

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN SIRIH
HIJAU (*Piper betle L.*) TERHADAP *Staphylococcus epidermidis* DAN
*Pseudomonas aeruginosa***

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF THE ETHYL ACETATE
FRACTION OF GREEN BETEL LEAF AGAINST *Staphylococcus*
epidermidis AND *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI



Oleh :

MARYANI

4171037

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL

SUKOHARJO

2021

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN SIRIH
HIJAU (*Piper betle L.*) TERHADAP *Staphylococcus epidermidis* DAN
*Pseudomonas aeruginosa***

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF THE ETHYL ACETATE
FRACTION OF GREEN BETEL LEAF AGAINST *Staphylococcus*
epidermidis AND *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana
Farmasi (S.Farm) pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu
Kesehatan Nasional
di Sukoharjo**

Oleh :

MARYANI

4171037

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SUKOHARJO**

2021

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN SIRIH
HIJAU (*Piper betle L.*) TERHADAP *Staphylococcus epidermidis* DAN
Pseudomonas aeruginosa

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF THE ETHYL ACETATE
FRACTION OF GREEN BETEL LEAF AGAINST *Staphylococcus*
epidermidis AND *Pseudomonas aeruginosa*

Oleh :

MARYANI

4171037

Dipertahankan di hadapan penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah
Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 2 September 2021

Pembimbing Utama


Dr. Didik Wahyudi, M.Si.

Pembimbing Pendamping


Alip Desi Suyono S,Farm, M.Sc


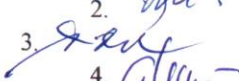
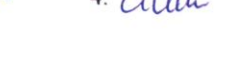

Mengetahui,
**Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional**


apt. Lusi Murtisiwi, S. Farm., M.Sc.

Tim Penguji

1. Ardy Prian Nirwana, S. Pd. Bio., M. Si
2. apt.Novena Yety Lindawati, S. Farm., M.Sc.
3. Dr. Didik Wahyudi, M.Si.
4. Alip Desi Suyono, S. Farm., M.Sc

Ketua penguji
Anggota penguji
Anggota penguji
Anggota penguji

1. 
2. 
3. 
4. 

PERSEMBAHAN

“Sesungguhnya kami milik Allah dan kepada-nya lah kita semua kembali”
(Q.S Al-Baqarah:156)

Dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT.

Dalam tabularasa yang tak terhingga dan Shalawat kepada Muhammad Saw.

Skripsi ini saya persembahkan sepenuhnya kepada

Dua orang tua dan Suami saya.

Mereka lah yang membuat segalanya menjadi mungkin

sehingga saya bisa sampai tahap dimana skripsi ini akhirnya selesai.

Terima kasih atas segala pengorbanan, nasihat dan doa baik yang tidak pernah berhenti kalian berikan kepadaku.

Aku selamanya bersyukur dengan keberadaan kalian sebagai Orang tua dan Suamiku

Karya ini juga saya persembahkan untuk:

Sahabat hatiku

Seluruh penikmat ilmu bahan alam dan mikrobiologi

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebut dalam daftar pustaka.

Sukoharjo, 19 Agustus 2021



PRAKATA


Puji syukur dan terimakasih penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah membimbing, meridhoi setiap langkah, dan melimpahkan kasih sayang karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*”**.Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari semua pihak yang telah memberikan bimbingan, bantuan, saran, nasehat dan selalu mendoakan. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini. Ucapan terimakasih penulis kepada :

1. Apt. Lusia Murtisiwi, S. Farm., M.Sc., selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional.
2. Bapak Dr. Didik Wahyudi, M.Si. selaku dosen utama dan Ibu Alip Desi Suyono S,Farm, M.Sc selaku dosen pembimbing yang memberikan masukan, saran, bimbingan serta selalu memberikan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Ibu apt. Novena Yety Lindawati, S. Farm., M.SC. dan Bapak Ardy Prian Nirwana, S. Pd. Bio., M. Si. Selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dalam penyempurnaan naskah skripsi.
4. Ibu apt. Lusia Murtisiwi, S. Farm., M. SC. selaku dosen pembimbing akademik penulis mengucapkan terimakasih kepada beliau sudah mendampingi selama 4 vahun dalam proses menuju S.Farm yang telah sabar menerima keluhan pada saat bimbingan.

5. Bapak ibu dan mertua tercinta, suami dan kakak ipar tersayang yang telah mendoakan penulis serta memberikan dorongan baik moril dan materi yang tidak ternilai harganya.
6. Rekan-rekan penelitian Isna, Ivani, Hani, Novia, dan Firda yang selalu menemani dan membantu saat kesulitan, kekurangan bahan maupun alat dalam penelitian.
7. Teman-teman pendidikan SIFarmasi Siti, Mega, Sela, Ninda, Retno, Yola, Rachel yang selalu mendukung dan memberikan semangat hingga saat ini.
8. serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah banyak membantu tersusunnya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Penulis berharap semoga karya skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan sumbangan dalam ilmu pengetahuan.

Sukoharjo, 2 September 2021

Penulis

Maryani

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
INTISARI	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB. 1 PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	1
B. Perumusan masalah	3
C. Tujuan penelitian	3
D. Manfaat penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Penyakit infeksi	5
B. Bakteri <i>Staphylococcus epidermidids</i>	8
C. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
D. Penyakit infeksi bakteri.....	12

E. Resistensi bakteri.....	15
F. Daun sirih hijau.....	16
G. Fraksinasi	18
H. Metode pengujian antibakteri.....	19
I. Landasan teori.....	21
J. Hipotesis.....	22
K. Kerangka konseptual.....	23
BAB III. METODE PENELITIAN	24
A. Desain penelitian	24
B. Alat dan Bahan	24
C. Variabel penelitian	25
D. Definisi operasional	26
E. Jalannya penelitian	27
F. Analisis data.....	35
G. Alur penelitian.....	36
BAB. IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	37
A. Pembuatan fraksi daun sirih hijau	37
B. Hasil identifikasi kandungan kimia daun sirih hijau	40
C. Karakteristik bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
D. Karakteristik bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
E. Uji daya hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau terhadap <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	56
F. Uji daya hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau terhadap <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i>	60

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN.....	71

DAFTAR GAMBAR

Gamba 1. Pertumbuhan koloni <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
Gambar 2. Pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Gambar 3. Daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L.).....	16
Gambar 4. Kerangka konseptual penelitian	22
Gambar 5. Skema alur penelitian	36
Gambar 6. Reaksi uji flavonoid	41
Gambar 7. Reaksi uji meyer.....	42
Gambar 8. Reaksi hidrolisis bismut	42
Gambar 9. Reaksi uji dragendrof	43
Gambar 10. Reaksi uji wagner	43
Gambar 11. Reaksi uji tanin.....	44
Gambar 12. Reaksi uji saponin	45
Gambar 13. Hasil pengamatan <i>Staphylococcus epidermidis</i>	46
Gambar 14. Hasil morfologi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	47
Gambar 15. Test katalase	48
Gambar 16. Hasil uji biokimia <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
Gambar 17. Test koagulase	50
Gambar 18. Hasil pengamatan di mikroskop <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Gambar 19. Hasil morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Gambar20. Hasil uji biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Gambar21. Daya hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i>	57

Gambar 21. Daya hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau terhadap *Pseudomonas aeruginosa*62

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Mikroorganisme penyebab penyakit infeksi luka operasi.....	13
Tabel 2. Klasifikasi daya hambat pertumbuhan bakteri.....	20
Tabel 3. Uji organoleptis ekstrak daun sirih hijau.....	38
Tabel 4.kandungan kimia.....	40
Tabel 5.mikroskopis dari <i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
Tabel 6. Morfologi dari sampel <i>Staphylococcus epidermidis</i> pada media BAP.....	47
Tabel 7. Hasil uji biokimia dari <i>Staphylococcus epidermidis</i>	48
Tabel 8. Mikroskopis dari bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Tabel 9. Morfologi dari bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Tabel 10. Hasil uji biokimia dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Tabel 11. Diameter zona hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau pada <i>Staphylococcus epidermidis</i>	57
Tabel 12. Diameter zona hambat zona hambat fraksi etil asetat daun sirih hijau terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi daun sirih hijau	78
Lampiran 2. Perhitungan rendemen dan konsentrasi	78
Lampiran 3. Pengeringan daun sirih hijau	80
Lampiran 4. Pengayakan serbuk daun sirih hijau	80
Lampiran 5. Proses maserasi.....	80
Lampiran 6. Hasil filtrat dari maserasi dievaporatory	81
Lampiran 7. Hasil evaporatory di pekatkan dengan <i>waterbath</i>	81
Lampiran 8. Fraksinasi daun sirih hijau	82
Lampiran 9. Hasil uji skrining fitokimia.....	82
Lampiran 10. Daya hambat <i>Staphylococcus epidermidis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
Lampiran 11. Hasil uji <i>one way anova Staphylococcus epidermidis</i>	85
Lampiran 12. Hasil uji <i>one way anova Pseudomonas aeruginosa</i>	87

DAFTAR SINGKATAN

ICU	Intensive Care Unit
ISK	Infeksi Saluran Kemih
ISPA	Infeksi Saluran Pernafasan
O ₂	Oksigen
CO ₂	Karbondioksida
H ₂ O ₂	hidrogen peroksida
H ₂ O	Air
SIRS	<i>(Systemic Inflammatory Response Syndrome)</i>
LPS	Lipopolisakarida
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BAP	<i>Blood Agar Plate</i>
MC	<i>Mac Conkey</i>
MSA	<i>Manitol Salt Agar</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
MHA	Muller Hinton Agar
KIA	<i>Klinger Irono Agar</i>
SIM	<i>Sulfit Indol Motilly</i>
MR	<i>Methyl Red</i>
VP	Voges Proskauer
DMSO 10%	Dimetil sulfoksida
H ₂ SO ₄ 2N	Asam sulfat
FeCl ₃	<i>Ferric chloride</i>
KOH 40%	Kalium hidroksida
NaCl 0,9%	Natrium klorida
H ₂ O ₂ 3%	Hidrogen piroksida
PAD	Phenil Alanin Diaminase
CLSI	<i>Clinic and Laboratory Standards Institute</i>

INTISARI

Infeksi bakteri biasanya disebabkan oleh *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang dapat menimbulkan pembengkakan (abses). Pengobatan alternatif dapat menggunakan tanaman herbal seperti sirih hijau yang mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah daun sirih hijau memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang memberikan daya hambat terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirih hijau dengan metode difusi cakram *disk* diamati diameter zona hambat yang terbentuk disekeliling cakram. Pengamatan konsentrasi fraksi etil asetat daun sirih hijau menggunakan jangka sorong, konsentrasi 25%, 50% dan 75% dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu DMSO 10% dan kontrol positif yaitu tetrasiklin.

Hasil penelitian Pada konsentrasi minimum dari fraksi etil asetat daun sirih hijau yaitu 25% sudah mampu menghambat bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang menunjukkan nilai lebih tinggi dari kontrol negatif secara signifikan ($P < 0,05$). Tabel *anova Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada kolom Signifikan diperoleh nilai $p = 0,00$ demikian pada taraf nyata = 0,05 sehingga ada perbedaan yang bermakna konsentrasi dengan kontrol positif

Kata kunci : Antibakteri, *Piper betle L.*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Bacterial infections are usually caused by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* which can cause swelling. Alternative medicine can use herbal plants such as green betel which contains flavonoid compounds, tannins, saponins, alkaloids. The purpose of this study was to determine whether green betel leaf has antibacterial activity that provides inhibition against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The antibacterial activity test of the ethyl acetate fraction of green betel leaf by disc diffusion method was observed to observe the diameter of the inhibition zone formed around the disc. Observation of the concentration of the ethyl acetate fraction using a caliper, concentrations of 25%, 50% and 75% were compared with the negative control, namely DMSO 10% and the positive control, namely tetracycline.

Research result at the minimum concentration of the ethyl acetate fraction of green betel leaf, which is 25%, it was able to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria which showed a higher value than the negative control significant ($P < 0,05$). Anova table of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* in column significant obtained P value = 0,00 so at the level of significance = 0,05 so that there is a significant difference in concentration with positive control.

Keyword : *Antibacterial, Piper betle L., Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan permasalahan kesehatan di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Penyakit infeksi merupakan penyakit menular yang mudah menyerang anak, karena anak belum mempunyai sistem imun yang baik dan dapat disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus, parasit. Penyakit infeksi karena bakteri sering terjadi dilingkungan sekitar, pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat menimbulkan penyakit pembengkakan (*abses*) yaitu infeksi kulit (Ahmad., *et al* 2015).

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara alami hidup pada kulit dan membran mukosa manusia. Infeksi *Staphylococcus epidermidis* terjadi karena bakteri ini membentuk biofilm di alat-alat medis rumah sakit dan menulari orang-orang dilingkungan rumah sakit. Bakteri ini menyerang orang-orang yang rentan atau imunitas rendah. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ini sering ditemukan pada peralatan logam *heating set* seperti gunting, klem arteri, dan pinset.

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik penyebab infeksi nosokomial pada pasien yang mengalami penurunan sistem imun. Bakteri merupakan bakteri gram negatif aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagella polar sehingga bakteri ini bersifat motil. Bakteri ini secara luas dapat ditemukan di alam contohnya di tanah, air, tanaman, hewan dan ditemukan pada lingkungan yang lembab seperti rumah sakit (Soekiman, 2016).

Masyarakat melakukan pengobatan penyakit infeksi bakteri, dengan menggunakan antibiotik yaitu tetrasiklin yang bekerja dengan mengikat diri pada subnit ribosom kemudian mencegah akses tRNA di akseptor pada kompleks mRNA-ribosom sehingga menghambat sintesis protein bakteri. Baik bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. (Setiabudi, 2011)

Kekuatan bahan alam yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu daun sirih hijau. Daun sirih hijau mengandung berbagai macam kandungan kimia antara lain flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan steroid. Flavonoid akan menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun sirih hijau tidak seluruhnya merupakan senyawa polar, namun juga terdapat senyawa non polar, semi polar dan bersifat lipofil untuk memperoleh zat aktif dari daun sirih hijau dilakukan pemisahan senyawa dengan cara fraksinasi (Wardhani, 2012).

Peneliti ingin melakukan penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi cakram. Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi yaitu etil asetat dikarenakan sifat dari etil asetat yang merupakan pelarut semi polar sehingga dapat menarik flavonoid. Hal ini sesuai dengan (Yusuf, 2014) yang menyatakan bahwa etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mampu menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga non polar.

Metode yang digunakan pada penelitian yaitu metode difusi cakram, keunggulan uji difusi cakram dapat memilih tingkat konsentrasi obat yang akan diuji, mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan relatif murah (Yusuf, 2014)

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, dapat ditarik rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Berapakah konsentrasi minimum dari fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang mampu menghambat *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Untuk mengetahui pada konsentrasi minimum dari fraksi etil asetat dari daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang mampu menghambat *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

- a. Menambah pengetahuan tentang aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat dau sirih hijau (*Piper betle L.*)
- b. Dapat dijadikan referensi dan bahan bacaan untuk semua mahasiswa dan mahasiswi untuk dijadikan acuan yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya.

2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi tambahan pengetahuan kepada masyarakat kepada upaya pemanfaatan daun sirih hijau.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian ini adalah penelitian analitik yang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Perlakuan dengan uji aktivitas antibakteri frakasi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik *mettler toled, expert rotary evaporator supplier, waterbath B-one model DWB 6L 2H, blender*, kertas merang, kertas perkamen, toples kaca, sendok tanduk, cawan porselin yuri, corong kaca herma, beaker glass herma, glass ukur pyrex, batang pengaduk pyrex, penangas air, pipet tetes pudak, labu ukur, pipet ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *autoclave*, kaca objek, jarum ose, pembakar bunsen, mikroskopik, vortex, cawan petri normax, erlenmeyer iwaki pyrex, pinset dekho pack, inkubator memmert, tip dan mikropipet scilogex, jangka sorong krisbow, mikroskop olympus CX21, *handscoon* dan masker.

Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna bersih, dipetik disore hari yang diperoleh dari Desa Gerang, Kelurahan

Gemantar, Kecamatan Jumantono, Kab. Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari Laboratorium mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Surakarta. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media BHI (*Brain Heart Infusion*), media BAP (*Blood Agar Plate*), media MC (*Mac Conkey*), media MSA (*Manitol Salt Agar*) media NA (*Nutrient Agar*), media MHA (*Muller Hinton Agar*), media NAM (*Nutrient Agar Miring*), media KIA (*Klinger Irono Agar*), media SIM (*Sulfit Indol Motilly*), media urea, media citrat, media MR/VP. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut etanol 70%, aquadest, n-Heksan, etil asetat, DMSO 10% (Dimetil sulfoksida), tetrasiklin, reagen H₂SO₄ 2N (Asam sulfat), FeCl₃ (*Ferric chloride*), dragendroff, erlich/kovac, barried, KOH 40% (Kalium hidroksida), methyl red, FeCl₃ 10% (*Ferric chloride*), NaCl 0,9% (Natrium klorida), H₂O₂ 3% (Hidrogen piroksida), plasma citrat steril, minyak emersi, alkohol mikroskop, cat gram A,B,C,D.

C. Variabel penelitian

1. Variabel bebas adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan. Variabel bebas yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat dari daun sirih hijau dalam berbagai konsentrasi.
2. Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat dan tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji

Staphylococcus epidermidis dan *Pseudomonas aeruginosa*, kondisi laboratorium (meliputi : kondisi alat dan bahan yang digunakan harus steril) serta media yang digunakan dalam penelitian.

3. Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat oleh fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

D. Definisi Operasional

1. Daun sirih hijau yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna, yang dipetik pada sore hari, diambil dari Desa Gerang, Kelurahan Gemantar, Kecamatan Jumantono, Kab. Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.
2. Serbuk daun sirih hijau yang diperoleh dari daun sirih yang sudah dicuci bersih, dijemur, dipotong-potong dan dikeringkan dengan sinar matahari secara langsung kemudian, daun yang sudah kering dihaluskan.
3. Ekstrak etanol daun sirih hijau adalah hasil ekstraksi dari daun sirih hijau dengan cara remarasi menggunakan pelarut etanol 70% lalu dipekatkan dengan rotary evaporator.
4. Fraksi etil asetat daun sirih hijau adalah hasil fraksinasi dari residu n-heksan dengan pelarut etil asetat.
5. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari isolasi bakteri di Laboratorium Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Surakarta .

6. Uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi cakram. Metode difusi dengan cara mengukur luas daerah hambatan yaitu zona bening disekitar cakram kertas merupakan daerah difusi fraksi yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Kontrol positif antibiotik tetrasiklin dan kontrol negatif adalah DMSO 10%.
7. Konsentrasi minimum yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi terendah yang berbeda signifikan dengan kontrol negatif.

E. Jalannya penelitian

1. Persiapan sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle L.*) berwarna hijau segar dan dipetik atau dipanen pada saat sore hari, diambil dari Desa Gerang, Kelurahan Gemantar, Kecamatan Jumantono, Kab. Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Sampel sebanyak 2 kg yang masih segar dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan air mengalir lalu dipotong berukuran sedang kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan ditutupi dengan kain hitam. setelah kering maka sampel berupa simplisia diblender hingga menjadi halus kemudian diayak dengan ayakan nomer 60 (Diniatik, 2015).

2. Maserasi

Sampel sebanyak 1 kg dimasukkan kedalam bejana maserasi, ditambah etanol 70% sebanyak 7500 ml dan dicampur sampai homogen. Campuran dimaserasi pada suhu ruangan dengan menggunakan toples berbahan kaca selama 3 hari x 24 jam dan terlindung dari cahaya dengan perlakuan tiap hari diaduk sebanyak 3 kali sehari. Setelah hari ke 3 sampel disaring dan dipisahkan dari

ampas dan filtratnya. Ampas direndam kembali dengan 2500 ml etanol selama 2 hari, disaring kembali dan diperoleh maserat. Maserat 1 dan maserat 2 diendapkan semalam kemudian dipisahkan dari residu. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental (Sukriani *et al*, 2016).

3. Fraksinasi

Ekstrak etanol daun sirih ditambahkan air hangat dan diekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan dengan perbandingan (1:1 v/v) kemudian diaduk selama 15 menit, didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Fase air akan berada dibawah, sedangkan fase n-heksan akan berada pada bagian atas. Dari hasil partisi diperoleh dua fraksi yaitu fraksi air dan fraksi n-heksan. Selanjutnya fraksi air diekstraksi cair-cair lagi menggunakan etil asetat dengan perbandingan larutan fraksi etil asetat (1:1 v/v) sehingga didapatkan fraksi air dan fraksi etil asetat. Setelah dipisahkan fraksi etil asetat diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dan *waterbath* hingga didapatkan ekstrak kental. Lalu hasil fraksi tersebut digunakan analisis lebih lanjut (Afifah *et al.*, 2020).

4. Uji fitokimia

a. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara menimbang 0,1 gram fraksi etil asetat daun sirih hijau dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 mg lalu ditambahkan HCl pekat 3 tetes. Warna merah, kuning, kecoklatan, hitam dan orange, menunjukkan positif flavonoid (Kursia., *et all* 2016).

b. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara menimbang 0, 1 gram fraksi etil asetat dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml asam klorida, dikocok kemudian ditambahkan HCl 2N. Larutan yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi dimana masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi dragendrof, pereaksi meyer dan pereaksi wagner. Untuk pereaksi dragendrof endapan merah/jingga menunjukkan positif senyawa alkaloid, pada pereaksi mayer endapan putih menunjukkan positif senyawa alkaloid dan pada pereaksi wagner endapan coklat menunjukkan hasil yang positif (Kursia., *et all* 2016).

c. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara menimbang 0, 1 gram fraksi etil asetat daun sirih hijau dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air hangat dan ditambahkan 5 tetes NaCl. Setelah itu ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Warna hijau kehitaman atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Kursia., *et all* 2016).

d. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara menimbang 0, 1 gram fraksi etil asetat daun sirih hijau dimasukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air hangat atau panas lalu dikocok selama 30 menit. Dibiarkan selama 5 menit dan jika busanya tidak hilang ditambahkan HCL 2N. Apabila masih terdapat busa yang konstan maka menunjukkan hasil yang positif (Kursia., *et all* 2016).

5. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan untuk pemeriksaan mikrobiologi disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dalam pengujian. Pertama, alat-alat yang digunakan didetoks terlebih dahulu lalu dikeringkan. Selanjutnya alat yang sudah didetoksifikasi bersama dengan bahan media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang disterilisasi menggunakan autoklaf biasanya alat-alat yang terbuat dari kaca seperti tabung reaksi, erlenmeyer dan cawan petri. Alat yang lain dapat disterilisasikan dengan cara dipijarkan pada lampu busen atau dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dilewatkan di api bunsen (Kulla, 2016).

6. karakteristik bakteri

a. Pewarnaan gram

1. Dibuat preparat dari biakan kuman pada media MC dan BAP.
2. Preparat ditetesi dengan cat gram A kristal violet, dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir.
3. Preparat ditetesi dengan cat gram B lugol iodine. Dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir.
4. Preparat ditetesi dengan cat gram C alkohol, dibiarkan selama 30 detik lalu segera dibuang.
5. Preparat ditetesi dengan cat gram D safranin, dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir. Preparat dikeringkan.
6. Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x.
7. Dicatat hasil pengamatan (Kumala, 2017).

b. Inokulasi bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada media Blood Agar Plate dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media Mac Monkey.

1. Koloni yang telah digoreskan pada media Mac monkey dan Blood Agar Plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
2. Diamati pertumbuhan koloni pada media.
3. hasil pertumbuhan koloni dicatat (Jawet., *et al* 2014).

c. Uji biokimia

1. Uji (*King Inron Agar/Triple Sugar Iron Agar*) KIA/TSIA (Dwinna *et al.*, 2016)

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media KIA diambil 1 ose dan ditanam dengan cara digoreskan pada lereng media dan ditusukan sampai dasar media, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Uji (*Sulfide Indole Motility*) SIM

Secara aseptik diinokulasikan biakan bakteri dari media ke tryptophan broth, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Indol ditambah 3-4 tetes reagen kovac melalui dinding tabung reaksi. Uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah. Motil hasil positif jika terdapat pertumbuhan yang menyebar disekitar tusukan atau pada permukaan media atau media menjadi keruh. H₂S hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media.

3. Uji citrat

Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya biru pada media.

4. Uji urea

Secara aseptik diinokulasi biakan bakteri ke media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji urease ferment positif ditandai dengan berubahnya warna media menjadi merah.

5. Uji (Methyl Red) MR

Secara aseptik diinokulasi biakan bakteri ke media MR, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Ditambahkan 2-3 tetes reagen MR. MR positif, jika terbentuk warna merah pada media

6. Uji (Voges Proskauer) VP

Secara aseptik diinokulasikan biakan bakteri ke media VP, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Ditambahkan 10 tetes reagen Barried dan 3-4 tetes KOH 40%. Uji VP positif, jika terbentuk warna pada media.

7. Uji (Phenil Alanin Diaminase) PAD

Secara aseptik diinokulasikan biakan bakteri pada media PAD, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan warna hijau pada media setelah ditambahkan HCL 0,1 N sampai media berwarna kuning dan ditambahkan 5 tetes FeCl₃ 10%.

7. Pembuatan Media Muller Hinton Agar dan Nutrient Agar

Media MHA (Muller Hinton Agar) dibuat dengan cara menimbang sejumlah 38 gram kemudian dilarutkan dalam 1 L akuades, medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur sampai sempurna selama 1 menit. Kemudian media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Media dituangkan pada cawan steril, didiamkan pada suhu kamar hingga memadat (Utomo, 2018)

Media NA dibuat dengan cara melarutkan Na bubuk sebanyak 20 gram dalam 1 liter aquadest. Media dihomogenkan dengan stirer sekaligus dipanaskan dengan menggunakan hot plate, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sehingga didapatkan media NA yang steril (Utomo, 2018)

8. Peremajaan Bakteri

Masing-masing bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari medium NA dengan menggunakan ose steril dari kultur murninya. Lalu diinokulasikan dalam media agar miring secara zig-zag, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam (Agustina, 2019)

9. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari media peremajaan bakteri dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan larutan NaCl 0,9%. Koloni bakteri diambil lima ose bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9%. Buat suspensi bakteri sampai didapat kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5 (Agustina, 2019).

10. Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Uji Fraksi Etilasetat Sirih Hijau

Fraksi etil asetat daun sirih dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% b/v (g/100ml). Kemudian dilarutkan masing-masing dengan DMSO 10% hingga volumenya 1 ml (Saputro *et al.*, 2014).

11. Pengujian Antibakteri Secara Difusi Cakram

Disiapkan media NA dan MHA yang telah dibuat dalam cawan petri. Diambil suspensi biakan bakteri menggunakan lidi kapas steril dan buang kelebihan suspensi bakteri dengan menekan lidi kapas steril pada dinding tabung. Dioleskan media sehingga inokulum terdistribusi secara merata, kemudian diinkubator selama 3-5 menit agar kondisi media mengering. Ditempatkan cakram yang telah ditetesi larutan uji fraksi etil asetat daun sirih hijau dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% sebanyak 30µl kedalam media NA dan MHA. Digunakan cakram antibiotik tetrasiklin 30µl sebagai kontrol positif dan cakram yang telah ditetesi dengan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Posisikan cawan secara terbalik dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Kursia., *et al* 2016).

Keterangan :

1. Positif : Jika terjadi zona hambat (Zona bening) disekitar kertas cakram.
2. Negatif: Tidak terjadi zona hambat (Zona bening) disekitar kertas cakram

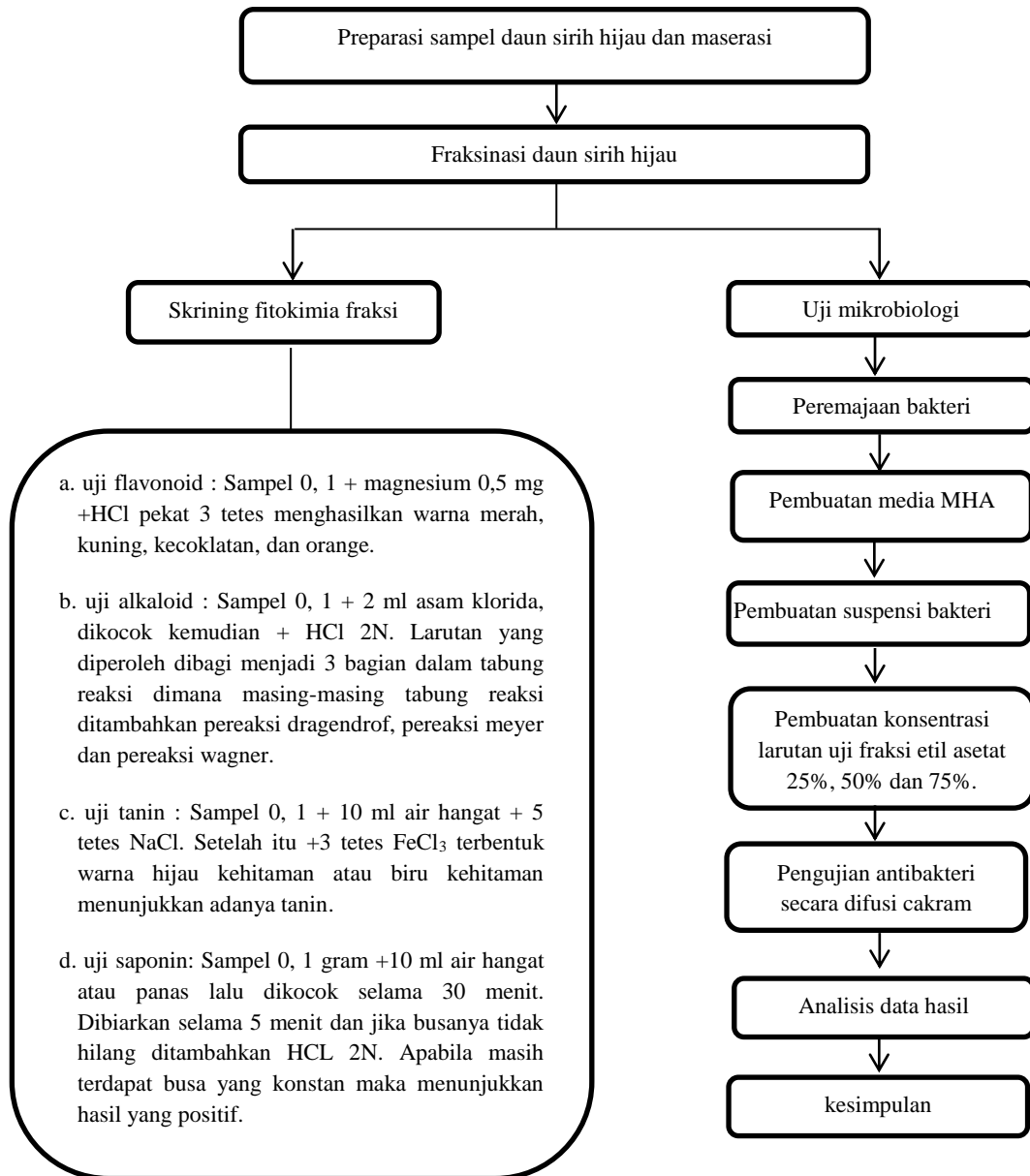
(Agustina, 2019).

F. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi cakram disk yang dinyatakan dengan diameter zona hambat (Zona bening) yang terbentuk disekeliling cakram. Dalam penelitian ini dilakukan pengamatan konsentrasi fraksi etil asetat dengan menggunakan jangka sorong berdasarkan konsentrasi 25%, 50% dan 75% yang dibandingkan dengan kontrol negatif yang digunakan DMSO 10% dan kontrol positif yang digunakan yaitu tetrasiklin.

Aktivitas antibakteri diperoleh dengan mengukur zona bening pada media padat dan menjadi petunjuk ada tidaknya bakteri yang tumbuh di sekeliling cakram disk. Analisis data *One Way ANOVA* berdistribusi normal dan variasi data homogen, jika $p < 0,05$ (tidak ada beda nyata) pada uji nyata ANOVA maka analisis dilanjutkan uji Duncan. Jika $p < 0,05$ (tidak ada beda nyata) pada *Homogeneity OF Variance* data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Kruskall Wallis* dengan aplikasi *SPSS Microsoft Window's*.

G. Alur penelitian



Gambar 5. Skema alur Penelitian.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. SIMPULAN

1. Fraksi etil asetat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan terbentuknya zona bening disekitar *diks cakram*.
2. Konsentrasi minimum dari fraksi etil asetat daun sirih hijau yaitu 25% sudah mampu menghambat *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

B. SARAN

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan identifikasi bakteri pada media BAP dan Mc menggunakan metode goresan zig zag saja.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas antibakteri fraksi air, n-heksan dan etil asetat dengan mengamati potensi apa yang terkandung di dalam daun sirih hijau dan melakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar yang paling tinggi sebagai antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Muri Yusuf. 2014. *Metode Penelitian Kualitatif dan Penelitian Gabungan*. Prenadamedia group. Jakarta.
- Abdulhak, L., & Dermawan, D. (2015). *Teknologi Pendidikan*. PT. remajaRosdakarya. Bandung.
- Afifah Rukmini, Danang Hadi Utomo, Ainun Nikmati Laily. *Skrining fitokimia Familia Piperaceae*. Jurnal biologi dan pembelajarannya, vol 7 No 1 April 2020. Pp:28-32. e-ISSN: 2406-8659.
- Agustina. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) GRIFF) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan Bakteri *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat Dengan Metode Cakram. *Jurnal Analisis Farmasi*. Volume, 4 Np. 1 April 2019, Hal 1-9.
- Ahmad Aniq Noor Mutsaqof, Wiharto S.T.M.Kom, Esti Suryani S.Si.M.Kom. Sistem Pakar Untuk Mendiagnosis Penyakit Infeksi Menggunakan Forward Chaining. *Jurnal ITSMART*. Vol 4. No. . Juni 2015. ISSN : 2301-7201
- Ahmad muhlisin, 2019. Bacterial vs Viral Infection. The Differences Explained WebMD.(<https://www.webmd.com/a-to-z-guides/bacterial-an-viral-infections>, diakses 12 oktober 2020)
- Alvi Kusuma Wardani. 2020. *Uji Aktivitas Antibakteri Penyebab Jerawat Staphylococcus epidermidis menggunakan Ekstrak Daun Ashitaba (Angelica keiskei)*. Lumbung Farmasi; *Jurnal Kefarmasian* , col 1 No 1 Januari 2020.
- Arwin, M., F.G. Ijong dan R. Tumbol., 2016, Characteristics Of *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic science & management*, 4(2):58
- Betty bea Septiari (2012). *Infeksi nosokomial*. Penerbit Nuha medica. Jakarta.
- Bougut, A., Niedziadek, J., Koziol-montewka, M., Strzelec-Notwak, D., Blacha, J., Mazurkiewicz, T., Plewik, D. 2014. *Characterization of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus warneri Small-Colony Variants Associates With Prosthetic –Joint Infection*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(Part 2), 176-185. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066068-0>.
- Brink, B., 2013, *Urease test Protocol*. *American Society For Microbiology*. 5 juli 2020)
- Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A 2013. *Medical Microbiology*. 22nd ed. USA : Appleton & Lange. P. 219, 225-227.

- Brooks, Geo F.H, Janets S. Butel, Stephen. *Mikrobiologi kedokteran* . Jawetz Melinick, Eds. 23. Jakarta : EGC. 2010
- Diniatik, 2015, Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Kepel(*Stelechocarpus burahol* (BI) Hook f&Th) Dengan Metode Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 3(1): 1-5.
- Dra. Rr. Sulistiyarningsih, M.Kes., Apt. 2010. Uji kepekaan beberapa sediaan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Multi resisten (PAMR). Laporan penelitian mandiri. Fakultas Farmasi Uviversitas Padjadjaran Jatinangor.
- Elliot., 2013. *Mikrobiologi Kedokteran & Infeksi edisi 4*, diterjemahkan oleh Pedit B.U., 198, Jakarta, EGC.
- Endriani R, Fauzia A and Dona A., 2013. Pola Resistensi Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) terhadap Antibakteri di Pekan Baru, *Jurnal Natur Indonesia*, 12 (2), 131-133.
- Ergina, Siti Nurhayati dan Indarini Dwi Pursitasari. *Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (Agave angustifolia) Yang Diekstraksi Dengan Pealarut Air dan Etanol*. J. Akad, Kim. Pendidikan Kimia ?FKIP-Universitas Tadulako, Palu- Indonesia 94118. 3(3): 165-172, Agustus 2014.
- Ersinta., Kardewi. (2016). Uji efektifitas antibakteri fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Eschericha Coli*. *Jurnal kedoteran dan kesehatan*. 3(2): 106.
- Harti, a.s. 2015. *Mikrobiologi Kesehatan: Peran Mikrobiologi Dalam Bidang Kesehatan* . Yogyakarta : Andi Offset.
- Ika sulistiyowati. 2014. Pencapaian kualitas produk pembersih muka yang diproduksi oleh beberapa salon di Jogjakarta. Skripsi. Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam. Universitas islam Indonesia Jogjakarta.
- Inayatullah, S.,2012. *Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau(Piper betle Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus*. Universitas Islam Negri Syarif Hidayatullah.
- Jawets, E. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi XX*, Diterjemahkan oleh Edi Nugroho dan RF. Maulany. Jakarta Penerbit EGC. 53, 211-238.
- Jawetz., Melnick., Adelberg. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran* . Edisi 25. The Mc Graw-Hill Education and EGC medical Publisher, alih bahasa Widhi A. Jakarta : Buku penerbit kedokteran (EGC). Terjemahan dari : Medical Mikrobiology.

- Karimela, E.J., Ijong, F.G., & Dien, H.A. 2017. Characteristic of *Staphylococcus epidermidis* Isolated Smoked Fish Pinekuhe From Traditionally Processed From Sangihe District. *Jphi*, 20(1), 1-11.
- Khusnul Khotimah., 2016. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain Pada Ekstrak Metanol Daun *Carcica pubescens* Lenne & K. Koch dengan LC/MS (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*). *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Koensoemardiyah, 2010. *Kasiat dan Manfaat Daun Sirih*, Sentra Infomasi. IPTEK, Jakarta.
- Kumar, S.; Pandey, A. *Chemistry and Biology Activites of Flavonoids, the scientific World Journal* . 2013, 1(1):1-16.
- Kursia, S. 2016. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Hijau (Piper betle L) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis. Antibacterial Activity Test Of Ethylacetat Extract Of Green Betle Leaf (Piper betle L.) towards Staphylococcus epidermidis Bact. IJPST*, 3, pp. 72-77.
- Kursia, S., et al 2016. *Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih hijau (Piper betle L.) terhadap bakteri Staphylococcus epidermids. Ijpsst*, 3 (2), pp. 1-6.
- Liza pratiwi, Achmad fudholi Rony martien, Suwidjiyo pramono, 2016. *Ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan kulit manggis (Garcinia mangostana L.) sebagai sumber zat bioaktif penangkal radikal bebas. jurnal of Pharmaceutical science and clinical research*, 2016, 01,71-82.
- Mukhrini, 2014, *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. Jurnal Kesehatan*, 7(2):36-367.
- Munawaroh, E dan Yuzammi. (2017). Keanekaragaman piper (Piperaceae) dan konservansinya Di Taman Nasional Bukit Barisan Selatan, Provinsi Lampung. *Media Koservasi*. Vol, 22 Nomer. 2, 118-128.
- Ngajow, M., Abidjulu, J. dan kamu ; V.S., 2013, Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*, *Jurnal MIPA Unsrat*, 2(2): 128-132.
- Nisa GK, Wahyunanto dan Yusuf H. 2014. Ekstraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan metode Assited Extraction (MAE). *Jurnal Bioprosess Komoditas Tropis*. Vol.2 No 1. Universitas Brawijaya, Malang.

- Nugraheni, Ratna et al. *Infeksi Nosokomial di RSUD Setjonegoro. Kabupaten Wonosobo. Media Kesehatan Masyarakat Indonesia.* 2012;11:94-100.
- Parija, S. C. 2012. *Textbook Of Microbiology and Immunology.* 2nd. Ed. Elsevier. India.
- Pastra, D. A., Melki, M., dan Surbakti, H. 2012. Penapisan bakteri yang bersimbiosis dengan spons jenis *Aplysina* sp sebagai penghasil antibakteri dari perairan pulau Tegal Lampung. *Jurnal Maspari*, 77-82.
- Popi Zeniusa, M. Ricky Ramadhian, Syahrul Hamidi Nasution, Nisa Karima. 2019. *Uji daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap Escherichia coli secara in Vitro.* Majority. Vol 8. No 2. j.l. bumi manti II No. 33 kampung baru, labuhan Ratu, Bandar Lampung.
- Pratiwi, Ni Putu Rahayu Kususma dan I Wayan Muderawan. 2016. Analisis Kandungan Kimia Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) dengan GC-MS. *Prosiding Sminar Nasional MIPA.* Undiksha :304-310.
- Rahmawati, A dan Widya. D. 2013. Karakteristik ekstrak kulit jeruk Bali Menggunakan Metode Ekstraksi Ultrasonik (Kajian Perbandingan Lama Blansing Dan Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* Vol 1 no. 1. P.26-35. Oktober 2013.
- Rukmini., dan Afifah. *Skrining Fitokimia Familia Piperaceae.* Jurnal Biologi dan Pembelajarannya, vol 7 No.1 April 2020. Pp:28-32. e-ISSN: 2406-8659.
- Ryan J Kenneth. *Sherris Medical Microbiology.* Eds 6. USA : MC Graw Hill. 2014.
- Sa'adah, L. (2010). *Isolasi dan identifikasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi L.).* Universitas Islam Negri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Samuelson J, Brooks GF, Butel, Janet S, Morse SA. *Patologi umum penyakit infeksi dalam Mikrobiologi Kedokteran.* EGC. 2010
- Setiabudi R. *Antimikroba lain.* In: *Farmakologi dan terapi.* 5 th ed. Fakultas kedokteran universitas Indonesia :p. 723-8
- Sherwood., dan Lauralee. 2011;19.256-302. *Fisiologi Manusia dari Sel ke sistem.* Edisi ke 6. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta.
- Soekiman, S. 2016. *Infeksi Nosokomial di Rumah Sakit-Hospital Nosocomial Infections.* Buku Pertama. CV. Sagung Seto. Surabaya.

- Suardiani, N., Litaay, M., Budji, RG., Piosambodo, ., Syahribulan and Dwyana, Z, 2015, Potensi Tunikata Rhopaleae sp Sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosymbion Penghasil Antibakteri : *Karakterisasi Isolat, Journal Alam dan Lingkungan*, 6(11):1-10.
- Sukriani dan kursia., *Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (Piper betle L.) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis*. IJPST. Volume 3, Nomer 2, Juni 2016.
- Syahida., D.R.N., 2019, *uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirih hijau (Piper betle L.) terhadap pertumbuhan bakteri Staphylococcus aureus secara in vitro*, Skripsi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.
- Syahrurachman. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara Publishers 2010. Jakarta.
- Tania F, Rukmono P, Erdian D.N, Ety A. *Bakteri penyebab Neonatorum dan Pola kepekaannya terhadap antibiotik*. Seminar Nasional Sains & teknologi V Lembaga Penelitian Universitas Lampung. 19-20 November 2013. In pp.316-328.
- Taofik., et al. 2010. Isolasi dan identifikasi senyawa aktif ekstrak air daun paitan (Thitonia Diversifolia) sebagai bahan insektisida botani untuk pengendalian hama tungau eriophyidae. *Alchemy vol. 2(1): 104-157*
- Todar K. *Pseudomonas*. 2012. <http://textbookofbacteriology.net/cholera.htm>.26 Juli 2012.
- Tognetti L, Martineli C, Berti S, Hercogova J, Lotti T, Leoncini F. 2012. Bacterial Skin and Soft Tissue Infection: Review on the Epidemiology, Microbiology, Aetiopathogenesis and Treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 26(8):931-41.
- Tri, N. F., Tantin, E., & Aju, F. D. W. (2012). Nilamsari Febriana Tri., Ermawati Tantin, F Dwi Warna Aju. 2012. Daya Hambat Ekstrak Buah Apel (Malus Sylvestris Mill). Activity Of Apple peel (Malus sylvestris Mill) Varie. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*, 1-4.
- Trifani., 2012, Ekstraksi pelarut cair-cair, <https://awjee.blog.com/2012/11/24/ekstrak-pelarut-cair-cair/>., Diakses pada tanggal 22 Agustus 2020.
- Vandepitte, J; Verhaegen, J; Engbaek, K; Rohner, P; Piot, P Heuck, C.C. 2011. *Prosedur Laboratorium Dasar untuk Bakteriologi Klinis*. Edisi 2. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta.

- Wahyuni, 2015. Deteksi *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis subklinis pada kerbau perah (*Bubalus bubalis*) di Kabupaten Enrekang. Skripsi. Fakultas kedokteran hewan. Universitas Hasanudin. Makasar.
- Waluyo . 2014. *Mikrobiologi Lingkungan*, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang press.
- Wardhani, A.K., 2012. Uji Antimikroba Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Watson, Rachel, 2012. *Sulfur Indole Motility Media (SIM)* , Available, (juli 2020).
- Wu DC, Chan WW, Matelista AI, Fiorillo L, Lin AN. *Pseudomonas aeruginosa* Skin Infection. Am J Clin Dermatol 2011;12(3) : 158-16.