

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) terhadap Bakteri pada Luka Diabetes Mellitus Secara invitro

Antibacterial Activity Test Of Green Betel Leaf Extract (*Piper betle* L.) and Red Betel Leaf (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) Against Bacteria In Diabetes Mellitus Wounds Invitro

Siti Raudah¹, Rifky Saldi A. Wahid², Huzaimah³,

^{1,2}Medical Laboratory Technology Study Program, ITKES Wiyata Husada Samarinda

³Microbiology Laboratory, RSUD Abdul Wahab Syahrani Samarinda

INTISARI

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dapat digunakan sebagai obat tradisional seperti antihiperglikemia, antibakteri dan anti diabetes. Kandungan senyawa aktif pada tanaman ini sebagai antibakteri adalah flavonoid, tanin, alkaloid, dan triterpenoid. Diabetes mellitus merupakan penyakit dengan kenaikan kadar glukosa darah, menimbulkan berbagai komplikasi seperti luka pada kaki. Bila tidak dirawat menjadi ulkus gangren dan menjadi tempat yang optimal untuk pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas daun sirih hijau dan daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri pada luka diabetes melitus secara invitro. Ekstrak daun sirih diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dan dibuat sebanyak 5 perlakuan yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Metode pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi *paper disk*. Analisis data yang digunakan adalah *Uji t*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang ditemukan pada kultus pus luka adalah *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis*. Uji aktivitas ekstrak daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri pada luka penderita diabetes mellitus yaitu menghambat pertumbuhan menghambat pertumbuhan MRSA, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 20% dan *Staphylococcus epidermidis* dimulai pada konsentrasi 40%. Sedangkan aktivitas ekstrak daun merah dalam menghambat pertumbuhan *Enterobacter faecalis* dimulai pada konsentrasi 20%, MRSA, *Staphylococcus epidermidis* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 40%, serta *Klebsiella pneumonia* dimulai pada konsentrasi 60%. Berdasarkan Uji Test of Between-Subjects Effect Ekstrak daun sirih hijau lebih mampu/cepat menghambat pertumbuhan bakteri pada luka diabetes mellitus secara invitro

Kata Kunci : Sirih hijau, Sirih merah, bakteri, luka diabetes mellitus

ABSTRACT

Green betel leaves (*Piper betle* L.) and red betel leaves (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) can be used as traditional medicines such as antihyperglycemic, antibacterial and anti-diabetic. The content of active compounds in this plant as antibacterial are flavonoids, tannins, alkaloids, and triterpenoids. Diabetes mellitus is a disease with increased blood glucose levels, causing various complications such as foot injuries. If left untreated it becomes a gangrenous ulcer and becomes an optimal site for bacterial growth. This study aims to look at the activity of green betel leaves and red betel leaves on bacterial growth in diabetes mellitus wounds in vitro. Betel leaf extract was obtained by maceration using methanol solvent and 5 treatments were made, namely concentrations of 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. Antibacterial activity testing method with paper disk diffusion method. The data analysis used is the t test. The results showed that the bacteria found in the wound pus cultus were Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, and *Proteus mirabilis*. Test the activity of green betel leaf extract on bacterial growth in wounds of patients with diabetes mellitus, namely inhibiting the growth of inhibiting the growth of MRSA, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* starting at a concentration of 20% and *Staphylococcus epidermidis* starting at a concentration of 40%. While the activity of red leaf extract in inhibiting the growth of *Enterobacter faecalis* started at a concentration of 20%, MRSA, *Staphylococcus epidermidis* and *Proteus mirabilis* started at a concentration of 40%, and *Klebsiella pneumonia* started at a concentration of 60%. Based on the Test of Between-Subjects Effect Green betel leaf extract is more able/faster to inhibit the growth of bacteria in diabetes mellitus wounds in vitro

Keywords: Green betel, Red betel, bacteria, diabetes mellitus wound

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus merupakan sekelompok kelainan heterogen yang ditandai oleh kenaikan kadar glukosa darah atau hiperglikemia (Goyal, et.al, 2020), disertai dengan kelainan metabolik akibat gangguan hormonal, dan menimbulkan berbagai komplikasi akut serta kronik. Tahun 2021, International Diabetes Federation (IDF) memperkirakan penderita Diabetes mellitus mencapai 537 juta orang dengan rentang usia 20 – 79 tahun dan Kasus diabetes mellitus akan meningkat menjadi 728 juta pada tahun 2045. Diabetes dapat menyebabkan 6,7 juta kematian atau 1 tiap 5 detik. Indonesia peringkat ke 5 diantara 10 negara dengan jumlah penderita diabetes mellitus sebanyak 19,47 juta, berarti diabetes prevalensi sebesar 10,6%. Penderita diabetes berisiko lebih tinggi terkena infeksi kaki diabetik disebabkan oleh bakteri dan mikroba lainnya (Koh *et al.*, 2012). Penelitian di India menunjukkan 30,4% dari penderita diabetes mengalami infeksi terutama luka pada kaki (Rawat *et al.*, 2012).

Penderita diabetes dapat berkembang menjadi ulkus kronis dan dapat diamputasi jika tidak segera tertangani (Won *et al.*, 2014). Kaki diabetik merupakan komplikasi diabetes mellitus (DM) yang serius. Sekitar 25% penderita diabetes mellitus memiliki resiko kaki menjadi borok akibat peningkatan infeksi sebesar 40 – 80% (Rawat *et al.*, 2012). Bakteri penyebab gangren diabetik umumnya berasal dari pola bakteri polimikrobial yaitu gabungan bakteri gram positif dan gram negatif serta kuman anaerob (Anggriawan dkk 2014). Bakteri yang ditemukan pada luka penderita diabetes mellitus adalah *Staphylococcus aureus* (Perim, 2015), *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Enterobacter* (Utami, 2018; Nurwahidah, 2018 dan Novelni dkk, 2019). Adanya bakteri pada dasar luka dapat menghambat aktivitas fagositosis neutrofil polimorfonuklear dalam proses penyembuhan luka (Redel, 2013). Bakteri yang paling banyak ditemukan berturut-turut. *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas* sp. (Nur and Marissa, 2016).

Tanaman obat dapat dimanfaatkan sebagai tanaman yang memiliki kemampuan untuk menyembuhkan penyakit (Oktriandana, 2014). Tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) dan sirih merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) merupakan tanaman yang dikenal mempunyai banyak khasiat seperti antidiabetes, aktivitas imunomodulator, aktivitas pelindung hepato, sitotoksitas/Potensi antikanker (Bhalerao *et al.*, 2013), antimikroba (Widyaningtyas et.al 2014), antibakteri, antijamur, dan antiseptic (Umar *et al.*, 2018) sehingga komponen tersebut dibutuhkan untuk menghambat aktivitas bakteri. Adapun Khasiat tanaman sirih tersebut sebagai

antimikroba dan antibakteri, berasal dari kandungan berbagai senyawa aktif hasil metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, phenol, tanin dan saponin (Patil *et al.*, 2015)

Ekstrak sirih hijau dan merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan negative (Nouri, *et.al*, 2014) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis* dan *Escherichia coli* (Hartini *et al.*, 2018). Ekstrak methanol sirih hijau menunjukkan zona hambat sampai 26 hingga 34 mm dan daya hambat ekstrak lebih besar pada bakteri gram positif daripada bakteri gram negatif (Valle *et.al*, 2015). Subashkumar dkk (2013), menyatakan terdapat aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau pada *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus faecalis* menggunakan metode difusi cakram dan difusi sumur, sedangkan metode yang sama oleh (Agarwal *et al.*, 2012) Agarwal *et al.* (2012), pada patogen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dan Chakraborty dan Shah (2011) pada *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Proteus vulgaris*, juga menggunakan metode difusi sumur. Ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas mikroba dalam menghambat antibakteri aktivitas terhadap, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Rinanda dkk, 2012), dan *Enterococcus faecalis* (Pasril dan Yuliansanti, 2014). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Peneliti ingin melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah terhadap bakteri pada luka penderita diabetes mellitus.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Ekstraksi daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun sirih merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) dilakukan dengan metode maserasi, metode pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei – Agustus 2021. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Unmul Samarinda dan Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Abdul Wahab Syahrani Samarinda.

Populasi dan Sampel Penelitian

Tanaman daun sirih hijau dan daun sirih merah yang diperoleh dari Kecamatan Samarinda Ulu, Kota Samarinda, Kalimantan Timur. Sampel daun sirih hijau dan daun sirih merah diambil secara acak pada bulan Maret 2021. Daun sirih hijau dan daun sirih merah yang dipakai adalah berwarna hijau bersih, segar, dan bebas dari penyakit.

Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat bakteri yang ditemukan pada luka penderita diabetes mellitus.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jarum ose, pipet ukur, tabung reaksi, labu ukur, erlemeyer, corong, rak tabung, batang pengaduk, cawan Petri, mikropipet, lampu spiritus, botol gelap, gelas ukur, pinset, kapas lidi steril, timbangan analitik, *densi check*, oven, *rotary evaporator*, autoklaf, kertas saring, dan *Bio Safety Cabinet* (BSC).

Bahan yang digunakan sebagai sampel adalah ekstrak metanol daun sirih hijau dan daun sirih merah masing masing dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% serta kloramfenicol. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian adalah yang ditemukan pada luka penderita diabetes mellitus. Media yang

digunakan dalam penelitian ini adalah blood agar, mac conkey agar, media uji biokimia dan mueller hinton agar (MHA)

Prosedur Kerja

1. Determinasi tanaman sirih hijau dan sirih merah

Determinasi Tanaman sirih hijau dan sirih merah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Mulawarman Samarinda.

2. Pembuatan ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah

Masing masing daun sirih hijau dan daun sirih merah dipotong potong dan ditimbang terlebih dahulu sebelum dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Daun sirih hijau dan daun sirih merah yang sudah kering kemudian ditimbang lagi sebelum diserbuk dan selanjutnya dimaserasi menggunakan metanol selama 3 hari. Ekstrak disaring untuk memisahkan antara ekstrak dan ampas, kemudian ekstrak yang sudah disaring dimasukkan kedalam rotari evaporator untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak. Ekstrak yang tersisa akan diuapkan dengan cara di kering anginkan hingga ekstrak menjadi pasta

3. Uji bebas alkohol ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah

Ekstrak ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tercium bau ester (etil asetat) berarti ekstrak etanolik daun sirih hijau dan daun sirih merah sudah tidak ada alkohol.

4. Uji flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa serbuk Mg dan larutan HCl pekat. Hasil positif jika terbentuk warna larutan menjadi merah tomat atau jingga. Hal ini menandakan adanya flavonoid.

5. Uji alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 gr dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2N dan dua tetes pereaksi Dragendroff. Hasil positif jika terdapat endapan jingga atau coklat pada tabung reaksi, hal ini menandakan adanya alkaloid.

6. Uji fenol

Ekstrak sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes air panas dan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%. Hasil positif akan terbentuk warna hijau atau biru atau ungu menandakan adanya fenol.

7. Uji Steroid

Ekstrak dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Kemudian ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Hasil positif akan terbentuk warna hijau kebiruan menandakan adanya steroid.

8. Uji Triterpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Kemudian ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Hasil positif jika terbentuk cincin kecoklatan menunjukkan adanya triterpenoid.

9. Uji saponin

Ekstrak sebanyak 0,5 ml dimasukan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 ml aquadest panas. Kemudian didinginkan dan dikocok selama 10 menit. Hasil positif jika terdapat buih, hal ini menunjukkan adanya saponin.

10. Uji tanin

Ekstrak dimasukan ke dalam 2 tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan 2 ml FeCl_3 2%. Hasil positif jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menandakan adanya tanin.

11. Identifikasi Bakteri Pada Luka (Pus) Penderita Diabetes Mellitus

Hapusan atau swab yang terdapat pada kultur swab ditanam pada media blood agar dan mac conkey agar yang kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, jika terdapat pertumbuhan dari kuman maka dilakukan pengecatan gram dan uji biokimia untuk identifikasi bakteri.

12. Standarisasi Suspensi Bakteri menggunakan *Mc. Farland*

Diambil satu ose koloni bakteri dari media kultur masing masing bakteri, kemudian disuspensikan ke dalam NaCl 0,9% steril hingga kekeruhannya sama dengan standard yaitu 0,5-0,63 Mac Farland.

13. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

Metode kerja pengujian antibakteri dengan cara difusi yaitu kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dengan standar kekeruhannya yaitu 0,5 *Mc. Farland*. Kemudian diinokulasikan merata pada media Muller Hilton Agar (MHA) dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya, diletakkan *paper disc* yang sudah ditetesi dengan ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah masing-masing 20 mikron dengan konsentrasi 0%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% diatas medium MHA yang sudah diinokulasi masing masing bakteri. Perlakuan ini juga dilakukan pada kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol Kloramphenicol. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Diamati ada tidaknya zona bening di sekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya dengan jangka sorong atau penggaris. Penentuan kategori respon zona hambat sebagai berikut Davis dan Stout (1971) dalam Sumiyati (2017) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar yaitu: Kategori sangat kuat: 20 mm atau lebih, Kategori Kuat: 10 mm – 19 mm, Kategori sedang: 5 mm – 10 mm, Kategori lemah: 5 mm dan Sensitive: >18 mm, Intermediate: 13 mm – 17 mm, Resistensi : <14 mm.

14. Analisis Data

Analisis univariat digunakan presentasi, hasil dari setiap variabel ditampilkan dalam bentuk distribusi frekuensi, sehingga dapat mengetahui karakteristik atau gambaran dari setiap variabel. Analisis bivariat digunakan untuk mencari hubungan dan membuktikan hipotesis dua variabel). Uji statistik yang digunakan adalah *One-way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Pada penelitian ini pengolahan data menggunakan program software pengolahan data statistik (SPSS 20), yang nantinya akan diperoleh nilai p. Nilai p akan dibandingkan dengan nilai α

HASIL DAN PEMBAHASAN**Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa**

Identifikasi kandungan senyawa pada ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun sirih (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) merah bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang berada didalam ekstrak metanol daun sirih hijau dan daun sirih merah. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.)

No	Metabolit Sekunder	Hasil Analisa	Keterangan
1.	Flavonoid	Positif (+)	Larutan hijau kemerahan
2.	Kuionon	Negatif (-)	Larutan hijau kehitaman
3.	Alkaloid	Positif (+)	Tidak ada endapan orange
4.	Fenolik	Positif (+)	Larutan hijau tua
5.	Steroid	Negatif (-)	Larutan hijau
6.	Triterpenoid	Negatif (-)	Larutan hijau
7.	Saponin	Negatif (-)	Larutan Keruh
8.	Tanin	Positif (+)	Larutan kehitaman

Tabel 2. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav)

No	Metabolit Sekunder	Hasil Analisa	Keterangan
1.	Flavonoid	Negatif (-)	Larutan hijau
2.	Kuinon	Negatif (-)	Larutan hijau kehitaman
3.	Alkaloid	Positif (+)	Terdapat endapan orange
4.	Fenolik	Positif (+)	Larutan hijau tua
5.	Steroid	Negatif (-)	Larutan hijau
6.	Triterpenoid	Positif (+)	Terdapat cincin kecoklatan
7.	Saponin	Negatif (-)	Larutan keruh
8.	Tanin	Positif (+)	Larutan kehitaman

Identifikasi Bakteri Pada Luka Penderita Diabetes Mellitus

Identifikasi bakteri pada luka pada penderita diabetes mellitus, dengan melakukan swab pus pada luka tersebut. Kemudian diisolasi pada media Blood Agar dan Mac Conkey Agar, jika terdapat pertumbuhan dari bakteri maka dilakukan pengecatan gram untuk tahap identifikasi awal bakteri selanjutnya penanaman pada media uji biokimia bakteri untuk dilakukan identifikasi bakteri. Adapun identifikasi bakteri yang ditemukan pada luka penderita diabetes mellitus dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Bakteri Pada Kultur Pus Pada Luka Penderita Diabetes Mellitus di RSUD Abdul Wahab Syahrani Samarinda

No	Spesies Bakteri	Keterangan
1	<i>MRSA</i>	Gram (+)
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram (+)
3	<i>Enterobacter faecalis</i>	Gram (+)
4	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Gram (-)
5	<i>Proteus mirabilis</i>	Gram (-)

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Cakram

Hasil pengujian antibakteri ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah terhadap bakteri *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis* menunjukkan adanya daya hambat. Adanya daya hambat dibuktikan dengan adanya zona jernih di sekitar disk yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil pengukuran diameter zona hambat pengaruh ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah zona hambat pada masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada tabel 4 dan 5.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pada Luka Diabetes Mellitus Secara Invitro.

Spesies Bakteri	Zona Hambat (mm)						
	Konsentrasi Ekstrak						
	20%	40%	60%	80%	100%	Kontrol Negatif	Kontrol Positif
<i>MRSA</i>	12,3	14	16,3	18	18,3	0	26,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9,7	12,7	14,3	15,7	17,7	0	23,7
<i>Enterobacter faecalis</i>	18,0	20,0	21,7	23,0	24,0	0	0
<i>Klebsiella pneumonia</i>	18,7	20,3	23,0	24,7	26,7	0	27,0
<i>Proteus mirabilis</i>	16,3	18,3	20,0	21,3	23,7	0	22,7

Tabel 5. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pada Luka Diabetes Mellitus Secara Invitro

Spesies Bakteri	Zona Hambat (mm)						
	Konsentrasi Ekstrak					Kontrol Negatif	Kontrol Positif
	20%	40%	60%	80%	100%		
<i>MRSA</i>	9,3	11	12,3	13,7	15,3	0	23,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9,0	10,7	13,0	14,3	15,3	0	23,0
<i>Enterobacter faecalis</i>	13,3	16,0	17,7	19,3	20,7	0	0
<i>Klebsiella pneumonia</i>	7,3	9,3	12,3	14,3	16,0	0	27,7
<i>Proteus mirabilis</i>	8,7	11,7	13,7	15,3	16,7	0	22,3

Pada Tabel 3 dalam penelitian ini, bakteri yang ditemukan pada luka diabetes mellitus adalah *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis*. Bakteri MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis* merupakan bakteri gram positif, sedangkan *Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis* merupakan bakteri gram negatif. Hal ini didukung oleh penelitian Reygaert (2013), bahwa Bakteri paling umum yang dapat diisolasi dari infeksi kaki penderita diabetes mellitus adalah kokus Gram positif maupun Gram negatif seperti grup Enterobacteriaceae. Penelitian Sugireng dan Rosdarni (2020) menemukan MRSA pada luka penderita diabetes mellitus. Adapun dalam penelitian Shanmugam, Jeya and Linda (2013) ditemukan Bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pyogenes*, dan *Enterococcus* spp dan bakteri gram negatif *Escherchia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* Spp. Sedangkan penelitian Jain and Barman (2017) di India, pada penderita ulkus diabetik ditemukan *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Acitenobacter*, *Staphylococcus*, dan *Enterococcus*. Perbedaan bakteri yang ditemukan kemungkinan disebabkan karena lokasi swab yang berbeda dan sampel yang berbeda. Jumlah sampel tidak proporsional dalam hal derajat luka, jenis luka, luas luka sehingga memungkinkan terdapat perbedaan jenis bakteri pada lokasi dan luas luka yang berbeda (Nurwahidah dkk, 2018)

Bakteri *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan strain bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik Methicillin (Suresh, 2011). MRSA memiliki potensi menginfeksi luka diabetes mellitus hingga lima kali lipat. *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri flora normal komensalisme dan bersifat komensalime pada manusia. Akan tetapi *Staphylococcus epidermidis* dapat berkolonisasi dan invasive menjadi patogen oportunistik terkait erat dengan kemampuan pembentukan biofilm spesies tersebut (Nguyen, Park and Otto, 2017). *Enterococcus faecalis* memiliki faktor virulensi seperti kemampuannya dalam pembentukan kolonisasi pada *host*, dapat bersaing dengan bakteri lain, resisten terhadap mekanisme pertahanan *host*, menghasilkan perubahan patogen baik secara langsung melalui produksi toksin atau secara tidak langsung melalui rangsangan terhadap mediator inflamasi (Marsa, 2019). *Klebsiella* dan *Proteus* merupakan bakteri gram negatif lebih sering menyebabkan infeksi dan biasanya pada keadaan infeksi yang berat disertai adanya jaringan nekrotik atau gangrene (Decroli dkk, 2008). Bakteri ini merupakan bakteri anaerob, merupakan jenis bakteri yang umumnya bersifat pathogen, salah satunya menyebabkan infeksi ulkus diabetikum.

Pada tabel 4 dan 5 menunjukkan hasil pengukuran zona hambat yaitu aktivitas ekstrak daun sirih hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan kategori David & Stout dan kontrol kloramfenicol. Hasil pengukuran dengan kategori David & Stout, kategori kuat (zona hambat 10 – 19 mm) aktivitas ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 20% dan *Staphylococcus epidermidis* dimulai pada konsentrasi 40%. Sedangkan aktivitas ekstrak daun merah dalam menghambat pertumbuhan *Enterobacter faecalis* dimulai pada konsentrasi 20%, *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 40%, serta *Klebsiella pneumonia* dimulai pada konsentrasi 60%. Adapun Hasil pengukuran dengan kategori kontrol kloramfenicol, kategori sensitif (zona hambat >18 mm) aktivitas ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan *Enterobacter faecalis* dan *Klebsiella pneumonia* dimulai

pada konsentrasi 20%, *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 40 % dan *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus* dimulai pada konsentrasi 80%. Sedangkan aktivitas ekstrak daun sirih hijau tidak menunjukkan efek antibakteri (sensitif) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*. Aktivitas ekstrak daun merah dalam menghambat pertumbuhan *Enterobacter faecalis* dimulai pada konsentrasi 80%. Sedangkan aktivitas ekstrak daun sirih merah tidak menunjukkan efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis*

Pada ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah terbentuk zona hambat yang berbeda-beda dari berbagai konsentrasi. Perbedaan ini disebabkan kandungan senyawa aktif metabolit sekunder yang berbeda didalam daun sirih merah dan daun sirih hijau. Adapun perbedaan zona hambat yang dihasilkan pada masing - masing bakteri karena diameter zona hambat dipengaruhi oleh kemampuan difusi dan toksisitas bahan uji, kondisi lingkungan serta interaksi antar komponen dalam media. Menurut Siswandono & Soekardjo (2000), konsentrasi bahan sebagai antibakteri dapat menjadi penentu yang mempengaruhi kemampuan dalam melakukan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme, termasuk zona hambat yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh mikroorganisme uji (strain dan fisiologi uji bakteri), media kultur, metode uji dan kecepatan difusi

Ekstrak daun sirih menunjukkan aktivitas antimikroba yang baik terhadap bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Secara umum tingkat kepekaan bakteri gram positif lebih tinggi dari bakteri gram negatif. Berdasarkan besarnya diameter zona hambat antara *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis*, disebabkan perbedaan struktur membran sel. *Enterobacter faecalis* merupakan bakteri gram positif memiliki struktur membran sel lebih sederhana dari bakteri gram negatif, sehingga senyawa aktif mudah masuk dan menginfeksi sel bakteri. Senyawa antibakteri diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dengan menembus dinding sel, dengan susunan sederhana yaitu 60-100% peptidoglikan, terdiri dari N-asetil glukosamin dan N-asetil muramat. Penyusunan dinding sel yang sederhana dan tidak adanya selaput luar menyebabkan senyawa antibakteri mudah menembus dinding sel dan mengganggu proses biosintesis dinding sel (Deasywaty, 2011). Adapun bakteri gram negatif, dengan struktur membran sel yang kompleks, tebal dan berlapis (lipoprotein, lipopolisakarida, dan peptidoglikan). Pada bagian terluar membran lipoprotein terdapat porin yang bersifat hidrofobik (Chandrasari et al, 2012). Hal inilah yang dapat menyebabkan senyawa aktif ekstrak sukar/dapat mencegah masuk ke dalam sel. Karena porins dapat sebagai penghalang selektif terhadap zat terlarut hidrofilik

Pada tabel 1 dan 2, menunjukkan senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah berperan sebagai antibakteri. Flavonoid pada merupakan senyawa fenol yang dapat menyebabkan denaturasi protein yang merupakan substansi penting dalam struktur bakteri. Protein yang mengalami denaturasi, menyebabkan proses metabolisme bakteri akan terganggu dan terjadi lisis, sehingga terjadi kematian bakteri. Mekanisme flavonoid dengan cara mengganggu konsentrasi kalium penyusun peptidoglikan pada sel bakteri gram positif sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel terkait disfungsi membran sitoplasma (Xie, 2014). Flavonoid sebagai kandungan utama antimikroba karena berikatan langsung dengan dinding sel bakteri dan flavonoid juga mengganggu sel mikroba (El-Aasr *et al.*, 2016).

Tanin sebagai senyawa antibakteri, karena tanin memiliki kemampuan mengkerutkan dinding sel bakteri sehingga terganggu permeabilitas sel. Hal inilah yang menyebabkan sel tersebut tidak dapat melanjutkan aktivitas sel dan mati (Saleem *et al.*, 2010). Adapun triterpenoid sebagai antibakteri, dengan mekanisme bereaksi dengan porin (protein transmembran) membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Hal ini akan mengurangi permeabilitas membran sel bakteri, sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999 Hasyrul et al, 2021). Golongan alkaloid memiliki aktivitas antibakteri, dengan mengganggu komponen penyusun sel bakteri yaitu lapisan peptidoglikan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh sehingga terjadi kematian sel (Taufiq, Yuniarni and Hazar, 2015)

Berdasarkan tabel Test of Between-Subjects Effect diketahui bahwa nilai sig. sebesar 0,000 yang kurang dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan ekstrak daun sirih hijau dan merah memiliki perbedaan yang

signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis* pada luka diabetes mellitus secara invitro. Jika dilihat dari rata-rata pada tabel Descriptive Statistics maka dapat diketahui pertumbuhan bakteri ini pada luka diabetes mellitus secara invitro, dimana ekstrak daun sirih hijau memiliki rata-rata yang lebih besar dibandingkan ekstrak daun sirih merah yang artinya ekstrak daun sirih hijau lebih mampu/cepat menghambat pertumbuhan bakteri pada luka diabetes mellitus secara invitro

Hasil aktivitas ekstrak daun sirih hijau pada bakteri *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Proteus mirabilis* memiliki rata-rata zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak daun sirih merah. Karena pada daun sirih hijau memiliki lebih banyak senyawa fenolik lebih banyak dari pada daun sirih merah (Dhana. Dkk, 2017). Ekstrak sirih hijau mempunyai aktivitas penghambatan yang kuat terhadap bakteri patogen berdasarkan hasil analisis GC-MS yang menunjukkan bahwa ekstrak sirih hijau mengandung senyawa kavikol, asam dosekanoat, miristat, palmitat dan oleat (Suliantari dkk, 2012). Penelitian Khastini dan Setiyowati, (2013), menyatakan bahwa efektivitas suatu zat antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasi zat yang diberikan, semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi pula bahan aktif sebagai antibakteri sehingga meningkatkan kemampuan daya hambatnya terhadap mikroba, sebaliknya penelitian Ariyanti et al (2012) menyatakan diameter zona hambat tidak selalu mengalami kenaikan sebanding dengan kenaikan konsentrasi ekstrak

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kloramfenikol dan bersifat bakteriostatik. Kloramfenikol dosis 30 mcg memiliki kategori hasil penilaian untuk zona hambat dengan yaitu < 12 mm resisten, 13 mm– 17 mm, intermediate dan >18 mm sensitif. Aktivitas kloramfenikol memiliki spektrum luas efektif baik terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Mekanisme kerja kloramfenikol menghambat sintesis protein dengan mengikat subunit 50S dan secara langsung mencegah pertumbuhan protein bakteri (Brook, 2016).

KESIMPULAN

Uji aktivitas ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan bakteri pada luka penderita diabetes mellitus yaitu menghambat pertumbuhan menghambat pertumbuhan *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 20% dan *Staphylococcus epidermidis* dimulai pada konsentrasi 40%. Sedangkan aktivitas ekstrak daun merah dalam menghambat pertumbuhan *Enterobacter faecalis* dimulai pada konsentrasi 20%, *Methicilin Resisten Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Proteus mirabilis* dimulai pada konsentrasi 40%, serta *Klebsiella pneumonia* dimulai pada konsentrasi 60%.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah Umar, R. *et al.* (2018) 'Malaysian Journal of Applied Sciences Chemical Composition and The Potential Biological Activities of Piper Betel – A', *Malaysian Journal of Applied Sciences*, 3(1), pp. 1–8
- Agarwal, T. *et al.* (2012) 'Comparative analysis of antibacterial activity of four Piper betel varieties', *Science Research*, 3(2), pp. 698–705. Available at: www.pelagiaresearchlibrary.com.
- Ariyanti NK, Darmayasa IBG, Sudirga SK. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miler) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922; 2012
- Bhalerao, S. a *et al.* (2013) 'Phytochemistry, Pharmacological Profile and Therapeutic Uses of Piper Betle Linn. – An Overview', *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(2), pp. 10–19
- Brook, I. (2016) 'Antimicrobials therapy of anaerobic infections', *Journal of Chemotherapy*, 28(3), pp. 143–150. Available at: <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.00000000068>.
- Candrasari, A., Romas, M. A., & Astuti, O. R. (2012). Uji Daya Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 DAN *Candida albicans* ATCC 10231 Secara In Vitro. *Biomedika*, 4(1), 9–16. <https://doi.org/10.23917/biomedika.v4i1.258>

- Chakraborty D, Shah B. Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betle leaf extracts. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3: 192–199
- Deasywaty. 2011. Aktivitas Antimikroba Rimpang Temulawak. Depok: FMIPA Universitas Indonesia.
- Decroli E, Karimi J, Manaf A, Syahbuddin S. Profil ulkus diabetik pada penderita rawat inap di Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Maj Kedokt Indon.* 2008;58(1):1-7
- Dhana, A.R., Cahyono, E, dan Mursiti, S. Isolasi dan Uji Antibakteri Minyak Daun Sirih Hijau dan Merah terhadap *Streptococcus mutans*. *Indo. J. Chem. Sci.* 6 (3) (2017)
- El-Aasr, M. *et al.* (2016) 'Antimicrobial and immunomodulatory activities of flavonol glycosides isolated from *Atriplex halimus* L. Herb', *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(10), pp. 1159–1168. Available at: www.jpssr.pharmainfo.in
- Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020. PMID: 30020625.
- Hartini, Y.S. *et al.* (2018) 'Antagonistic Antibacterial Effect of Betel and Red Betel Combination against Gram-positive and Gram-negative Bacteria', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(05), pp. 267–272. Available at: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.035>.
- Hasyrul Hamzah, Amrina Rossada Septilapani, N. F. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jakarta*, 10(2).
- Jain, S. and Barman, R. (2017) 'Bacteriological profile of diabetic foot ulcer with special reference to drug-resistant strains in a tertiary care center in North-East India', *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 21, pp. 688–694. Available at: https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_546_16.
- Koh, G.C.K.W. *et al.* (2012) 'The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(4), pp. 379–388. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1337-4>
- Marsa, RD. Efek antibakteri ekstrak lerak dalam pelarut etanol terhadap *Enterococcus faecalis* (penelitian *in vitro*). Medan: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara, 2010. p. 19. Skripsi
- Nguyen, T.H., Park, M.D. and Otto, M. (2017) 'Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00090>.
- Novelni R, Irwandi, D. P. (2019). Identifikasi dan Uji Resistensi Bakteri pada Pasien Ulkus Diabetikum di Bangsal Interne RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 8(2), 67–74. <https://doi.org/10.51887/jpfi.v8i2.550>
- Nur, A. and Marissa, N. (2016) 'Gambaran Bakteri Ulkus Diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Meuraxa Tahun 2015', *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(3), pp. 187–196. Available at: <https://doi.org/10.22435/bpk.v44i3.5048.187-196>.
- Nurwahidah, N., Yusuf, S., & Tahir, T. (2018). Identifikasi Jenis Bakteri pada Luka Kaki Diabetik berdasarkan Penyebab Luka di Rumah Perawatan Luka dan Poliklinik Luka di Kota Makassar. *Jurnal Kesehatan Manarang*, 4(2), 97.
- Pasril Y, dan Yuliansanti|.A. (2014). Daya Antibakteri Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) terhadap Bakteri *Entrococcus Faecalis* sebagai Bahan Madikamen Akar dengan Metode Delusi. IDJ. Vol.3 No. 1 B
- Patil, R.S. *et al.* (2015) 'Phytochemical potential and in vitro antimicrobial activity of Piper betle Linn . leaf extracts', *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), pp. 1095–1101. Available at: www.jocpr.com.
- Perim MC, et al. Aerobic Bacterial Profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Journal Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2015;48(5):546-554
- Rawat, V. *et al.* (2012) 'Bacteriological and resistance profile in isolates from diabetic patients', *North American Journal of Medical Sciences*, 4(11), pp. 563–568. Available at: <https://doi.org/10.4103/1947-2714.103315>
- Redel, Gao, Li, Alekseyenko, Zhou, Perez.laser. (2013). Quantitation and Composition Of Cutaneous Microbiota In Diabetic And Nondiabetic Men. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit005>
- Reygaert, W.C., 2013. Antimicrobial Therapy for Complicated Skin and Skin Structure Infections In Diabetes, USA, Department Of Biomedical Sciences Oakland University William Beaumont School of Medicine
- Rinanda, T., Zulfitri, & Alga, D. M. (2012). Antibacterial activity of red betel (*Piper crocatum*) leaf methanolic extracts aginst methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of The Annual International Conference Syiah Kuala University*, 2(1), 22–24. <http://www.jurnal.unsyiah.ac.id/AICS-SciEng/article/view/1781>
- Saleem, M. *et al.* (2010) 'Antimicrobial natural products : an update on future antibiotic drug candidates', *The*

- Royal Society Of Chemistry*, pp. 238–254. Available at: <https://doi.org/10.1039/b916096e>
- Seila, I.. 2012. Efek Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter , Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta
- Shanmugam, P., Jeya, M. and Linda, S.S. (2013) 'The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains', *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(3), pp. 441–445. Available at: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5091.2794>
- Siswandono & Soekardjo, B., 2000. Kimia Medicinal. UNAIR Press, Surabaya, pp. 115-142
- Sugireng dan Rosdarni. Deteksi MRSA (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*) dengan Metode PCR Pada Pasien Ulkus Diabetikum Prosiding Seminar Nasional Biologi di Era Pandemi COVID-19 Gowa, 19 September 2020 <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb/>, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar
- Suliantari, Betty S. L. Jenie dan Maggy T. Suhartono. 2012. Aktivitas Antibakteri Fraksi-fraksi Ekstrak Sirih Hijau (*Piper betle* Linn) Terhadap Patogen Pangan. J. Teknol. Dan Industri Pangan, Vol. XXIII, No. 2, hlm. 217-220.
- Suresh, A. et al. Aerobic Bacterial resistance In Diabetic Foot Ulcer From Chennai. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011; Vol 2
- Taufiq, S., Yuniarni, U. and Hazar, S. (2015) 'Uji Aktivitas Ekstrak Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 110(9), pp. 1689–1699
- Umar, R.A. *et al.* (2018) 'Malaysian Journal of Applied Sciences Chemical Composition and The Potential Biological Activities of Piper Betel – A', *Malaysian Journal of Applied Sciences*, 3(1), pp. 1–8
- Utami, N.L.A.M.I.E.P. (2018) 'Hang tuah medical journal', *Hang Tuah Medical Journal*, 16(1), pp. 48–68
- Valle, D. L., Cabrera, E. C., Puzon, J. J. M., & Rivera, W. L. (2016). Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of Gram positive and Gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance. *PLoS ONE*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146349>
- Won, S.H. *et al.* (2014) 'Risk factors associated with amputation-free survival in patient with Diabetic foot ulcers', *Yonsei Medical Journal*, 55(5), pp. 1373–1378. Available at: <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.5.1373>
- Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X and Ren L. Antibacterial Activities Of Flavonoids: Structure-Activity Relationship And Mechanism. *Curr Med Chem* 2014; 22: 132-49.
- Yuwono. et al. Identifikasi *Staphylococcal* Cassette Chromosome Mec Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* dengan Polymerase Chain Reaction. Palembang : Universitas Sriwijaya/Rumah Sakit Moch. Hoesin; 2011
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2016). Annals of Medicine Global epidemiology of diabetic foot ulceration : a systematic review and meta-analysis, 3890 (November).