

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK SIRIH HIJAU (*Piper betle* L) TERHADAP BAKTERI PATOGEN PANGAN

[Antibacterial Activity of Green Sirih (*Piper betle* L) Extract towards Food Pathogens]

Suliantari¹⁾, B. S.L. Jenie²⁾, M. T. Suhartono²⁾ dan A. Apriyantono²⁾

¹⁾ Mahasiswa Pasca Sarjana, IPB – Bogor

²⁾ Staf Pengajar Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fateta – IPB. Bogor

Diterima 7 Februari 2007 / Disetujui 13 Juni 2008

ABSTRACT

Green sirih (Piper betle L) extract were prepared using water, ethanol and ethyl acetate extraction of the dried materials. The extracts were tested for their antibacterial activities against Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Listeria monocytogenes. At concentrations 10-50% the extracts effectively inhibited the growth of all tested bacteria as shown by the clear zones which varied from 7 to 24 mm, while the minimum inhibitory concentration (MIC) varied from 0.1 to 1%. E. coli, S. Typhimurium and S. aureus were more resistance to the green sirih extracts than other tested bacteria. The results showed that in general, ethanol extraction produced the best extract with strong antibacterial activities against E. coli and S. aureus. Analysis of the extract components with GC-MS revealed that sirih extract contained phenol, chavicol, eugenol, caryophyllene, cylene, chalone and others.

Key words: Green Sirih (*Piper betle* L), bioactive compound, antibacterial.

PENDAHULUAN

Dengan pertimbangan kesehatan, konsumen cenderung menghendaki penggunaan bahan-bahan alami makanan seperti penggunaan bahan pengawet, pewarna, flavor dan aditif lainnya maupun pengobatan. Penelitian pemanfaatan bahan-bahan alami dari tumbuh-tumbuhan sebagai bahan antimikroba telah banyak dilakukan diantaranya penelitian daun dan biji lada (Suteja dan Agustina, 1994); ekstrak dan fraksi rimpang lengkuas (Rahaju, 1999); kecombrang (Naufalin et al., 2005); andaliman (Parhusip et al., 2005); sirih (Jenie et al., 2001; Sugiastuti, 2002) dan daun beluntas (Ardiansyah, 2003).

Salah satu tanaman herbal yaitu sirih (*Piper betle* L) telah lama diketahui dan digunakan secara turun temurun untuk pengobatan obat batuk, sakit gigi, penyegar dan sebagainya. Bagian-bagian dari tanaman sirih seperti akar, biji dan daun berpotensi untuk pengobatan tetapi yang paling sering dimanfaatkan untuk pengobatan adalah bagian daunnya.

Menurut Heyne (1987), tanaman sirih ada beberapa jenis, diantaranya adalah sirih Jawa atau sirih hijau berdaun hijau tua, rasanya tajam dan banyak ditanam di Jawa Tengah dan Jawa Timur; sirih banda; sirih cengke: sirih kuning dan sirih hitam.

Pemanfaatan sirih dalam pengobatan tradisional ini disebabkan adanya sejumlah zat kimia atau bahan alami yang mempunyai aktivitas sebagai senyawa antimikroba. Komponen aktif dari sirih terdapat dalam minyak atsiri dan kandungannya dipengaruhi oleh

umur dan jenis daun. Menurut Jenn dan Chou (1997), dalam daun sirih terdapat eugenol dan hidroksikavikol yang mempunyai aktivitas antimikroba sedangkan menurut Duke (2002), dalam daun sirih ditemukan adanya bahan kimia yang mempunyai aktivitas antibakteri yaitu: kavikol, kavibetol, tanin, eugenol, karvakrol, kariofilen dan asam askorbat. Selain hidroksikavikol, ekstrak daun sirih mengandung dan asam- asam lemak seperti asam stearat dan palmitat yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri *S. mutans*. Pada penelitian-penelitian tersebut digunakan daun sirih secara umum tanpa disebutkan spesifikasi jenis daunnya. Sementara itu penelitian Sukarminah (1997) menunjukkan adanya indikasi bahwa jenis daun mempengaruhi tingkat aktivitas antimikroba. Sirih hitam diketahui memiliki aktivitas antimikroba paling kuat, kemudian diikuti oleh sirih hijau, sirih kuning dan sirih merah.

Selain jenis daun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut yang berbeda untuk mengekstrak komponen aktif dari sirih dapat memberikan hasil aktivitas antimikroba yang berbeda pula. Chou dan Yu (1984) menggunakan pelarut kloroform, etanol dan air baik secara sendiri-sendiri atau campuran untuk menguji pengaruh ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan dan produksi aflatoxin *A. parasiticus* dan ternyata ekstrak kloroform dan etanol mempunyai aktivitas antimikotik yang lebih baik. Sukarminah (1997) menggunakan cara destilasi uap dan pelarut etanol untuk memperoleh komponen aktif dari daun sirih baik yang volatil, non volatil maupun campuran

keduanya. Sugiastuti (2002) menggunakan pelarut etanol untuk memperoleh minyak atsiri daun sirih kuning. Shit et al., (1999), ekstrak sirih menggunakan pelarut etil setat dan etanol mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *V. cholerae* Ogawa, *S. aureus*, *Diplococcus pneumoniae* dan *Klebsiella aerogenes* yang lebih kuat pada ekstrak sirih dengan pelarut benzen dan heksan.

Tujuan dari penelitian adalah untuk mempelajari jenis pelarut ekstraksi yang dapat menghasilkan ekstrak sirih hijau dengan aktivitas antibakteri yang kuat, terhadap enam jenis bakteri patogen pangan. Pada penelitian ini digunakan sirih hijau karena selain banyak dan lebih mudah diperoleh dibandingkan sirih hitam. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk menetapkan nilai MIC (*minimum inhibitory concentration*) ekstrak sirih hijau dan mengidentifikasi komponen penyusun ekstrak sirih hijau.

METODOLOGI

Bahan dan kultur bakteri

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau yang diperoleh dari Yogyakarta. Bakteri uji yang digunakan adalah *Bacillus cereus* (FNCC 057), *Staphylococcus aureus*, (FNCC 047) *Listeria monocytogenes* (FNCC 0156), *Pseudomonas aeruginosa* (FNCC 063) dan *Salmonella* Typhimurium (FNCC 0734) yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM; *Escherichia coli* (ATCC) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Seafast (*South East Asia Food and Agricultural Science and Technology*) Center IPB.

Metode

Persiapan daun sirih kering

Daun sirih hijau disortasi, dipisahkan daun dan tangkainya kemudian dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan pengering vakum pada suhu 50°C selama 12 jam sampai diperoleh kadar air 10 %. Daun sirih yang telah kering tersebut selanjutnya dihaluskan sampai diperoleh bubuk halus dan siap diekstrak dengan air ataupun pelarut organik.

Ekstraksi sirih

Bubuk sirih diekstraksi menggunakan tiga jenis pelarut yaitu masing-masing dengan air, etanol dan etil asetat (1: 4) dengan cara dihomogenisasi dalam shaker selama 24 jam dengan kecepatan rotasi 150 rpm. Filtrat-filtrat tersebut kemudian diuapkan dalam rotavapor pada suhu 50° C dan filtrat (etanol dan etil asetat) kemudian dihilangkan sisa pelarutnya dengan gas nitrogen. Ekstrak-ekstrak tersebut kemudian diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* dengan metode difusi sumur. Ekstrak

yang menunjukkan aktivitas penghambatan terkuat akan dipilih untuk penelitian selanjutnya.

Pengujian aktivitas antibakteri (Yin dan Cheng 1997)

Kemampuan aktivitas antibakteri diuji lebih lanjut terhadap enam jenis bakteri meliputi Gram positif dan Gram negatif seperti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur (modifikasi Yin dan Cheng 1997) dengan mengukur diameter penghambatan dari ekstrak tersebut terhadap masing-masing bakteri uji. Media nutrisi agar (25 ml) yang mengandung bakteri uji sebanyak 10⁷ CFU/ml dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan membeku. Setelah membeku, kemudian pada media tersebut dibuat lubang-lubang atau sumur dengan diameter 6 mm. Ke dalam lubang tersebut dimasukkan 60µl ekstrak dengan berbagai konsentrasi (10-50 % (v/v)). Selanjutnya cawan diinkubasi dalam inkubator dan suhu 37°C selama 24 – 48 jam kecuali untuk *L. monocytogenes* inkubasi dilakukan pada suhu kamar.

Penentuan MIC

Penentuan MIC dilakukan dengan modifikasi metode Kubo (1995). Ekstrak sirih hijau dengan beberapa konsentrasi dikontakkan dengan ke enam bakteri uji selama 24 jam dalam inkubator bergoyang (150 rpm) dan dihitung jumlah mikroba pada berbagai pengenceran. Konsentrasi ekstrak sirih hijau yang digunakan dalam penelitian ini bervariasi mulai dari 0.01 % (v/v) sampai 2.5 % (v/v).

Identifikasi komponen ekstrak secara kualitatif (Harbone, 1996)

Identifikasi dilakukan terhadap ekstrak sirih hijau terpilih yang mempunyai aktivitas penghambatan kuat. Pengujian dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui golongan komponen yang terdapat dalam ekstrak sirih hijau. Selain itu terhadap ekstrak terpilih juga dilakukan identifikasi komponen penyusun dengan GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrophotometry)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh jenis pelarut ekstrak sirih hijau

Pemilihan jenis pelarut dengan menggunakan metode difusi sumur terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* menunjukkan bahwa ekstrak sirih hijau yang diperoleh dengan ketiga jenis pelarut yaitu air, etanol dan etil asetat secara umum mempunyai kemampuan menghambat bakteri uji yang beragam (10-24 mm) dan berpengaruh nyata pada selang kepercayaan 95 %. Dari ketiga jenis pelarut yang digunakan, ekstrak dengan air mempunyai kemampuan menghambat bakteri uji terendah disusul kemudian pelarut etil asetat dan etanol.

Ekstrak air mempunyai kemampuan penghambatan terhadap *E. coli* dengan diameter penghambatan 10 mm dan 11.5 mm untuk *S. aureus*. Ekstrak etil asetat mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan diameter penghambatan yang lebih tinggi dari pada ekstrak air yaitu 12.7 mm untuk *E. coli* dan 16 mm untuk *S. aureus*. Dari hasil penelitian ini (Gambar 1), *S. aureus* lebih peka terhadap ekstrak etanol bila dibandingkan dengan *E. coli*. Ekstrak etanol sirih hijau mempunyai kemampuan menghambat tertinggi terhadap *S. aureus* (24 mm) dan terhadap *E. coli* (14 mm). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sukarminah (1997), dimana *S. aureus* lebih dihambat dari pada bakteri uji yang lainnya seperti *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *E. coli* dan *L. monocytogenes*.

Dengan analisis statistik lebih lanjut (uji Duncan), pelarut etanol berbeda nyata terhadap air dan pelarut etil asetat ($p \leq 0.05$). Hasil ini sesuai dengan penelitian dari Chou dan Yu (1985) dimana pelarut etanol memberikan aktivitas antimikotik ekstrak sirih yang baik dan pelarut air mempunyai aktivitas yang lebih rendah terhadap beberapa jenis bakteri (Yang dan Chou, 1997). Dari hasil uji statistik penelitian pada tahap ini, pelarut etanol memberikan perbedaan yang nyata bila dibandingkan dengan pelarut air dan etil asetat, maka untuk penelitian selanjutnya dipilih ekstrak etanol untuk diteliti lebih lanjut.

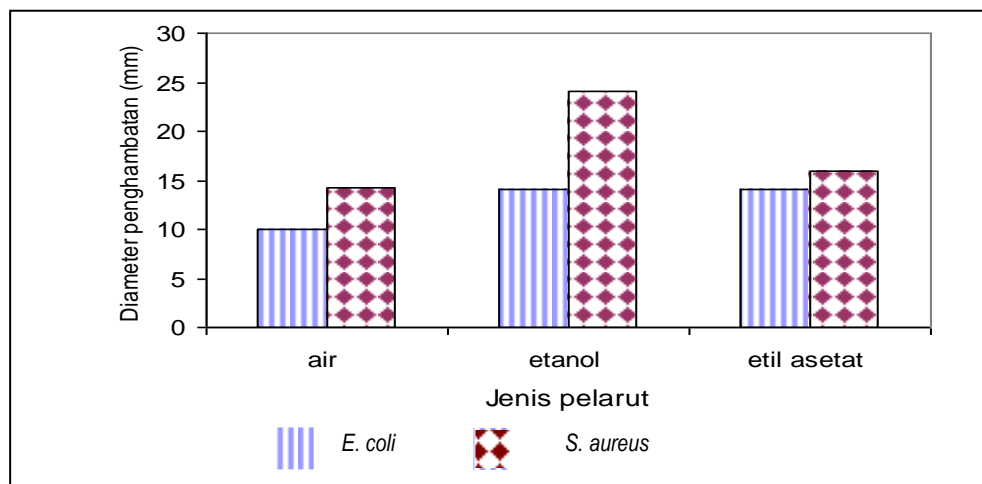
Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap enam jenis bakteri uji dilakukan terhadap ekstrak sirih hijau terpilih dengan daya hambat terkuat yaitu ekstrak etanol

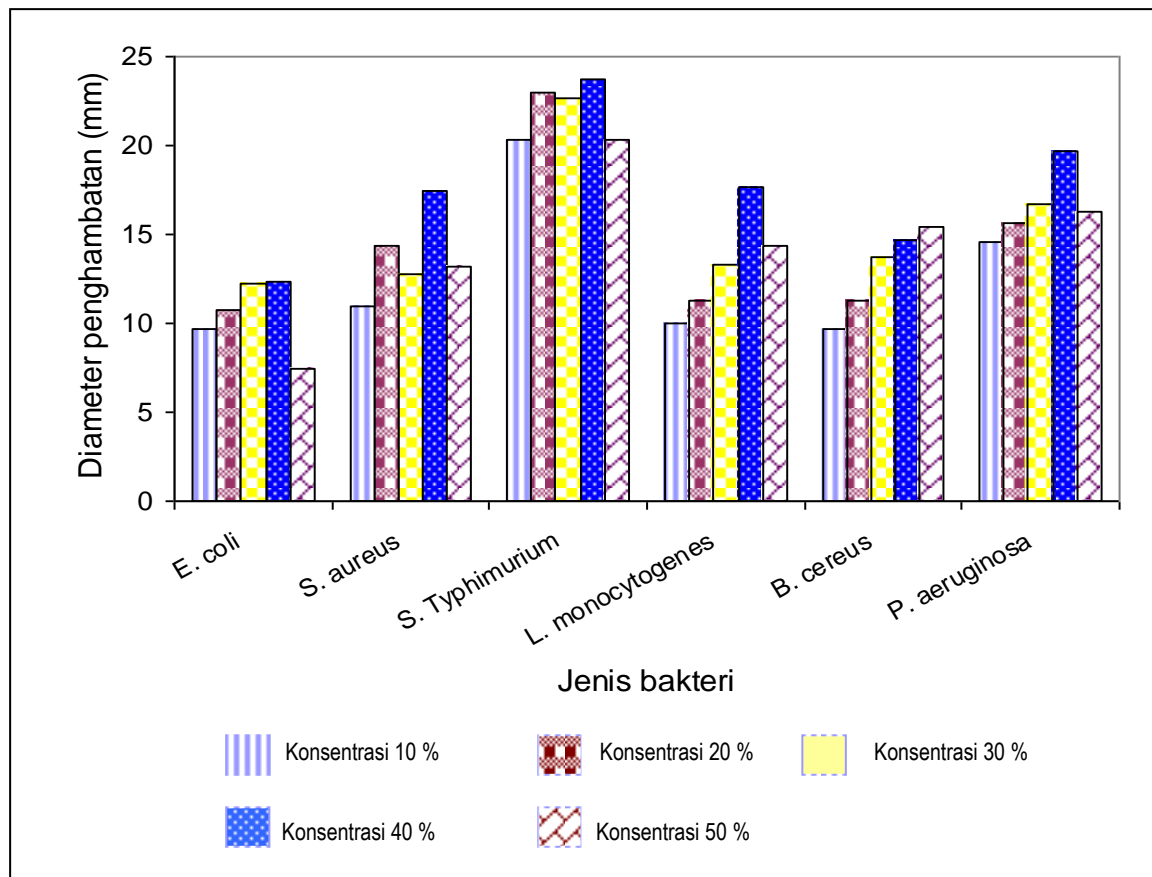
dengan berbagai konsentrasi. Pada Gambar 2 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak sirih hijau maka aktivitas penghambatannya semakin kuat. Ekstrak sirih hijau efektif menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan diameter penghambatan bervariasi antara 7 mm sampai 24 mm (Gambar 2).

Secara umum, bakteri yang paling efektif dihambat dari bakteri Gram negatif adalah *S. Typhimurium* dengan diameter penghambatan 20 – 24 mm dan yang paling tahan adalah bakteri *E. coli* yaitu dengan diameter penghambatan bervariasi antara 7 – 12.3 mm. Terhadap bakteri uji yang lainnya, ekstrak etanol sirih hijau berturut-turut mampu menghambat bakteri *P. aeruginosa* dengan diameter penghambatan antara 14.6 – 19.7 mm ; *S. aureus* (11 mm - 17.5 mm); *L. monocytogenes* (10 sampai 17.6 mm) dan *B. cereus* bervariasi antara 9.7 sampai 15.4 mm. Penelitian dari Naufalin et al., (2005), menunjukkan bahwa ekstrak etanol kecombrang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *P. aeruginosa* dengan diameter penghambatan berkisar antara 11- 15.4 mm.

Menurut Elgayar et al., (2000) ekstrak tumbuh-tumbuhan dapat dikelompokkan berdasarkan diameter penghambatan yang dihasilkan menjadi tiga kategori yaitu tinggi (> 11 mm), sedang (> 6 - < 11 mm) dan rendah (< 6 mm). Dari hasil yang diperoleh maka ekstrak sirih hijau dapat digolongkan ke dalam bahan yang mempunyai kemampuan menghambat sedang sampai tinggi tergantung dari konsentrasi yang digunakan.



Gambar 1. Pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi ekstrak sirih hijau terhadap aktivitas penghambatan bakteri uji

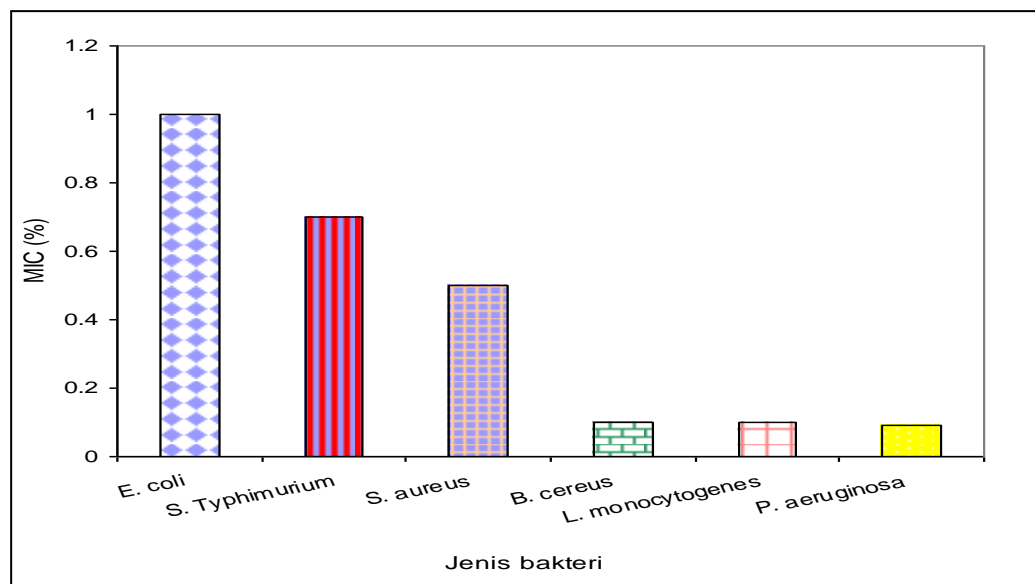
Dari Gambar 2 terlihat, konsentrasi ekstrak sirih hijau dengan kemampuan menghambat tinggi adalah pada konsentrasi 40 % sehingga dalam penelitian selanjutnya digunakan konsentrasi ekstrak sirih 40 %. Kemampuan menghambat dari ekstrak etanol pada konsentrasi 40 % memberikan pengaruh yang nyata pada semua bakteri uji ($p \leq 0.05$). Hasil analisis statistik lebih lanjut (uji Duncan) diketahui bahwa aktivitas antibakteri ekstrak terhadap *B. cereus*, *L. Monocytogenes* dan *S. aureus* tidak berbeda nyata. Aktivitas antibakteri ekstrak terhadap *S. Typhimurium* adalah tertinggi dan berbeda nyata terhadap bakteri uji lainnya ($p \leq 0.05$).

Konsentrasi minimum penghambatan (MIC)

Konsentrasi minimum penghambatan (MIC) dari ekstrak sirih hijau terhadap ke enam jenis bakteri uji yang digunakan bervariasi antara 0.1 sampai 1 % seperti terlihat pada Gambar 3. Dari hasil penelitian yang diperoleh ternyata untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji Gram positif dan gram negatif dibutuhkan ekstrak etanol daun sirih hijau dengan konsentrasi minimum penghambatan (MIC) bervariasi.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa bakteri Gram positif yang paling tahan adalah *S. aureus* dengan nilai MIC konsentrasi penghambatan 0.5 %; dari bakteri Gram negatif adalah *S. Typhimurium* dengan konsentrasi untuk penghambatan adalah minimum 0.7 % dan *E. coli* 1 %. Pertumbuhan dari bakteri uji yang lainnya yaitu *B. cereus* dan *L. monocytogenes* dapat dihambat pertumbuhannya pada konsentrasi minimum penghambatan yang sama yaitu pada konsentrasi 0.1 % sedang bakteri *P. aeruginosa* dapat dihambat pada dosis MIC 0.09

Menurut Sukarminah (1997), ekstrak sirih yang diperoleh dengan menggunakan pelarut etanol mempunyai efek bakterisidal terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan *S. Typhimurium* pada konsentrasi 0.025 % sampai 0.1 % (v/v). Sedangkan penelitian dari Sugiastuti (2002), ekstrak etanol sirih kuning mempunyai konsentrasi minimum penghambatan (MIC) 2 mg/ml (b/v) terhadap *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *P. aeruginosa* dan 3 mg/ml terhadap bakteri *S. aureus*.



Gambar 3. Konsentrasi minimum penghambatan (MIC) ekstrak sirih hijau terhadap bakteri uji

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Dorman dan Dean (2000) dan Nalina dan Rahim (2007). Dari penelitian yang dilakukan Dorman dan Dean (2000), diperoleh hasil bahwa minyak atsiri *O. vulgare ssp hirtum*, *P. nigrum*, *S. aromaticum* dan *M. fragrans* ternyata memberikan efek penghambatan yang sama antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Dari beberapa ekstrak misalnya minyak atsiri dari pala (*Myristica fragrans*) tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Enterobacter aerogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian dari Nalina dan Rahim (2007) menunjukkan hasil bahwa ekstrak sirih efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Streptococcus mutans*.

Identifikasi komponen ekstrak

Secara kualitatif ekstrak etanol sirih hijau positif mengandung komponen aktif seperti alkaloid, tanin, fenolik dan steroid (Tabel 1). Dari hasil analisis secara kualitatif (Tabel 1), didalam ekstrak sirih hijau terdapat komponen yang positif kuat yaitu fenolik dan senyawa ini diduga berperan sebagai senyawa antimikroba. Menurut Harapini et al., (1996) senyawa yang terkandung dalam ekstrak sirih yang diduga berperan sebagai antimikroba adalah senyawa fenolik. Selain fenolik, dari ekstrak sirih senyawa-senyawa yang lain seperti alkaloid, tanin dan steroid juga dapat berfungsi sebagai bahan antibakteri (Cowan, 1999).

Hasil analisis ekstrak etanol sirih hijau dengan GC-MS menunjukkan bahwa di dalam ekstrak sirih hijau terdapat kavikol, eugenol, karyofilen (α & β), 2 – metoksi-4- (1-propenil) fenol, α – Kopaen, silen (α & β – silen) dan kaleren. Komponen yang terdapat dalam ekstrak sirih hijau umumnya adalah termasuk dalam komponen fenolik dan hasil ini ada beberapa komponen

yang sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Harapini et al., (1996). Dengan cara destilasi terhadap daun sirih hijau Harapini et al., (1996) memperoleh hasil bahwa dalam ekstrak sirih hijau tersebut ditemukan adanya komponen-komponen seperti β linalool, α -alilfenol, 2-metoksi -4-(1-propenil) fenol, metil eugenol, isokaryofilen, α -karyofilen, kopana, bisiklo-7,2, o -undek-4-en-4-11-11-trimetil-8-metil-en, elemen dan α -farnesen. Dari penelitian Nalina dan Rahim (2007) diketahui bahwa ekstrak sirih mengandung hidroksikavibetol yang mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu ditemukan juga adanya asam seperti asam stearat, palmitat yang juga dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Dalam daun sirih terdapat komponen aktif hidroksikavikol spektrum penghambatan yang luas terhadap bakteri patogen seperti *Raistonia*, *Xanthomonas* dan *Erwinia* (FFTC, 2003). Suriyaphan (2003), dengan cara destilasi dengan menggunakan pelarut kloroform didalam ekstrak sirih ditemukan adanya kavibetol dan linalol.

Tabel 1. Hasil analisis komponen aktif ekstrak etanol sirih

Komponen	Hasil
Alkaloid	++
Tanin	++
Flavonoid	-
Fenolik	+++
Triterpenoid	-
Steroid	+

Keterangan : - : negatif + : positif lemah
 ++ : positif +++ : positif kuat

Fenol adalah substansi yang mempunyai cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dapat dibedakan dalam fenol sederhana dan asam

fenol. Yang termasuk dalam golongan fenol dan mempunyai kemampuan sebagai bahan antimikroba diantaranya adalah katekol, pirogalol, quinon, eugenol, flavon dan flavonoid, tanin, kumarin dan lainnya. Fenol dapat berperan sebagai racun bagi mikroba yaitu dengan menghambat aktivitas enzim, berikatan dengan gugus sulfhidril dan protein. Flavonoid dapat berfungsi sebagai bahan antimikroba dengan membentuk ikatan kompleks dengan dinding sel dan merusak membran. Flavonoid dari daun *Pelargonium radula* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 6538 P, *E. coli* 923 MFBF dan *Bacillus* sp (Pepeljinjak et al., 2005).

Tanin adalah polimer fenolik yang biasanya digunakan sebagai bahan penyegar, mempunyai sifat antimikroba dan bersifat racun terhadap khamir, bakteri dan kapang. Kemampuan tanin sebagai bahan antimikroba diduga karena tanin akan berikatan dengan dinding sel bakteri sehingga akan menginaktifkan kemampuan menempel bakteri, menghambat pertumbuhan, aktivitas enzim protease dan dapat membentuk ikatan kompleks dengan polisakarida (Cowan, 1999). Alkaloid mempunyai pengaruh sebagai bahan antimikroba terhadap *Entamoeba* sp (penyebab diare) dan mekanisme penghambatannya adalah dengan mengkelat DNA.

KESIMPULAN

Beberapa simpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian adalah bahwa ekstrak etanol sirih hijau mempunyai aktivitas sebagai bahan antibakteri terbaik dibandingkan ekstrak air dan etil asetat baik terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif dengan konsentrasi minimum penghambatan (MIC) bervariasi antara 0.1 sampai 1 %. Bakteri yang paling peka terhadap ekstrak etanol sirih berturut-turut adalah *P. aeruginosa*, *B. cereus* dan *L. monocytogenes* dan sedangkan bakteri yang paling tahan berturut-turut adalah *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *S. aureus*. Dalam ekstrak sirih hijau dengan menggunakan GC MS ditemukan beberapa komponen yang diduga mempunyai aktivitas sebagai bahan antimikroba yaitu kavikol, eugenol, karyofilen (α & β), 2-metoksi-4-(1-propenil) fenol, α -Kopaen, silen (α & β - silen) dan kaleren.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah. 2003.** Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (*Plucea indica* L.). Tesis Program Pasca Sarjana IPB. Bogor
- Chia M.L., J. K. Preston dan C. I. Wei. 2000.** Antibacterial Mechanism of Allyl Isothiocyanate. J. of Food Protection 63 (6): 727 – 734.
- Chou C.C dan Yu R.C. 1985.** Effect of *Piper betle* L and Its Extracts on The Growth And Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. Proc. Natl Sci Coune Repub China B. 1984 Jan; 8 (1): 30-35. http://w.w.w. ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retieve&dbList_uids-6531413&dopt=Abstract.
- Cowan M.M. 1999.** Plant Product as Antimicrobial Agents. J, Microbiology Reviews. 12 (4) : 564-582.
- Duke's. 2002.** Phytochemical and Ethnobotanical Database. <http://www.dr.duke's.phytochemical and ethnobotanicaldatabase.com>. 21/8/2002.
- Elgayyar M.; F. A. Draughon , D. A. Golden dan J. R. Mount. 2000.** Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. J. of Food Protection 64 (2): 1019-1024.
- Harapini M; A. Agusta dan R. D. Rahayu (1996).** Analisis Komponen Kimia Minyak Atsiri Dari Dua Macam Sirih (Daun Kuning dan Hijau). Prosiding Simposium Nasional I Tumbuhan Obat dan Aromatika. Bogor 10-12 Oktober 1995.
- Harbone J.B. 1996.** Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerjemah Padmawinata K dan Sudiro I. ITB Bandung.
- Jenie B. S. L. , N. Andarwulan, N. L. Puspitasari Nienaber dan L. Nuraida. 2001.** Antimicrobial Activity of *Piper betle* Linn Extract Towards Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms. <Http://ift. Confex.com // ift / 2001 / technoprogram / paper.9068. htm>.
- Kubo I, Muroi H dan Kubo A. 1995.** Antibacterial Activity of Long-chain Alcohols Against *Streptococcus mutans*. J. Agric. Food Chem 40 (6): 999- 1003.
- Nalina T dan Z. H. A Rahim. 2007.** The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L . and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans*. American Journal of Biotechnology and Biochemistry 3 (1) : 10-15.
- Naufalin R, B.S.L. Jenie, F. Kusnandar, M. Sudarwanto, H. Rukmini. 2005.** Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bunga Kecombrang Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan. Jurnal Teknol. Dan Industri Pangan, Vol. XVI. No 2. 2005.
- Parhusip A.J.N. , B.S.L. Jenie, W.P. Rahayu dan Yasni S. 2005.** Pengaruh ekstrak andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) terhadap permeabilitas dan hidrofobisitas *Bacillus cereus*. Jurnal Teknol. Dan Industri Pangan, Vol. XVI. No 1. 2005.
- Pepeljinjak S., Z. Kalodera dan M. Zovko. 2005.** Antimicrobial activity of Flavonoid from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Herit. Acta Pharm 55 (2005) 431-435.

- Rahaju W.P. 1999.** Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Rimpang Lengkuas (*Alpinia galangan* L Swartz) Terhadap Mikroba Patogen dan Perusak Makanan. Disertasi. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Sugiastuti S. 2002.** Kajian Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L) Pada Daging Sapi Giling. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Sukarminah . 1997.** Kajian Sifat Antimikroba Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*, Linn) Terhadap Pertumbuhan Mikroba Perusak Dan Patogen Makanan. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Suriyaphan O. 2003.** Identification of Key Aroma Component of *Piper betle* L. Leaf. <http://ift.confex.com/ift/2003/technoprogram/paper18487.htm>. 15 Juni 2007.
- Suteja L dan Agustina. 1994.** Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Bioaktif Antimikroba Dalam Biji dan Daun Lada. JKT1, Vol 4- No. 2. Desember. 1994.
- Yang J.N. dan C.C. Chou. 1997.** Antimicrobial Activity of Various Solvent Extracts of Betel Quid Ingredients. Food Science, Taiwan; 24 (5) : 497-505.
- Yin M.C. dan W.S. Cheng. 1977.** Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by Some Herbs and Spices. J. of Protections 61 (1): 123-125