisis secara terpisah untuk mengetahui pengaruh aktivitas antibakteri masing-masing metode. Hasil uji normalitas data didapatkan salah satu nilai  $p=0,001$  dan nilai  $p$  tidak terbaca menunjukkan  $p<0,05$  menandakan data tersebut tidak normal untuk kedua metode. Setelah itu dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene test* dan didapatkan hasil tidak homogen karena terdapat nilai  $p=0,03$  pada metode disk dan  $p=0,02$  pada metode sumuran menandakan  $p<0,05$  untuk kedua metode. Dikarenakan uji normalitas data tidak normal dan uji homogenitas data tidak homogen sehingga uji dilanjutkan dengan Uji non parametrik *Kruskal-wallis*

Hasil uji *Kruskal-wallis* diperoleh nilai  $p= 0,000$  pada metode disk dan nilai  $p=0,002$  pada metode sumuran, nilai  $p<0,05$  menunjukkan adanya perbedaan rerata antar kelompok. Untuk mengetahui

kelompok mana yang terdapat perbedaan maka dilanjutkan uji *post hoc* menggunakan uji *Mann-Whitney*.

Uji *Post Hoc Mann Whitney* juga dilakukan untuk menilai daya antibakteri suatu ekstrak dengan menggunakan pembandingan kontrol negatif. Hasil uji pada metode disk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada konsentrasi 30% dan 60%. Hal ini dibuktikan dengan nilai  $p=0,011$  pada kedua kelompok. Apabila  $p<0,05$  maka ada perbedaan aktivitas antibakteri yang bermakna pada kedua kelompok konsentrasi. Kelompok konsentrasi yang lain (7,5% & 15%) tidak menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri yang bermakna dikarenakan nilai  $p>0,05$  pada kedua kelompok.

Hasil uji pada metode sumuran menunjukkan aktivitas antibakteri terbentuk pada konsentrasi 30% dibuktikan dengan nilai  $p=0,014$ . Konsentrasi yang lain tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

Uji potensiasi ekstrak juga dapat dinilai dengan menggunakan pembandingan kontrol positif. Hasil uji beda menunjukkan  $p<0,05$  pada seluruh konsentrasi (7,5%, 15%, 30%, dan 60%) baik menggunakan disk atau sumuran menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri yang bermakna secara statistik. Namun pada metode disk hasil tertinggi diameter hambat ekstrak (8mm pada konsentrasi 30%) belum dapat menyamai hasil tertinggi diameter kontrol positif (31,7mm), sehingga kontrol positif masih lebih efektif dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun sirih merah. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode sumuran juga menunjukkan hasil yang sama dimana hasil tertinggi diameter hambatnya (7,5mm pada konsentrasi 60%) belum dapat menyamai hasil tertinggi diameter hambat kontrol positif (36,6mm).

Adanya aktivitas antibakteri ekstrak sirih merah kemungkinan disebabkan oleh senyawa aktif golongan

flavonoid, alkaloid, tannin, terpenoid dalam minyak atsiri, dan saponin (Parfati & Windono, 2016). Alkaloid, flavonoid, tanin-polifenol, dan saponin dapat larut dalam pelarut polar. Sedangkan steroid terpenoid merupakan senyawa non polar (Sudirman, 2011). Etanol 96% merupakan senyawa polar, yang diharapkan mampu menarik sebagian besar dari kandungan senyawa daun sirih merah.

Penelitian sebelumnya menyatakan ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* mulai pada konsentrasi 5% sebesar 9mm pada pelarut etanol 70% (Anugrah., 2017). Namun pada penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dari penelitian sebelumnya dimana pada penelitian ini zona hambat mulai terbentuk pada konsentrasi 30%.

Adanya warna yang berbeda pada media agar pada penelitian ini menandakan bahwa ekstrak telah berhasil berdifusi namun beberapa tidak menghasilkan efek antibakteri. Tidak

terbentuknya aktivitas antibakteri pada beberapa kelompok ekstrak baik dengan metode disk dan sumuran kemungkinan dapat disebabkan oleh variabel luar yang terlibat. Variabel tersebut antara lain yaitu faktor teknis, biologis, kandungan senyawa antibakteri, konsentrasi ekstrak, daya difusi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat (Jawetz, 2013; CLSI 2014)

Faktor teknis sebagai salah satu variabel luar semaksimal mungkin dikendalikan pada penelitian ini. Faktor tersebut antara lain adalah medium agar yang digunakan, proses inkubasi, dan inokulum bakteri yang digunakan (Hudzicki, 2016).

Kandungan senyawa aktif dalam ekstrak sirih merah juga dapat mempengaruhi aktivitas anti bakteri. Senyawa aktif dalam ekstrak berasal dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman. Ada kemungkinan senyawa metabolit sekunder dalam daun sirih merah tidak dapat terlarut selama proses ekstraksi



sehingga aktivitas antibakteri tidak terbentuk.

Faktor eksternal sebagai variabel luar yang tidak dapat dikendalikan dalam penelitian ini juga dapat mempengaruhi jumlah senyawa metabolit sekunder pada bahan alam seperti ketersediaan cahaya, air, paparan mikroorganisme, dan pH lingkungan (Yang, *et al.*, 2018). Kandungan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman pada umur dan tempat yang berbeda akan menghasilkan jumlah yang berbeda (Astuti, *et al.*, 2014)

Tanaman sirih merah pada penelitian ini diambil dari Dusun Tegalmulyo, Desa Pabelan, Kecamatan Kartasura, Kabupaten Sukoharjo yang merupakan dataran rendah dengan dengan curah hujan 2.790mm dan suhu udara mencapai 34<sup>0</sup>C (Portal Resmi Kabupaten Sukoharjo, 2019). Tanaman sirih merah pada penelitian ini tumbuh pada saat musim kemarau sehingga suhu udara lebih tinggi dari normal.

Tanaman sirih merah menyukai tempat hidup yang teduh, udaranya sejuk dan mendapat sinar matahari pagi. Jika tumbuh di daerah yang panas dan terkena paparan matahari langsung secara terus menerus dapat menyebabkan batangnya cepat kering dan warna merah daunnya menjadi pudar atau berubah, sedangkan khasiat dari daun sirih merah terletak pada senyawa kimia yang ada pada warna merah di daunnya. Ekstrak etanol daun sirih merah yang berwarna merah lebih efektif dibanding daun sirih merah yang merahnya telah pudar atau menjadi hijau (Rachmawaty, *et al.*, 2018).

Perbandingan aktivitas antibakteri dengan metode disk dan sumuran dapat dilakukan dengan mengalisis data tabel 1 dan 2 secara bersama-sama dengan uji *Kruskall Wallis* dimana nilai  $p=0,209$ , nilai  $p>0,05$  menandakan tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri secara statistik antara metode disk dan sumuran.. Uji *Post Hoc* tidak dilanjutkan karena

data tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Menurut teori, disk difusi dan sumuran dikelompokkan dalam metode uji antibakteri yang sama yaitu metode difusi. Metode ini menggunakan media agar padat (Balouri, 2016). Proses difusi terjadi ketika zat dalam pelarut berpindah dari bagian konsentrasi tinggi menuju konsentrasi rendah (Kuntari, *et al.*, 2019).

#### SIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak etanol 96% daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan metode disk memiliki aktivitas antibakteri namun belum dapat menyamai daya hambat tetrasiklin.

Tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan metode disk dan sumuran.

Penelitian selanjutnya diharapkan untuk melakukan penelitian lebih lanjut dengan ekstrak daun sirih merah dengan

pelarut yang berbeda, variasi konsentrasi yang berbeda, dan metode ekstraksi yang berbeda. Penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor eksternal yang dapat mempengaruhi kualitas ekstrak dalam uji antibakteri juga perlu dilakukan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, Endang, Retno Sunarmingsih, Umar Anggara Jenie, Sofia Mubarika, dan Sisindari., 2014. Pengaruh Lokasi Tumbuh, Umur Tanaman dan Variasi Jenis Destilasi Terhadap Komposisi Senyawa Minyak Atsiri Rimpang *Curcuma mango* Produksi Beberapa Sentra di Yogyakarta. *J. Manusia dan Lingkungan*, 29(3), p.323
- Balouri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S. K., 2015. Methods for Invitro Evaluating Antimicrobial Activity : A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1(1).
- Candrasari, A., Romas, M., Hasbi, M. & Astuti, O.R., 2012. Uji Daya Anti Mikroba Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia coli* ATCC11229 dan *Candida albican* ATCC10231 Secara Invitro. *Biomedika*, 4(1), p.4
- Chessa, D., Ganau, G. & Mazzarello, V., 2015. An Overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a Focus on Developing Countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(6), p. 547.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2014. Performance Standards for Antimicrobial

- Susceptibility testing: Twenty-Fourth Informational Supplement.
- Er, Y., Sivri, N. & Mirik, M., 2018. Antimicrobial Activity of Essential Oil Against Rhizobium (Agrobacterium) using Agar Well and Disc Diffusion Method. *Bacteriology Journal*, 8(1), pp. 1-11.
- Haryati, S. D., Darmawati, S. & Wilson, W., 2017. Perbandingan Efek Ekstrak Buah Alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan Metode Disk dan Sumuran. Semarang, Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Hudzicki, Jan, 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion test Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. Pp.1-23
- Jawetz, Melnick & Adelberg, 2013. *Medical Mikrobiologi*. 26 penyunt. s.l.:McGraw-Hill Companies, inc.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2011. Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik
- Kuntari., Francisca Retno, Susatyo Pranoto, Adita Sutresno. 2019. Studi Proses Difusi Melalui Membran dengan Pendekatan Kontemporer. *Jurnal Fisika dan Aplikasinya*, 15(2). Pp. 62-65
- Maftunah, A., Bintari, S. H. & Mustikaningtyas, D., 2015. Pengaruh Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Unnes Jjournal of Life Science*, 4(1), pp. 60-65.
- Parfati, N. & Windono, T., 2016. Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Kajian Pustaka Aspek Botani, Kandungan Kimia, dan Aktivitas Farmakologi. *Media Pharmaceutica Indosiana, December, 1(2)*, p. 108.
- Portal Resmi Kabupaten Sukoharjo, 2019. Geografis. [Online] Available at: [portal.sukoharjokab.go.id](http://portal.sukoharjokab.go.id)[Accessed 25 Januari 2019]
- Rachmawaty, F. J., Akhmad, M. M., Pranacipta, S. H., Nabila, Z., & Muhammad, A. (2018). Optimasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Mutiara Medika*, 18(1), pp 13-19.
- Sudirman, S., 2011. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kangkung Air (*Ipomoea aquatica* Forsk.),
- Yang, Li, Kui-Shan wem, Xiao Ruan, Ying Xian Zhao, Feng Wei, & Qiang Wang, 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(207), pp. 1-26