



PAPER – OPEN ACCESS

Uji Efek Kombinasi Amoksisilin Dengan Ekstrak Etanol Daun Sirih (Piper Betle L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli Dan Staphylococcus Aureus

Author : Panal Sitorus

DOI : 10.32734/tm.v1i1.67

Paper Page : 313 - 319

Volume 1 Issue 1 – 2018 TALENTA Conference Series: Tropical Medicine (TM)



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Published under licence by TALENTA Publisher, Universitas Sumatera Utara



Uji Efek Kombinasi Amoksisilin Dengan Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle L*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*

Dr. Panal Sitorus, M.Si., Apt^a

^a*Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara 20155, Indonesia*

sitoruspanal@gmail.com

Abstrak

Latar belakang: Konsep baru untuk pengobatan infeksi bakteri resisten adalah dengan kombinasi antibiotika dengan ekstrak herbal. Ekstrak daun sirih memiliki aktivitas anti bakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* karena daun sirih mengandung metabolit sekunder. Kombinasi ekstrak daun sirih dengan amoksisilin, perlu diuji untuk mengetahui efek antibakteri masing-masing dibandingkan dengan kombinasinya

Tujuan Penelitian: Mengetahui karakteristik dan skrining fitokimia simplisia dan ekstrak daun sirih serta uji aktivitas anti bakteri kombinasi amoksisilin dengan ekstrak daun sirih terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Metode Penelitian: Penelitian ini meliputi ekstraksi serbuk simplisia dengan maserasi, Karakterisasi simplisia untuk mengetahui kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam, serta skrining fitokimia simplisia dan ekstrak daun sirih serta uji aktivitas anti bakteri kombinasi amoksisilin dengan ekstrak daun sirih terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas,

Hasil Penelitian: Hasil penelitian menunjukkan bahwa serbuk simplisia daun sirih memiliki kadar air 3,66%; , kadar sari larut dalam air 22,54%, kadar sari larut dalam etanol 14,65%, kadar abu total 9,25% dan kadar abu tidak larut asam 1,03%. Komponen kimia pada simplisia dan ekstrak etanol serbuk daun sirih adalah flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Ekstrak etanol serbuk daun sirih menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing pada KHM 8 mg/ml dan 9 mg/ml. Amoksisilin menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing pada KHM 5 g/ml dan 10 g/ml dengan diameter zona hambat 6,83mm dan 7,05 mm. Diameter zona hambat terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* meningkat ketika bakteri uji dipaparkan dengan kombinasi ekstrak etanol daun sirih dengan amoksisilin.

Kesimpulan: Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi Amoksisilin dengan Ekstrak etanol daun sirih menunjukkan efek yang sinergis

Kata Kunci: Antibakteri, kombinasi, KHM, amoksisilin, daun sirih, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*;

1. Pendahuluan

Amoksisilin adalah antibiotik golongan penisilin berspektrum luas, rentan terhadap enzim penisilinase, yaitu suatu β -laktamase yang mampu memecah cincin β -Laktam pada penisilin sehingga penisilin tidak efektif (Carranza dan Takei, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa amoksisilin telah resisten terhadap beberapa kuman

patogen seperti *E. coli*, *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp, *St. epidermidis* dan *St. aureus* mempunyai resistensi tinggi terhadap amoksisilin (Refdanita, dkk., 2004)

Upaya untuk menanggulangi resistensi bakteri terhadap amoksisilin adalah dengan mengembangkan antibakteri baru dari bahan alam (Islam, et al., 2011). Tanaman obat kaya akan berbagai metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antimikroba (Abdallah, 2011).

Sirih salah satu tanaman yang banyak digunakan masyarakat secara tradisional sebagai obat infeksi dan dapat dikembangkan sebagai sumber antibiotik baru. Daun sirih memiliki aktivitas antibakteri (Pradhan, et al., 2013; Subashkumar, et al., 2013; Bangash, et al., 2012; Khan, et al., 2011). Daun sirih mengandung metabolit sekunder seperti tanin, flavonoid dan minyak atsiri (Baskaran, et al.,

2011). senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *St. aureus*, bakteri tersebut menghasilkan enterotoksin yang dapat menyebabkan diare. Sirih mengandung minyak atsiri, tanin dan flavonoid yang memiliki aktivitas antimikroba dengan cara mendenaturasi protein dan

merusak dinding sel bakteri, serta merusak lipid pada membran sel melalui mekanisme penurunan tegangan permukaan membran sel. (Pelezar dan chan, 2008),

Salah satu pendekatan baru untuk pengobatan penyakit infeksi bakteri dan mengatasi resistensi bakteri adalah penggunaan ekstrak tanaman, baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan antibiotika (Chanda dan Rakholiya, 2011). Penggunaan kombinasi dua anti bakteri adalah alternatif yang baik untuk mencegah terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu (Joung, et al., 2012). Kombinasi antibiotik dan ekstrak tanaman merupakan konsep baru dan telah digunakan untuk pengobatan infeksi bakteri resisten. Kombinasi dapat berupa ekstrak tanaman yang berbeda atau ekstrak tanaman dengan antibiotik standar (Chanda dan Rakholiya, 2011).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti melakukan pengujian efek kombinasi ekstrak etanol 96% daun sirih (*Piper betle* L) dengan amoksisilin terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

2. Metode Penelitian

2.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih (EEDS)

Sebanyak 600 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 4500 ml etanol 96% selama 5 hari terlindung dari cahaya, kemudian campuran diserkai. Ampas dicuci dengan etanol 96%, Maserat didiamkan di tempat terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian disaring, diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator pada temperatur $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian diuapkan dengan penangas air sampai diperoleh ekstrak kental (Ditjen POM., 1979).

2.2. Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total dan penetapan kadar abu tidak larut asam (Depkes RI, 2005).

2.3. Skrining fitokimia Serbuk Simplisia dan Ekstrak

Skrining fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak daun sirih dilakukan untuk menganalisis senyawa golongan kimia yang terkandung pada simplisia dan ekstrak daun sirih. Depkes (1979) dan Farnsworth (1966)

2.4. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol Daun Sirih (EEDS)

Ekstrak ditimbang 100 mg dan dilarutkan dengan DMSO hingga 10 ml (konsentrasi ekstrak 10 mg/ml)

larutan tersebut diencerkan hingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 mg/ml, kemudian dimasukkan cakram kertas kedalam ekstrak dengan berbagai konsentrasi diatas, di diamkan 30 menit.

2.5. Pembuatan Larutan Uji Amoksisilin

Amoksisilin ditimbang 10 mg dilarutkan dengan DMSO hingga 10 ml maka konsentrasi amoksisilin 1000 µg/ml kemudian diambil 0,1 ml dengan menggunakan pipet mikro dimasukkan kedalam vial, dicukupkan dengan 10 ml DMSO hingga diperoleh konsentrasi amoksisilin 10 µg/ml kemudian dibuat pengenceran selanjutnya sampai diperoleh amoksisilin dengan konsentrasi 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 µg/ml, kemudian dimasukkan cakram kertas kedalam amoksisilin dengan berbagai konsentrasi, diamkan 30 menit.

2.6. Pembuatan Larutan Uji Kombinasi EEDS Dengan Amoksisilin

Timbang EEDS 200 mg dilarutkan dengan DMSO hingga 10 ml maka konsentrasi ekstrak etanol daun sirih 20 mg/ml kemudian dibuat pengenceran selanjutnya sampai diperoleh ekstrak etanol dengan konsentrasi 16; 12; 8; 4 mg/ml. Ditimbang 20 mg amoksisilin dilarutkan dengan DMSO hingga 10 ml maka konsentrasi amoksisilin 2000 µg/ml kemudian diambil 0,1 ml dengan menggunakan pipet mikro dimasukkan kedalam vial, dicukupkan dengan 10 ml DMSO hingga diperoleh konsentrasi amoksisilin 20 µg/ml kemudian dibuat pengenceran selanjutnya sampai diperoleh amoksisilin dengan konsentrasi 18; 16; 12; 8; 4 mg/ml.

Dipipet masing-masing 0,5 ml amoksisilin 4; 8; 12; 18; 20 µg/ml dimasukkan kedalam vial lalu ditambahkan 0,5 ml ekstrak etanol daun sirih dengan konsentrasi hambat minimum (KHM). Lalu dilakukan cara yang sama dipipet 0,5 ml ekstrak etanol daun sirih 4; 8; 12; 18; 20 mg/ml dimasukkan kedalam vial lalu ditambahkan 0,5 ml amoksisilin dengan konsentrasi hambat minimum (KHM).

2.7. Pembuatan inokulum bakteri *St. aureus* dan *E. coli*

Koloni bakteri *St. aureus* dan *E. coli* diambil dari stok kultur menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan kedalam 10 ml media nutrient broth steril lalu diinkubasikan pada suhu 35 ± 20 C sampai didapat kekeruhan dengan transmittan 25% menggunakan alat spektrofotometer UV panjang gelombang 580 nm (Ditjen POM., 1995).

2.8. Pengujian Aktivitas Anti bakteri

Sebanyak 0,1ml inokulum dimasukkan ke dalam cawan petri steril, setelah itu dituang media nutrient agar sebanyak 20 ml dengan suhu 45-50°C, selanjutnya cawan digoyang di atas permukaan meja agar media dan suspensi bakteri tercampur rata dan dibiarkan memadat. Pada media yang telah padat diletakkan beberapa pencadang kertas yang telah direndam EEDS; Amoksisilin dan kombinasi EEDS dan amoksisilin dengan berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi pada suhu 35 ± 1 °C selama 18-24 jam. Lalu diukur diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekitar pencadang dengan menggunakan jangka sorong (Ditjen POM., 1995).

Penentuan aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan media padat dan cakram kertas. Zona hambat pertumbuhan mikroba adalah daerah jernih disekeliling cakram kertas. Pengukuran zona hambat pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan jangka sorong, semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar karena semakin banyak zat aktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut (Dwidjoseputro, 1998)

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Rendemen Simplisia dan Ekstrak

Hasil penyarian 600 g serbuk simplisia daun sirih dengan pelarut etanol 96%. Maserat diuapkan dengan alat rotary evaporator, dikeringkan dengan penangas air dan ditimbang. Ekstrak kental diperoleh sebanyak 138,39 g. Ekstrak ini digunakan untuk uji golongan senyawa kimia dan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *St. aureus* dan *E. coli*.

Hasil karakterisasi simplisia daun sirih yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel. 1 Hasil pemeriksaan karakterisasi simplisia daun sirih.

N0	Karakteristik	Hasil %
1	Kadar air	3,66
2	Kadar sari larut air	22,54
3	Kadar sari larut etanol	14,65
4	Kadar abu total	9,25
5	Kadar abu tidak larut asam	1,03

Hasil uji golongan senyawa kimia serbuk simplisia dan EEDS dapat dilihat pada Tabel, 2.

Tabel 2 Hasil uji golongan senyawa kimia dari serbuk simplisia dan EEDS.

No	Metabolit sekunder	Hasil	
		simplisia	Ekstrak
01	Alkaloid	-	-
02	Flavonoid	+	+
03	Saponin	+	+
04	Tanin	+	+
05	Glikosida	+	+
06	Steroida/triterpenoid	+	+

Keterangan : (+), (-) = Tidak ada

3.2. Hasil Pengujian Aktivitas Anti bakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa EEDS dapat menghambat pertumbuhan bakteri *St.aureus* pada konsentrasi 100 mg/ml dengan diameter zona hambat 14,4 mm dan bakteri *E.coli* pada konsentrasi 100 mg/ml dengan diameter zona hambat sebesar 14,03 mm.. Nilai KHM pada EEDS terhadap bakteri *St. aureus* pada konsentrasi 9 mg/ml dengan diameter zona hambat 6,23 mm dan pada bakteri *E. coli* pada konsentrasi 8 mg/ml dengan diameter zona hambat 7,22 mm dapat dilihat pada Tabel,3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Anti bakteri EEDS.

No	Konsentrasi EEDS (mg/ml)	Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri (mm)*			
		<i>St. aureus</i>		<i>E. coli.</i>	
		D*	SD	D*	SD
1	500	18.83	± 0.58	18.57	± 0.59
2	400	17.43	± 0.60	17.32	± 1.17

3	300	16.17	± 0.42	16.35	± 1.00
4	200	15.27	± 0.42	15.50	± 0.60
5	100	14.4	± 0.63	14.03	± 0.86
6	90	13.93	± 1.00	13.90	± 0.35
7	10	7.52	± 0.35	8.12	± 0.45
8	9	6.23	± 0.16	7.62	± 1.14
9	8	-	-	7.22	± 0.45
10	7	-	-	-	-
11	Blank	-	-	-	-

Sirih (Piper betle) memiliki potensi sebagai antibakteri yaitu dengan adanya senyawa-senyawa flavonoida, saponin, tanin yang mempunyai potensi sebagai antibakteri (Robbinson, 1995). Senyawa flavonoida berungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraselluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida. Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang bersifat sebagai antibakteri, memiliki kemampuan menyamak kulit dan juga dikenal sebagai adstringensia (Robinson, 1995)

Hasil uji aktivitas antibakteri amoksisilin menunjukkan bahwa Amoksisilin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *St.aureus* pada konsentrasi 1000 µg /ml dengan diameter zona hambat 14,43 mm dan bakteri *E.coli* pada konsentrasi 1500 µg /ml dengan diameter zona hambat sebesar 14,08 mm.. Nilai KHM pada Amoksisilin terhadap bakteri *St. aureus* pada konsentrasi 5 µg /ml dengan diameter zona hambat 6,83 mm dan pada bakteri *E. coli* pada konsentrasi 10 µg /ml dengan diameter zona hambat 7,05mm .dapat dilihat pada Tabel,4.

Tabel. 4 Hasil uji aktivitas anti bakteri amoksisilin (A) terhadap *St. aureus* dan *E. coli*.

N0	Konsentrasi (A)(µg/mL)	Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri (mm)*			
		<i>E.coli</i>		<i>St.aureus</i>	
		D*	SD	D*	SD
1	2000	15.70	± 0.49	14.63	± 0.26
2	1750	15.50	± 0.53	14.40	± 0.26
3	1500	15.35	± 0.56	14.08	± 0.28
4	1250	14.92	± 0.61	13.70	± 0.05
5	1000	14.43	± 0.34	12.98	± 0.15
6	750	13.98	± 0.21	12.73	± 0.10
7	20	10.58	0.45	8.08	± 0.42
8	10	9.25	0.26	7.05	± 1.14
9	9	8.35	0.28	-	-
10	5	6.83	0.25	-	-
11	4	-	-	-	-
12	Blanko	-	-	-	-

Setelah dilakukan uji aktivitas antibakteri pada masing masing sampel uji dari EEDS dan amoksisilin terhadap bakteri *St. aureus* dan *E. coli* kemudian dilakukan kombinasi dari keduanya dan dilakukan uji aktivitas anti bakteri. Parameter yang digunakan untuk melakukan kombinasi adalah nilai KHM, dimana pada uji aktivitas antibakteri EEDS terhadap *St. aureus* memiliki nilai KHM pada konsentrasi 9 mg/ml yaitu 6,23 mm dan nilai KHM terhadap *E. coli* terdapat pada konsentrasi 8 mg/ml yaitu 7,22 mm, sedangkan pada uji aktivitas antibakteri amoksisilin

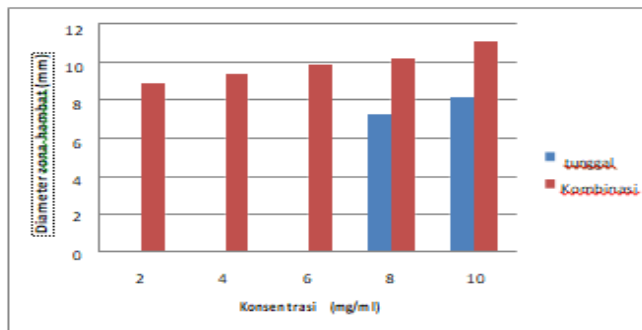
nilai KHM terhadap bakteri *St.aureus* yang didapat adalah pada konsentrasi 10 µg/ml dengan diameter zona hambat 7,05 mm dan pada bakteri *E. coli* diameter zona hambat 6,83 mm pada konsentrasi 5 µg/ml.

Hasil uji aktivitas anti bakteri EEDS kombinasi dengan amoksisilin terhadap bakteri *St.aureus* dapat dilihat pada Tabel. 5 dan Gambar 1 dan 2.

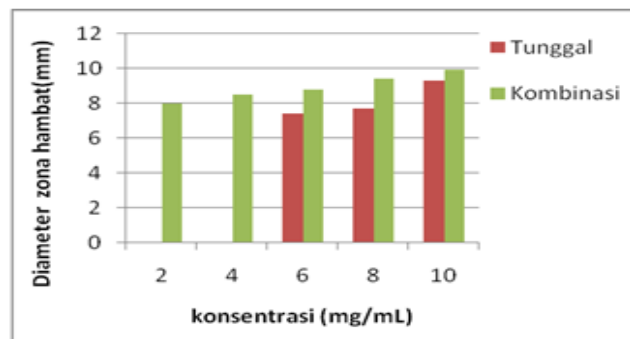
Tabel.5 Hasil uji aktivitas anti bakteri EEDS kombinasi dengan amoksisilin terhadap bakteri *St. aureus*

NO	Konsentrasi Kombinasi A dengan EEDS	Diameter Zona Hambat <i>St. aureus</i>		Konsentrasi Kombinasi EEDS dengan A	Diameter Zona Hambat <i>St. aureus</i>	
		D*	SD		D*	SD
		1	2 µg/ml + 9 mg/ml		8.90	± 0.70
2	4 µg/ml + 9 mg/ml	9.42	± 0.54	4 mg /ml + 10 µg /ml	8.47	± 0.63
3	6 µg/ml + 9 mg/ml	9.95	± 0.42	6 mg /ml + 10 µg /ml	9.20	± 0.42
4	8 µg/ml +9 mg/ml	10.18	± 0.35	8 mg /ml + 10 µg /ml	9.57	± 0.30
5	10 µg/ml + 9mg/ml	11.10	± 0.05	10 mg /ml + 10 µg /ml	10.07	± 0.03

Keterangan: A:Amoksisili



Gambar.1 Grafik perbandingan uji aktivitas anti bakteri kombinasi dari KHM EEDS dengan Amoksisilin terhadap bakteri *St. aureus*.



Gambar 2. Grafik perbandingan uji aktivitas anti bakteri kombinasi EEDS dengan KHM Amoksisilin terhadap bakteri *St. aureus*.

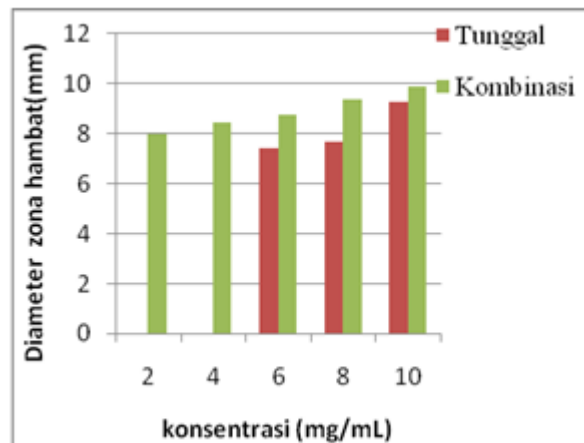
Hasil uji aktivitas anti bakteri EEDS kombinasi dengan amoksisilin terhadap bakteri E.coli dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 3 dan 4

Tabel.6 Hasil uji aktivitas antibakteri EEDS kombinasi dengan amoksisilin terhadap bakteri E. coli

NO	Konsentrasi Kombinasi A dengan EEDS	Diameter Zona Hambat		Konsentrasi Kombinasi EEDS dengan A	Diameter Zona Hambat	
		<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i>	
		D*	SD		D*	SD
1	2 µg /ml +8 mg/ml	8.00	± 0.63	2 mg /ml + 5 µg /ml	7.97	± 0.63
2	4 µg /ml + 8 mg/ml	8.20	± 0.56	4 mg /ml + 5 µg /ml	8.47	± 0.62
3	6 µg /ml + 8 mg/ml	8.52	± 0.45	6 mg /ml + 5 µg /ml	8.75	± 0.54
4	8 µg /ml + 8 mg/ml	9.47	± 0.22	8 mg /ml + 5 µg /ml	9.38	± 0.37
5	10 µg /ml + 8 mg/ml	9.90	± 0.25	10 mg /ml + 5 µg /ml	10.90	± 0.18

Keterangan : A : Amoksisilin

Gambar. 3 Grafik perbandingan uji aktivitas anti bakteri kombinasi EEDS dengan KHM Amoksisilin terhadap bakteri E. coli.



Gambar 4. Grafik perbandingan uji aktivitas antibakteri kombinasi dari KHM EEDS dengan Amoksisilin terhadap bakteri E. coli.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun sirih (EEDS) dengan Amoksisilin, KHM sebagai parameter uji, menunjukkan bahwa kombinasi antara ekstrak etanol daun sirih dan amoksisilin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *St. aureus* dan *E. coli*. dengan efek yang sinergis.

Daftar Pustaka

- [1] Abdallah, E.M. (2011). Plants: An Alternative Source for Antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (06): 18.
- [2] Bangash, F.A., Hashmi A.N., Mahboob, A., Zahid, M., Hamid, B., Muhammad S.A., Shah, Z.U., Afzaal, H. (2012). IN-VITRO Antibacterial Activity Of Piper betel Leaf Extracts. 639 | *J App Pharm* 03(04): 639-646.
- [3] Baskaran., Ratha., dan Kanimozhi. (2011). Screening For Antimicrobial Activity And Phytochemical Analysis Of Various Leaf Extract Of *Murraya koenigii*. *IJRAP*. Vol. 2(6): 1807-1810.
- [4] Chanda, S., dan Rakholiya, K. (2011). Combination therapy: synergism between natural plant Extracts and Antibiotics Against Infectious Diseases. Hal. 520-529.
- [5] Depkes RI. (1995). *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Cetakan Keenam. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Hal. 247-251, 199-304, 321-325.
- [6] Ditjen POM. (1979). *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 9, 33.
- [7] Ditjen POM RI. (2005). *Penyiapan Simplisia Untuk Sediaan Herbal*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. Hal. 1.
- [8] Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 10-11.
- [9] Farnsworth, N.R. (1996). Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 55. No. 3. Chicago: Reheis Chemical Company. Hal. 262-264.
- [10] Islam, M. M., Masum, S., Makbub, K. R., and Haque, M. Z., (2011). Antibacterial Activity of Crab of Amoxicilin Against *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli*. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2(4): 63-66.
- [11] Jawetz, E., Melnick, J.L., dan Adelberg, E.A. (2001). *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika. Hal. 318 – 319.
- [12] Khan, A.J., Kumar, N. (2011). Evaluation of Antibacterial Properties of Extracts of Piper betle Lef. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, Vol (11) : 1-3.
- [13] Lay, B.W., dan Sugiyono, H. (1994). *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada. Hal. 34, 72-73.
- [14] Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga. Hal.105-117,140-142.
- [15] Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- [16] Schwalbe, R., Moore, L. S., and Goodwin, A.C. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, USA*: CRC Press. Hal. 277, 282, 283.
- [17] Subashkumar, R., Sureshkumar, M., Babu, S and Tha, T. (2013). Antibacterial effect of crude aqueous extract of Piper betle L. against pathogenic bacteria. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* Vol. 4 (1): 42.
- [18] World Health Organization. (2011). *Quality Control Methods for Herbal Material*. Switzerland: WHO. Hal. 29-38.