# UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*PIPER BETLE* LINN.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*


Disusun oleh:

MOH KURNIAWAN

NPM : 2208260086



**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN**

**UNIVERSITAS MUHAMADIYAH SUMATERA UTARA**

**MEDAN**

**2026**

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN UNIVERSITAS
MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
**FAKULTAS KEDOKTERAN**
Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext. 20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu@ac.id

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Moh Kurniawan
NPM : 2208260086
Judul : **UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU *(Piper betle Linn)* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Streptococcus pyogenes***

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing,

( dr. Hervina, Sp. DVE, MKM, FINSDV, FAADV)

Penguji 1

(dr. Ance Roslina, M.kes. Sp.KKLP.Subsp. FOMC)

Penguji 2

(dr.Ilham Hariaji,M.Biomed)

Mengetahui,

Dekan FKIK UMSU

(dr. Siti Masliana Siregar, Sp. THT-KL., Subsp.Rino(K))
NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi
Pendidikan Dokter
FKIK UMSU

(dr. Desi Isnayanti,M.Pd.Ked)
NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan
Tanggal : 29 Agustus 2026

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
**FAKULTAS KEDOKTERAN**
Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext. 20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu.ac.id

بسم الله الرحمن الرحيم

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Moh kurniawan

NPM : 2208260086

Judul : UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU *(PIPER BETLE LINN)* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima untuk diteruskan ke ranah penelitian.

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing,

(dr Hervina,spDVE,MKM,FINSDV,FAADV)

| Penguji 1 | Penguji 2 |
|---|---|
| (dr. Ance Rosfina,M.kes.sp.KKLP.Subsp.FOMC) | (dr.Ilham Hariaji,M.Biomed) |

Ditetapkan di : Medan

Tanggal : 16 April 2026



Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur saya ucapkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala karena berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini dalam rangka memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Saya menyadari, tanpa bantuan dan bimbingan berbagai pihak, amat sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Maka dari itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, Ayah Abdul Aziz dan Ibu Khairoti, yang telah senantiasa mendoakan, menyayangi, mendukung, baik secara moril maupun material, sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Abang-abang saya, Falen dan Arfi, yang selalu memberikan saya dorongan, semangat, bantuan, dan doa dalam menuntaskan skripsi ini.
3. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL., Subsp. Rino (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
4. dr. Hervina, Sp.DVE, MKM, FINSDV, FAADV, selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing serta memberikan arahan dengan sabar dalam penyusunan skripsi ini.
5. dr. Ance Roslina, Sp.KKLP., Subsp. FOMC, selaku Dosen Penguji Pertama yang telah memberikan masukan serta arahan dalam penyusunan skripsi ini.
6. dr. Ilham Hariaji, selaku Dosen Penguji Kedua yang telah memberikan masukan serta arahan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Teman-teman seperjuangan saya, Robi, Ilham, Dafa Rizki, Daffa Ryanza, Bayu, Ade, Evan, Dimas, Reza, Alfan, dan Halki, yang senantiasa menemani dalam menyusun skripsi ini.
8. Pihak laboratorium, Kak Endah dan Kak Triana, yang sudah senantiasa membantu selama penelitian ini.
9. Seluruh sejawat FK UMSU angkatan 2022 serta pihak-pihak lainnya yang memberikan bantuan dalam proses menyelesaikan skripsi ini.

Sungguh saya menyadari bahwa penulisan skripsi saya masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu, kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini sangat saya harapkan. Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Moh Kurniawan

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan benar.

Nama : Moh Kurniawan

NPM : 2208260086

Judul Skripsi : UJI EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*PIPER BETLE LINN*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *STREPTOCOCCUSPYOGENES*

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 14 September 2026




Moh Kurniawan



Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

# ABSTRAK

**Latar Belakang:** *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri Gram positif penyebab infeksi dengan beban penyakit global yang tinggi, mulai dari faringitis hingga infeksi invasif berat. Penatalaksanaan yang selama ini mengandalkan antibiotik seperti klindamisin menghadapi masalah resistensi yang terus meningkat, sehingga diperlukan alternatif antibakteri berbasis bahan alam. Daun sirih hijau (*Piper betle* Linn) mengandung senyawa fitokimia seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antibakteri.**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, serta membandingkannya dengan klindamisin sebagai kontrol positif.**Metode:** Penelitian bersifat eksperimental laboratorium menggunakan metode difusi cakram (Kirby-Bauer). Sampel dibagi menjadi 6 kelompok (empat konsentrasi ekstrak, kontrol positif klindamisin, dan kontrol negatif akuades) dengan 4 kali pengulangan tiap kelompok. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong. Data dianalisis menggunakan uji Shapiro-Wilk, uji homogenitas, dan uji Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).**Hasil:** Rerata diameter zona hambat meningkat seiring peningkatan konsentrasi ekstrak, yaitu 10,27 mm (25%), 12,95 mm (50%), 15,60 mm (75%), dan 16,20 mm (100%), sedangkan klindamisin menghasilkan rerata zona hambat terbesar (22,00 mm) dan akuades tidak menghasilkan zona hambat. Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p = 0,001$), meskipun konsentrasi 75% dan 100% tidak berbeda signifikan satu sama lain.**Kesimpulan:** Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* yang meningkat seiring peningkatan konsentrasi, namun daya hambatnya masih lebih rendah dibandingkan klindamisin sehingga belum dapat dianggap sebagai pengganti antibiotik standar.

**Kata kunci:** *Piper betle* Linn, *Streptococcus pyogenes*, daya hambat, ekstrak daun sirih, klindamisin

# ABSTRACT

**Background:** *Streptococcus pyogenes* is a Gram-positive bacterium responsible for a substantial global disease burden, ranging from pharyngitis to severe invasive infections. Standard treatment with antibiotics such as clindamycin faces rising resistance, prompting the search for natural antibacterial alternatives. Green betel leaf (*Piper betle* Linn) contains phytochemicals such as flavonoids, alkaloids, tannins, and essential oils with potential antibacterial activity.**Objective:** To determine the effectiveness of green betel leaf extract in inhibiting the growth of *Streptococcus pyogenes* at concentrations of 25%, 50%, 75%, and 100%, compared with clindamycin as a positive control.**Methods:** This was a laboratory experimental study using the disk diffusion (Kirby-Bauer) method. Samples were divided into 6 groups (four extract concentrations, a clindamycin positive control, and an aquadest negative control) with 4 replications each. Inhibition zone diameters were measured with calipers. Data were analyzed using the Shapiro-Wilk test, homogeneity test, and Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$).**Results:** Mean inhibition zone diameters increased with extract concentration: 10.27 mm (25%), 12.95 mm (50%), 15.60 mm (75%), and 16.20 mm (100%), while clindamycin produced the largest mean inhibition zone (22.00 mm) and aquadest produced none. The Kruskal-Wallis test showed a significant difference among groups ($p = 0.001$), although the 75% and 100% concentrations did not differ significantly from each other.**Conclusion:** Green betel leaf extract (*Piper betle* Linn) shows antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes* that increases with concentration, but its inhibitory effect remains lower than clindamycin and cannot yet be considered a substitute for standard antibiotics.

**Keywords:** *Piper betle* Linn, *Streptococcus pyogenes*, inhibition zone, betel leaf extract, clindamycin

# DAFTAR ISI

**DAFTAR ISI** ..... **vi**
**DAFTAR TABEL** ..... **viii**
**DAFTAR GAMBAR** ..... **ix**
**BAB I PENDAHULUAN** ..... **1**
1.1. Latar Belakang ..... 1
1.2. Rumusan Masalah ..... 3
1.3. Tujuan Penelitian ..... 3
1.3.1. Tujuan Umum ..... 3
1.3.2. Tujuan Khusus ..... 3
1.4. Manfaat Penelitian ..... 3
1.4.1. Bagi Peneliti ..... 3
1.4.2. Bagi Institusi ..... 3
1.4.3. Bagi Masyarakat ..... 4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA ..... **5**
2.1. Tanaman sirih ..... 5
2.1.1. Taksonomi Tanaman Sirih ..... 6
2.1.2. Kandungan Tanaman Sirih ..... 6
2.1.3. Manfaat Tanaman Sirih (Piper betle) ..... 6
2.2. Streptococcus Pyogenes ..... 7
2.2.1. Toksonomi Streptococcus Pyogenes ..... 8
2.2.2. Faktor Virulensi Streptococcus Grup A (GAS) ..... 8
2.3. Klindamisn ..... 11
2.3.1. Mekanisme Kerja dan Efektivitas Antibakteri ..... 11
2.4. Uji Efektivitas Antibakteri ..... 12
2.4.1. Metode Dilusi ..... 12
2.4.2. Metode Difusi ..... 12
2.5. Ekstraksi ..... 13
2.6. Kerangka Teori ..... 14

2.7. Kerangka Konsep ..... 15
2.8. Hipotesa ..... 15
**BAB III METODE PENELITIAN ..... 16**
3.1. Definisi Operasional ..... 16
3.2. Jenis Penelitian ..... 17
3.3. Waktu dan Tempat Penelitian ..... 17
3.4. Sampel Penelitian ..... 17
3.5. Teknik Pengumpulan Data ..... 18
3.6. Alat dan Bahan Penelitian ..... 18
3.7. Cara Kerja ..... 20
3.8. Analisis Data ..... 22
3.9. Alur Penelitian ..... 23
**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 24**
4.1. Hasil Penelitian ..... 24
4.1.1. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih ..... 24
4.1.2. Daya Hambat Ekstrak Daun Sirih Terhadap Streptococcus Pyogenes 26
4.2. Pembahasan ..... 34
**BAB V KESIMPULAN DAN SARAN ..... 40**
5.1. Kesimpulan ..... 40
5.2. Saran ..... 40
**DAFTAR PUSTAKA ..... 43**

# DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Definisi Operasional .....16
Tabel 4. 1 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih .....25
Tabel 4. 2 Perbedaan Zona Hambat.....26
Tabel 4.3 Hasil analisis uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas .....27
Tabel 4. 4 Hasil uji Kruskall-Wallis .....28
Tabel 4. 5 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 50% .....29
Tabel 4. 6 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 75% .....29
Tabel 4. 7 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 100%.....29
Tabel 4. 8 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan klindamisin .....30
Tabel 4. 9 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan aquadest .....30
Tabel 4. 10 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 75% .....30
Tabel 4. 11 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 100% .....30
Tabel 4. 12 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan klindamisin .....31
Tabel 4. 13 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan aquadest .....31
Tabel 4. 14 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100% .....31
Tabel 4. 15 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan klindamisin .....32
Tabel 4. 16 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan aquadest .....32
Tabel 4. 17 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan klindamisin .....32
Tabel 4. 18 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan aquadest .....33
Tabel 4. 19 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih klindamisin dengan aquadest .....33

# DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Morfologi Tumbuhan dan Daun Sirih Hijau[11] .....4
Gambar 2. 2 Kerangka Teori.....13
Gambar 2. 3 Kerangka Konsep .....14
Gambar 3. 1 Alur Penelitian.....**Error! Bookmark not defined.**

# BAB I
# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Secara global, penyakit infeksi yang bersumber dari bakteri masih memberikan dampak yang substansial terhadap morbiditas dan mortalitas, dengan *Streptococcus pyogenes* sebagai salah satu bakteri Gram positif yang berperan dalam menimbulkan infeksi pada manusia. Bakteri ini termasuk dalam kelompok *Group A Streptococcus* (GAS) yang bersifat non-motil, tidak membentuk spora, katalase-negatif, serta tersusun dalam bentuk rantai. *Streptococcus pyogenes* merupakan patogen manusia yang sangat adaptif dan mampu menyebabkan spektrum penyakit yang luas, mulai dari infeksi superfisial seperti faringitis hingga infeksi invasif berat seperti *necrotizing fasciitis* dan *streptococcal toxic shock syndrome*.[1]

Dari perspektif epidemiologi, *Streptococcus pyogenes* termasuk patogen yang memberikan beban penyakit cukup besar pada tingkat global. Setiap tahun, diperkirakan terdapat lebih dari 18 juta kasus infeksi invasif yang berkaitan dengan bakteri tersebut, dengan jumlah kematian secara global mencapai sekitar 500.000 kasus.[2] Selain itu, bakteri ini juga termasuk dalam sepuluh besar penyebab kematian akibat penyakit infeksi di dunia.[1] Beban penyakit ini semakin meningkat dalam beberapa tahun terakhir, dengan laporan peningkatan angka mortalitas infeksi invasif hingga lebih dari 20% pada beberapa populasi.[3] Pada kelompok usia anak, khususnya usia 5–15 tahun, *S. pyogenes* merupakan penyebab utama faringitis akut yang berkontribusi besar terhadap beban penyakit infeksi saluran pernapasan.[2]

Penatalaksanaan infeksi *Streptococcus pyogenes* hingga saat ini masih bertumpu pada pemberian antibiotik, termasuk penisilin, amoksisilin, dan golongan makrolida. Kendati demikian, pemakaian antibiotik secara tidak tepat maupun dalam durasi yang berkepanjangan dapat memicu timbulnya resistensi antimikroba. Sejumlah penelitian memperlihatkan kecenderungan meningkatnya ketidakpekaan *S. pyogenes* terhadap beberapa agen antibiotik, di antaranya makrolida dan klindamisin. Kondisi tersebut berpotensi mengurangi keberhasilan terapi sekaligus

meningkatkan risiko terjadinya komplikasi.[3] Selain permasalahan resistensi, terapi antibiotik juga dapat disertai efek samping serta perubahan keseimbangan mikrobiota, sehingga diperlukan eksplorasi terhadap pilihan terapi alternatif dengan profil keamanan yang lebih baik serta berpotensi diterapkan secara berkelanjutan.

Seiring berjalannya waktu, eksplorasi sumber daya alam untuk dikembangkan menjadi bahan yang berkhasiat melawan bakteri semakin mendapat perhatian dalam penelitian. Berbagai tanaman obat tradisional memiliki kandungan komponen aktif yang berpotensi memberikan aktivitas antimikroba melalui mekanisme yang beragam, mulai dari mengganggu integritas membran sel, mengintervensi proses pembentukan protein, hingga memengaruhi aktivitas metabolik bakteri. Salah satu tumbuhan yang berpotensi dikembangkan yaitu daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.), yang telah lama dimanfaatkan sebagai bagian dari praktik pengobatan tradisional di berbagai kawasan Asia, termasuk di Indonesia.[4]

Daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) diketahui memiliki kandungan fitokimia yang beragam, meliputi flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, fenol, serta minyak atsiri yang komponen utamanya antara lain kavikol dan eugenol. Keberadaan komponen tersebut berpotensi menghasilkan aktivitas antibakteri melalui sejumlah mekanisme, di antaranya mengganggu keutuhan dinding sel, mengubah permeabilitas membran, serta memicu denaturasi protein bakteri.[4] Sejumlah penelitian terdahulu turut mengemukakan bahwa ekstrak daun sirih hijau mampu menghambat perkembangan berbagai mikroorganisme patogen, termasuk *Streptococcus pyogenes*.

Kendati demikian, hasil penelitian mengenai efektivitas antibakteri daun sirih hijau terhadap *Streptococcus pyogenes* masih memperlihatkan ketidakseragaman hasil. Perbedaan temuan tersebut diduga berkaitan dengan sejumlah aspek metodologis, antara lain teknik ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan, konsentrasi ekstrak, serta metode pengujian antibakteri yang diterapkan. Selain itu, sejumlah kajian yang telah dilakukan masih menitikberatkan pengujian terhadap mikroorganisme lain, seperti *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli*, sehingga data yang secara spesifik menguraikan aktivitas ekstrak daun sirih hijau terhadap *Streptococcus pyogenes* masih terbatas.[5]

Lebih lanjut, penelitian yang membandingkan efektivitas ekstrak daun sirih hijau dengan antibiotik standar sebagai kontrol positif, serta mengevaluasi hubungan dosis-respons pada berbagai konsentrasi ekstrak, masih belum banyak dilakukan. Selain itu, hingga saat ini belum tersedia tolok ukur baku untuk menetapkan konsentrasi optimal ekstrak daun sirih hijau yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Keterbatasan tersebut mengindikasikan masih adanya kesenjangan penelitian (*research gap*) yang perlu memperoleh penelaahan lebih lanjut.

Bertolak dari uraian tersebut, diperlukan penelitian eksperimental yang terkontrol untuk mengidentifikasi kemampuan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dalam menekan pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*, serta membandingkannya dengan antibiotik standar. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan landasan ilmiah yang lebih kuat terkait potensi daun sirih hijau sebagai alternatif antibakteri, sekaligus mendukung pengembangan terapi berbasis bahan alam dengan tingkat keamanan dan efektivitas yang lebih optimal.

## 1.2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah daya hambat ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*?

### 1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui efektivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dibandingkan dengan klindamisin.
2. Mengetahui efektivitas ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1.Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat memperdalam pemahaman dan memperkaya wawasan peneliti mengenai aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

### 1.4.2 Bagi Institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya khazanah kepustakaan institusi serta memberikan tambahan wawasan bagi pemutakhiran dan pengembangan keilmuan yang dapat dijadikan pijakan dalam pelaksanaan penelitian berikutnya.

### 1.4.3.Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai efektivitas ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

# BAB II
# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Daun Siri

Sirih (*Piper betle* L.) tergolong tumbuhan merambat yang dapat bertahan hidup secara tahunan dan mempunyai kedekatan kekerabatan dengan lada (*Piper nigrum* L.) serta cabe jawa (*Piper retrofractum* L.). Berdasarkan asal persebarannya, tanaman ini diperkirakan berasal dari kawasan Nusantara Indonesia dan Semenanjung Malaka. Sejalan dengan penyebaran dan pemanfaatannya, sirih kini telah dibudidayakan di berbagai wilayah Asia, di antaranya India, Bangladesh, Pakistan, Malaysia, Indonesia, serta beberapa negara lain di kawasan Asia Tenggara.[6]

Secara morfologis, tanaman sirih (*Piper betle*) dapat mencapai ukuran beberapa puluh meter. Helaian daunnya memiliki bentuk pipih menyerupai jantung dengan tangkai yang tergolong panjang. Bagian permukaan daun umumnya memperlihatkan warna hijau mengilap dan bertekstur licin, sedangkan batangnya berwarna hijau kecokelatan dengan permukaan yang kasar dan berkerut. Berdasarkan susunannya, daun sirih termasuk daun tunggal yang menempati posisi berselang-seling pada batang. Helaian daun memperlihatkan bentuk yang bervariasi, mulai dari bundar sampai oval, dengan ujung meruncing serta pangkal menyerupai jantung atau membulat dengan bentuk yang tidak simetris. Warna helaian daun dapat dijumpai dalam gradasi kuning, hijau muda, hingga hijau tua, disertai aroma khas yang bersifat aromatik.[7]



Gambar 2.1 Morfologi Tumbuhan dan Daun Sirih Hijau.[5]

### 2.1.1 Taksonomi Tanaman Sirih

| | |
|---|---|
| Kingdom | : Plantae |
| Superkingdom | : Trachebionta |
| Super Divisi | : Spermatophyta |
| Divisi | : Magnoliopsida |
| Kelas | : Magnoliopsida |
| Sub kelas | : Magnoliidae |
| Ordo | : Piperales |
| Famili | : Piperaceae |
| Genus | : *Piper* |
| Spesies | : *Piper betle L.*[8] |

### 2.1.2 Kandungan Tanaman Sirih

Tanaman sirih (*Piper betle* L.) merupakan tumbuhan yang memiliki keragaman kandungan fitokimia. Daunnya diketahui mengandung minyak atsiri sekitar 0,8 hingga 1,8 persen yang tersusun atas beberapa komponen aktif, antara lain kavikol, betel fenol (kavibetol), dan hidroksikavikol (alilpirokatekol). Selain minyak atsiri, daun sirih juga memiliki kandungan karvakrol, kariofilen, sineol, tanin, eugenol, *p*-simen, serta kelompok senyawa terpenoid dan *phenylpropan*. Kandungan lainnya mencakup riboflavin, asam nikotinat, tiamin, gula, asam amino, vitamin C, pati, serta sejumlah senyawa aromatik, seperti kadimen dan estragol.[9]

### 2.1.3 Manfaat Tanaman Sirih (Piper betle)

Tanaman sirih hijau (*Piper betle* Linn.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang telah lama digunakan di berbagai negara Asia, termasuk Indonesia, karena memiliki beragam manfaat kesehatan. Daun sirih hijau diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti eugenol, *chavicol*, estragol, serta senyawa fenolik lainnya yang berperan sebagai antimikroba, antiseptik, dan antioksidan.[10] Beragam komponen tersebut dapat memberikan pengaruh terhadap mikroorganisme melalui mekanisme yang berbeda, di antaranya dengan

mengganggu keutuhan membran sel bakteri, menghambat aktivitas enzim, serta memengaruhi proses metabolisme mikroorganisme.[11]

Sejumlah penelitian telah memperlihatkan kemampuan ekstrak daun sirih hijau dalam menekan pertumbuhan berbagai bakteri patogen, baik yang termasuk kelompok Gram positif maupun Gram negatif, seperti *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, serta *Streptococcus* spp.[4] Aktivitas penghambatan tersebut diduga berkaitan dengan keberadaan metabolit fitokimia, antara lain flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid yang dapat memberikan efek sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri.[12] Hasil pengujian eksperimental juga memperlihatkan bahwa ekstrak daun sirih hijau mampu menekan pertumbuhan *Propionibacterium acnes* dan *Streptococcus pyogenes*, sehingga tanaman tersebut berpeluang dikembangkan sebagai salah satu sumber antibakteri alami.[5]

## 2.2 Streptococcus pyogenes

*Streptococcus pyogenes*, yang dikenal sebagai *Group A Streptococcus* (GAS), merupakan bakteri Gram-positif patogen yang dapat menyebabkan manifestasi penyakit dengan spektrum klinis yang luas, baik yang bersifat non-invasif seperti faringitis, impetigo, dan demam skarlatina, maupun infeksi invasif berat seperti *necrotizing fasciitis* dan sindrom syok toksik streptokokus. Bakteri ini juga dapat menimbulkan komplikasi pascainfeksi non-supuratif, seperti demam rematik akut dan glomerulonefritis. Secara morfologis, bakteri ini berbentuk kokus dengan susunan rantai, tidak memiliki kemampuan motilitas, dan tidak membentuk spora. Dalam pemeriksaan mikroskopis, *S. pyogenes* tampak sebagai sel sferis atau oval berdiameter sekitar 1–2 µm, sedangkan pada kultur cair dapat membentuk rantai yang lebih panjang tergantung kondisi lingkungan. Pertumbuhannya optimal pada media agar darah, dengan koloni berwarna putih keabuan berdiameter 1–2 mm yang dikelilingi oleh zona hemolisis beta sebagai akibat lisis total eritrosit.[13]

Sebagian besar strain *Streptococcus pyogenes* memiliki kapsul yang tersusun atas asam hialuronat yang merupakan salah satu determinan penting dalam virulensi bakteri. Kapsul ini tidak hanya memberikan tampilan mukoid pada koloni,

tetapi juga berperan penting dalam mekanisme bakteri menghindari pertahanan imun inang, dengan menghambat fagositosis dan mencegah deposisi komplemen pada permukaan bakteri.[14] Selain itu, kapsul asam hialuronat diketahui mampu meningkatkan kemampuan bakteri dalam bertahan terhadap eliminasi oleh neutrofil serta memfasilitasi invasi jaringan melalui interaksi dengan reseptor sel inang seperti CD44. Kemampuan tersebut memungkinkan *S. pyogenes* mempertahankan keberadaan dan perkembangannya di dalam tubuh inang, sehingga proses infeksi dapat menjadi lebih sulit dikendalikan.[15]

Penatalaksanaan infeksi *Streptococcus pyogenes* saat ini umumnya menggunakan antibiotik seperti penisilin, amoksisilin, dan eritromisin. Akan tetapi, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menimbulkan efek samping sekaligus berkontribusi terhadap peningkatan resistensi antimikroba. Oleh karena itu, eksplorasi terhadap pilihan agen terapeutik lain menjadi penting untuk dilakukan, termasuk agen yang bersumber dari bahan alami dan berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri maupun menekan faktor virulensi seperti kapsul. Pendekatan tersebut diharapkan dapat mendukung kemampuan sistem imun dalam proses eliminasi bakteri.

### 2.2.1 Taksonomi Streptococcus pyogenes

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococcaceae
Genus : *Streptococcus*
Spesies : *Streptococcus pyogenes*

### 2.2.2 Faktor Virulensi Streptococcus Grup A (GAS)

1. Karbohidrat spesifik-grup

   Karbohidrat spesifik-grup merupakan salah satu komponen penting dinding sel *Streptococcus pyogenes* yang menyusun sekitar 10% dari total berat sel bakteri. Antigen kelompok A, yang diklasifikasikan berdasarkan sistem Lancefield, tersusun atas unit dimer yang terdiri dari L-rhamnosa dan N-asetil-D-glukosamin. Struktur karbohidrat ini berperan sebagai penanda serologis utama dalam identifikasi *Group A Streptococcus* (GAS) serta digunakan untuk membedakannya dari spesies *Streptococcus* lainnya.[16] Selain berfungsi dalam klasifikasi, komponen karbohidrat ini juga berkontribusi dalam interaksi antara bakteri dengan sistem imun inang, termasuk dalam proses pengenalan antigenik dan respons imun terhadap infeksi.[17]

2. Protein spesifik-serotipe

   *Streptococcus pyogenes* (*Group A Streptococcus*/GAS) mengekspresikan beberapa antigen protein permukaan yang berperan penting dalam virulensi, terutama protein M dan protein T. Protein M merupakan faktor virulensi utama yang berperan dalam klasifikasi serotipe (*emm typing*) serta berkontribusi besar terhadap patogenesis infeksi GAS.[17]

   Protein ini merupakan struktur fibrilar yang tertanam pada membran sitoplasma dan menembus dinding sel, dengan ujung amino terminal yang menonjol ke permukaan sel dan bersifat sangat variabel, sehingga menghasilkan keragaman antigenik yang luas di antara lebih dari 200 tipe *emm* yang telah diidentifikasi.[18]

   Secara struktural, protein M tersusun atas dua rantai polipeptida yang membentuk konfigurasi alfa-heliks menyerupai *coiled-coil*, yang tampak seperti tonjolan rambut pada permukaan bakteri. Protein ini berfungsi sebagai faktor anti-fagositosis utama dengan menghambat deposisi komplemen, terutama melalui interaksi dengan faktor H, sehingga mengganggu aktivasi jalur alternatif sistem komplemen.[19] Selain itu, protein M juga berperan dalam adhesi bakteri terhadap jaringan inang melalui interaksi dengan berbagai komponen matriks ekstraseluler, seperti fibrinogen dan *fibronectin*, yang mendukung kolonisasi dan invasi jaringan.[19]

Strain GAS yang mengekspresikan protein M dalam jumlah tinggi menunjukkan peningkatan virulensi, ditandai dengan kemampuan menghindari fagositosis, memperbanyak diri secara cepat, serta meningkatkan keparahan infeksi. Protein M secara imunologis diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok berdasarkan struktur dan epitop antigeniknya, di mana variasi tertentu berhubungan dengan risiko komplikasi imunologis seperti demam rematik akut.[18] Sementara itu, protein T, yang bersifat resisten terhadap enzim proteolitik seperti tripsin, terutama digunakan sebagai penanda epidemiologis dalam karakterisasi strain GAS, khususnya pada kondisi di mana ekspresi protein M tidak optimal.[17]

3. Komponen di Permukaan Sel Lainnya

Selain protein M, *Streptococcus pyogenes* memiliki sejumlah komponen permukaan sel yang turut menunjang proses patogenesis, di antaranya protein yang memiliki kemiripan dengan protein M (*M-like proteins*), asam lipoteikoat (*lipoteichoic acid*), serta protein F. Keberadaan komponen tersebut berperan dalam tahap perlekatan awal bakteri pada sel inang, yang selanjutnya menjadi bagian penting dalam proses kolonisasi dan terjadinya infeksi.[17] Asam lipoteikoat merupakan salah satu penyusun penting dinding sel bakteri Gram-positif yang mampu berinteraksi dengan reseptor pada permukaan sel epitel, sedangkan protein F mempunyai kemampuan berikatan yang kuat dengan *fibronectin*, yaitu suatu glikoprotein yang terdapat pada matriks ekstraseluler sel inang.[20]

Interaksi antara asam lipoteikoat dan protein F dengan *fibronectin* memungkinkan terbentuknya kompleks adhesi yang kuat, sehingga memfasilitasi perlekatan bakteri pada jaringan epitel dan meningkatkan kemampuan invasi *Streptococcus pyogenes*. Selain itu, *M-like proteins* juga berperan dalam menghindari respons imun dengan mekanisme yang mirip dengan protein M, termasuk dalam penghambatan fagositosis dan interaksi dengan komponen sistem imun. Dengan demikian, keberadaan berbagai komponen permukaan sel ini secara sinergis meningkatkan kemampuan bakteri dalam kolonisasi, invasi jaringan, serta evasi sistem imun inang.[21]

4. Kapsul

Sebagian strain *Streptococcus pyogenes* memiliki lapisan kapsul eksternal yang tersusun atas asam hialuronat, dengan struktur berupa unit berulang asam glukuronat dan N-asetilglukosamin. Kapsul tersebut memiliki kemiripan antigenik dengan asam hialuronat yang terdapat pada jaringan ikat mamalia, sehingga keberadaannya cenderung tidak dianggap sebagai unsur asing oleh sistem imun inang. Peranan utama kapsul berkaitan dengan kemampuan bakteri dalam menghindari fagositosis oleh sel-sel imun. Strain *S. pyogenes* yang mempunyai kapsul umumnya berhubungan dengan timbulnya infeksi sistemik yang lebih berat dan memiliki sifat *invasive*.[15]

## 2.3 Klindamisin

Klindamisin merupakan salah satu antimikroba yang kerap digunakan sebagai terapi adjuvan pada infeksi invasif yang disebabkan oleh *Streptococcus* kelompok A (GAS). Mekanisme kerjanya tidak hanya berkaitan dengan aktivitas antibakteri, tetapi juga menekan produksi sejumlah determinan virulensi penting, termasuk *streptolysin S*, protein M, dan eksotoksin pirogenik streptokokus. Di samping itu, klindamisin dapat mendukung peningkatan opsonisasi dan fagositosis GAS melalui keterlibatan sistem komplemen. Dalam praktik klinis, klindamisin juga digunakan untuk menangani beragam infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram-positif, termasuk *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), sebagian besar bakteri anaerob, serta beberapa kelompok protozoa. Penggunaannya terutama dijumpai pada infeksi yang melibatkan saluran pernapasan, jaringan tulang dan jaringan lunak, regio leher dan wajah, rongga abdomen, serta area pelvis.[22]

### 2.3.1 Mekanisme Kerja dan Efektivitas Antibakteri

Ribosom merupakan struktur sel yang menjadi tempat berlangsungnya translasi protein. Pada sel eukariotik, ribosom tersusun atas dua bagian utama, yaitu subunit besar dan subunit kecil, yang menjalankan fungsi berbeda dalam proses sintesis protein. Meskipun ribosom pada organisme prokariotik dan eukariotik

memiliki perbedaan dalam komposisinya, keduanya tetap menjalankan fungsi mendasar yang sama, yaitu menerjemahkan informasi genetik menjadi protein. Ribosom bakteri menjadi salah satu sasaran penting dalam kerja antibiotik, sedangkan ribosom eukariotik bukan merupakan target utama terapi tersebut.

Secara struktural, ribosom tersusun atas subunit besar dan subunit kecil yang saling melengkapi dalam menjalankan translasi. Subunit kecil memiliki situs aminoasil-tRNA (situs A), situs peptidil-tRNA (situs P), serta situs keluaran tRNA (situs E), yang memungkinkan berlangsungnya proses pembacaan kode genetik pada mRNA. Adapun subunit besar memiliki pusat transferase peptidil (PTC) dan saluran keluarnya peptida (NPET), yang berkaitan dengan pembentukan ikatan peptida serta pemanjangan rantai polipeptida. Setelah asam amino dilepaskan, tRNA yang telah kehilangan muatannya akan meninggalkan ribosom melalui situs E, sementara rantai peptida yang sedang terbentuk mengalami pemanjangan melalui NPET. PTC dan NPET juga merupakan bagian ribosom yang dapat menjadi tempat interaksi berbagai antibiotik yang digunakan dalam bidang dermatologi. Perbedaan struktur pada bagian-bagian ribosom tersebut memungkinkan antibiotik berinteraksi secara selektif dengan ribosom bakteri, sehingga respons terhadap antibiotik dapat bervariasi menurut spesies bakteri maupun lokasi interaksi obat pada ribosom.[23]

## 2.4 Metode Pengujian Efektivitas Antibakteri

Pengujian efektivitas antibakteri dapat dilakukan melalui dua pendekatan utama, yaitu metode dilusi yang mencakup pengenceran dalam media cair maupun padat, serta metode difusi.

### 2.4.1 Metode Dilusi

#### 2.4.1.1 Cair (Broth dilution test)

Penentuan Kadar Bakterisidal Minimum (KBM) melalui metode dilusi padat dilakukan dengan menanamkan mikroorganisme uji pada media agar yang sebelumnya telah mengandung agen antimikroba. Metode ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi paling rendah dari bahan antimikroba yang mampu

memberikan efek bakterisidal, yang ditandai dengan tidak ditemukannya pertumbuhan koloni pada media setelah proses inkubasi.[24]

**2.4.1.2. Padat (Solid dilution test)**

Metode padat dalam penentuan kadar bakterisidal minimum (KBM) dilakukan dengan menginokulasi mikroorganisme uji ke dalam media agar yang telah mengandung agen antimikroba. Pendekatan ini bertujuan untuk mengidentifikasi konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu membunuh mikroba secara efektif, ditunjukkan melalui tidak adanya pertumbuhan koloni pada medium setelah inkubasi.[24]

### 2.4.2. Metode Difusi

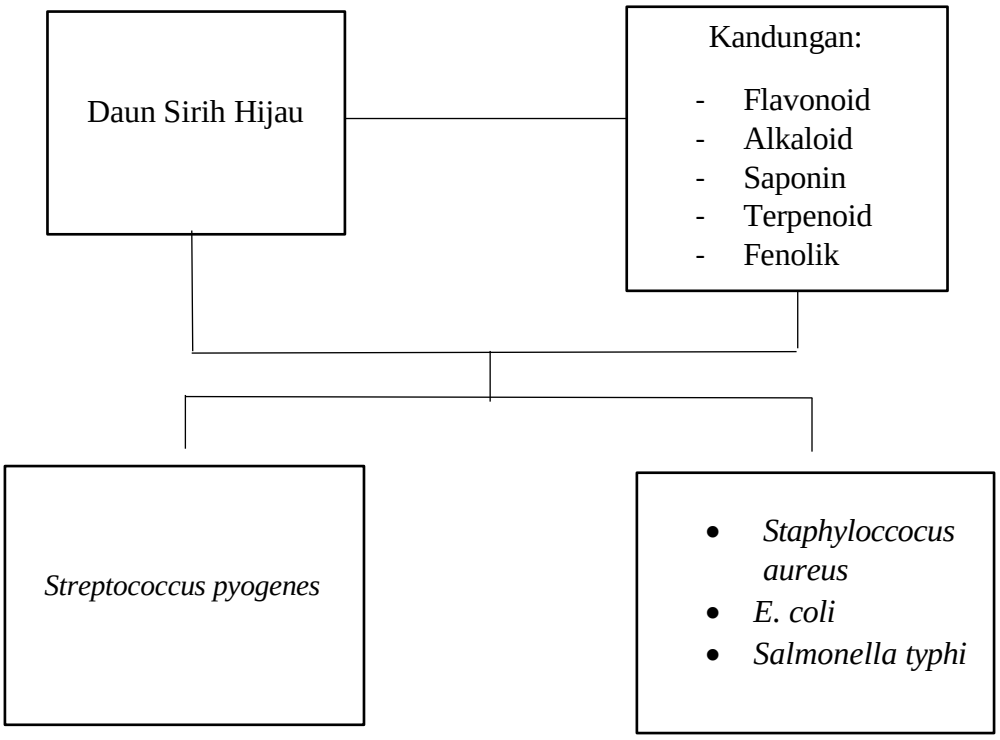
Metode difusi cakram dilakukan dengan membasahi atau mengimpregnasi kertas cakram menggunakan bahan uji yang mengandung senyawa antimikroba. Kertas cakram tersebut selanjutnya ditempatkan pada permukaan media padat yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Media kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18–24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, aktivitas antimikroba diamati berdasarkan terbentuknya daerah jernih di sekeliling kertas cakram. Diameter daerah jernih tersebut digunakan sebagai gambaran kemampuan bahan antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji. Media padat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak ±25 mL dan dibiarkan sampai mencapai kondisi padat.[25]

## 2.5 Ekstraksi

Kondisi ekstraksi merupakan salah satu aspek yang menentukan mutu maupun aktivitas ekstrak yang diperoleh. Pada umumnya, proses ekstraksi lebih baik dilakukan dalam kondisi bersuhu rendah guna mempertahankan kestabilan senyawa bioaktif, mengingat paparan panas yang berlangsung dalam durasi panjang dapat menyebabkan penurunan stabilitas serta kadar komponen aktif. Penentuan metode ekstraksi dan pemilihan pelarut perlu mempertimbangkan karakteristik material

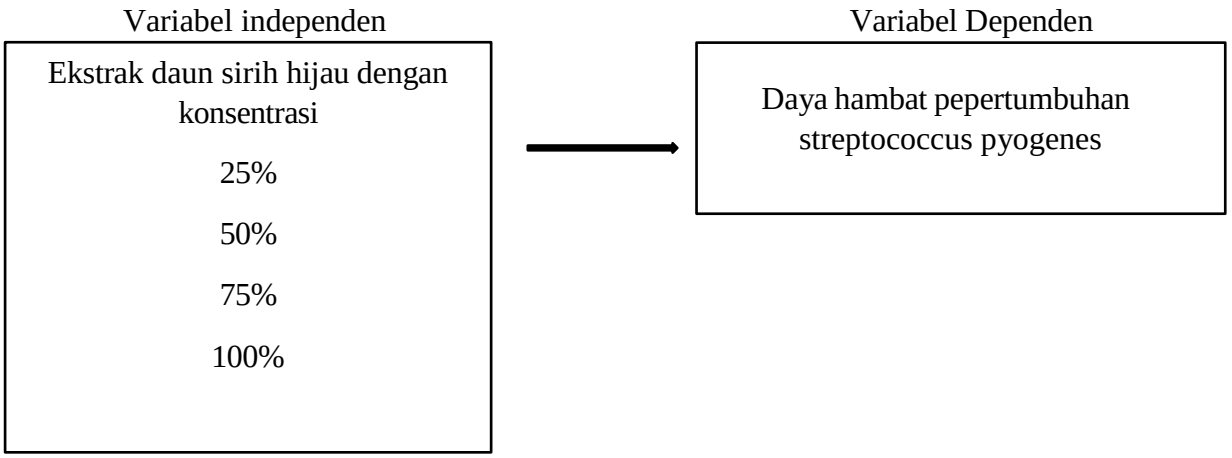
tanaman yang digunakan, sehingga perolehan rendemen dan kandungan senyawa aktif dapat mencapai kondisi yang optimal. Setelah tahapan ekstraksi selesai, campuran kemudian dipisahkan melalui proses penyaringan untuk mendapatkan filtrat. Filtrat tersebut selanjutnya dapat diuapkan atau dikeringkan dengan beberapa teknik, seperti *rotary evaporator*, oven vakum, atau *freeze drying*, khususnya apabila menggunakan pelarut berbasis air. Ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya ditempatkan dalam kondisi bersuhu rendah dan disimpan menggunakan wadah yang bersifat inert, misalnya kaca, untuk meminimalkan terjadinya degradasi maupun interaksi dengan lingkungan. Selain itu, pelarut yang dipilih sebaiknya mempunyai tingkat toksisitas yang rendah, titik didih relatif rendah, kestabilan terhadap senyawa aktif, serta tidak menimbulkan reaksi dengan komponen biomassa tanaman, sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung secara efisien.[26]

## 2.6 Kerangka Teori




Gambar 2.2 Kerangka Teori

## 2.7 Kerangka Konsep




Gambar 2.3 Kerangka Konsep

## 2.8. Hipotesis

- $H_0$: Tidak terdapat perbedaan daya hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* antara berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih hijau.
- $H_1$: Terdapat perbedaan daya hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* antara berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih hijau.

# BAB III
# METODE PENELITIAN

## 3.1. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi | Cara Ukur | Hasil Ukur | Skala |
|---|---|---|---|---|
| **Ekstrak daun sirih (Piper betle Linn.)** | Ekstrak daun sirih diperoleh melalui metode maserasi dengan etanol 96%, kemudian ekstrak yang dihasilkan dibuat menjadi sediaan cair dengan tingkat konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. | Membuat ekstrak daun sirih menggunakan metode maserasi, kemudian menentukan konsentrasi ekstrak sesuai kebutuhan melalui perhitungan pengenceran. Rumus: $V_1M_1 = V_2M_2$ | Diperoleh sediaan ekstrak daun sirih dalam empat tingkatan konsentrasi, yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%. | Numerik |
| **Kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri Streptococcus pyogenes** | Zona bening yang tampak mengitari area pertumbuhan bakteri pada media dapat digunakan sebagai ukuran untuk menilai kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan Streptococcus pyogenes. | Penilaian dilakukan dengan menetapkan ukuran garis tengah pada area bening yang muncul di media kultur bakteri melalui penggunaan jangka sorong. | Diameter zona jernih pada media pertumbuhan bakteri dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). | Numerik |

### 3.2. Jenis Penelitian

Penelitian ini dirancang sebagai penelitian eksperimental yang terdiri atas enam kelompok sebagai objek percobaan. Empat kelompok merupakan kelompok yang memperoleh perlakuan berupa ekstrak daun sirih dengan tingkat konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Sementara itu, dua kelompok lainnya berfungsi sebagai pembanding, yaitu klindamisin yang ditetapkan sebagai kontrol positif serta akuades sebagai kontrol negatif. Hasil pengamatan yang diperoleh dari setiap kelompok perlakuan selanjutnya dianalisis dengan membandingkannya terhadap kelompok kontrol.

### 3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian diselenggarakan selama periode Mei sampai Juli 2026. Tahap pengolahan dan pembuatan ekstrak daun sirih berlangsung di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Adapun kegiatan identifikasi *Streptococcus pyogenes* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

### 3.4. Sampel Penelitian

Bakteri *Streptococcus pyogenes*. Untuk mengetahui berapa banyak sampel yang harus diambil, menggunakan rumus Federer.

**Rumus Federer:**

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

**Keterangan:**

*n* = besar sampel
*t* = jumlah kelompok

Perhitungan:

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Terdapat 4 sampel dari masing-masing kelompok dan percobaan diulang sebanyak 4 kali. Total 24 sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

Perlakuan 1: Ekstrak daun sirih konsentrasi 25%

Perlakuan 2 : Ekstrak daun sirih konsentrasi 50%

Perlakuan 3 : Ekstrak daun sirih konsentrasi 75%

Perlakuan 4 : Ekstrak daun sirih konsentrasi 100%

Perlakuan 5 : Klindamisin sebagai kontrol positif

Perlakuan 6 : Akuades sebagai kontrol negatif

### 3.5. Teknik Pengumpulan Data

Data penelitian dihimpun melalui penentuan diameter zona bening yang muncul di sekitar area pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dengan bantuan jangka sorong. Data yang dihimpun merupakan data primer, yakni data yang diperoleh langsung melalui pengamatan dan pengukuran selama proses penelitian berlangsung.

### 3.6. Alat dan Bahan Penelitian

1. Ekstraksi Daun Sirih

**Alat:**

a. Blender

b. Ayakan

c. Beaker glass

d. Erlenmeyer

e. *Rotary evaporator*

f. *Hotplate stirrer*

g. Timbangan

**Bahan:**

a. Etanol 96%

b. Daun sirih

c. Kertas saring

d. DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)

**2. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau**

**Alat:**

a. Pipet tetes mikro

b. Gelas ukur

**Bahan:**

a. Ekstrak daun sirih hijau

b. FeCl 1%

c. HCl

d. Pereaksi Mayer

e. Etanol 96%

f. Magnesium

g. $FeCl_3$ 3%

h. Larutan $H_2SO_4$

i. Akuades

j. HCl 2N

**3. Uji Daya Hambat**

**Alat:**

a. Autoklaf

b. Ose

c. Pinset

d. Cawan petri

e. Inkubator

f. Jangka sorong

**Bahan:**

a. Spesimen *Streptococcus pyogenes*

b. NaCl 0,9%

c. Blank disk

d. Ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%

e. *Muller Hinton Agar*

f. Klindamisin disk

### 3.7. Cara Kerja

a. Identifikasi Tanaman Sirih

Penetapan identitas tanaman dilakukan guna memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian merupakan spesies *Piper betle* Linn. yang sesuai. Kegiatan tersebut dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Sumatera Utara dengan melibatkan ahli botani.

b. Simplisia Daun Sirih

Daun sirih segar sebanyak 1 kg mula-mula dibersihkan di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat, kemudian ditiriskan. Daun yang telah dibersihkan dipotong menjadi bagian berukuran kecil, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C sampai mencapai keadaan kering. Selanjutnya, daun kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk, kemudian dilakukan pengayakan untuk memperoleh serbuk simplisia yang memiliki keseragaman ukuran.

c. Ekstraksi Daun Sirih

Penyarian daun sirih dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Serbuk simplisia direndam dalam etanol selama 3 × 24 jam pada suhu ruang dan dilakukan pengadukan secara berkala. Setelah proses perendaman selesai, campuran dipisahkan melalui penyaringan dengan kertas saring, sehingga diperoleh filtrat. Filtrat tersebut kemudian dikumpulkan dan

diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak dengan konsistensi kental.

d. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih

1. Uji Flavonoid

   Pemeriksaan flavonoid dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sirih. Sampel ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan beberapa tetes HCl pekat. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah, jingga, atau merah muda, yang menunjukkan adanya flavonoid.

2. Uji Saponin

   Pemeriksaan saponin dilakukan dengan mengocok larutan ekstrak secara kuat di dalam tabung reaksi. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil dan tetap bertahan selama ≥5 menit. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa senyawa saponin terdapat dalam ekstrak.

3. Uji Tanin

   Pemeriksaan tanin dilakukan dengan menambahkan larutan $FeCl_3$ 1% ke dalam ekstrak daun sirih. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna larutan menjadi ungu hingga biru kehitaman, yang menandakan adanya senyawa tanin dalam ekstrak.

4. Uji Alkaloid

   Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan pereaksi Mayer sebagai bahan penguji. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya endapan berwarna putih setelah pereaksi ditambahkan, yang menandakan terdapatnya kandungan alkaloid dalam ekstrak.

e. Uji Daya Hambat

Proses identifikasi *Streptococcus pyogenes* diawali dengan penanaman bakteri pada media agar darah untuk mengamati karakteristik hemolisis yang dihasilkan. Selanjutnya, kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan melalui metode difusi cakram (*disk diffusion*). Suspensi *Streptococcus pyogenes* disiapkan menggunakan larutan NaCl 0,9% steril hingga tingkat kekeruhannya setara dengan standar McFarland 0,5. Pengujian

dilakukan pada media Mueller-Hinton Agar, kemudian suspensi bakteri diinokulasikan secara merata ke seluruh permukaan media dengan menggunakan *swab* steril melalui teknik *lawn culture*.

Cakram kertas steril (*blank disk*) selanjutnya diberikan ekstrak daun sirih sesuai dengan konsentrasi yang telah ditetapkan, yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%. Cakram tersebut dibiarkan selama ±15 menit agar ekstrak terserap dengan baik. Setelah itu, masing-masing cakram diletakkan pada permukaan media menggunakan pinset steril dengan mengatur jarak antarcakram agar tidak saling berdekatan, kemudian ditekan secara perlahan supaya cakram dapat melekat pada media. Klindamisin digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan akuades berperan sebagai kontrol negatif. Cawan petri kemudian ditempatkan dalam inkubator pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam. Setelah periode inkubasi berakhir, terbentuknya zona bening di sekitar cakram diamati dan diameternya diukur menggunakan jangka sorong, dengan hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

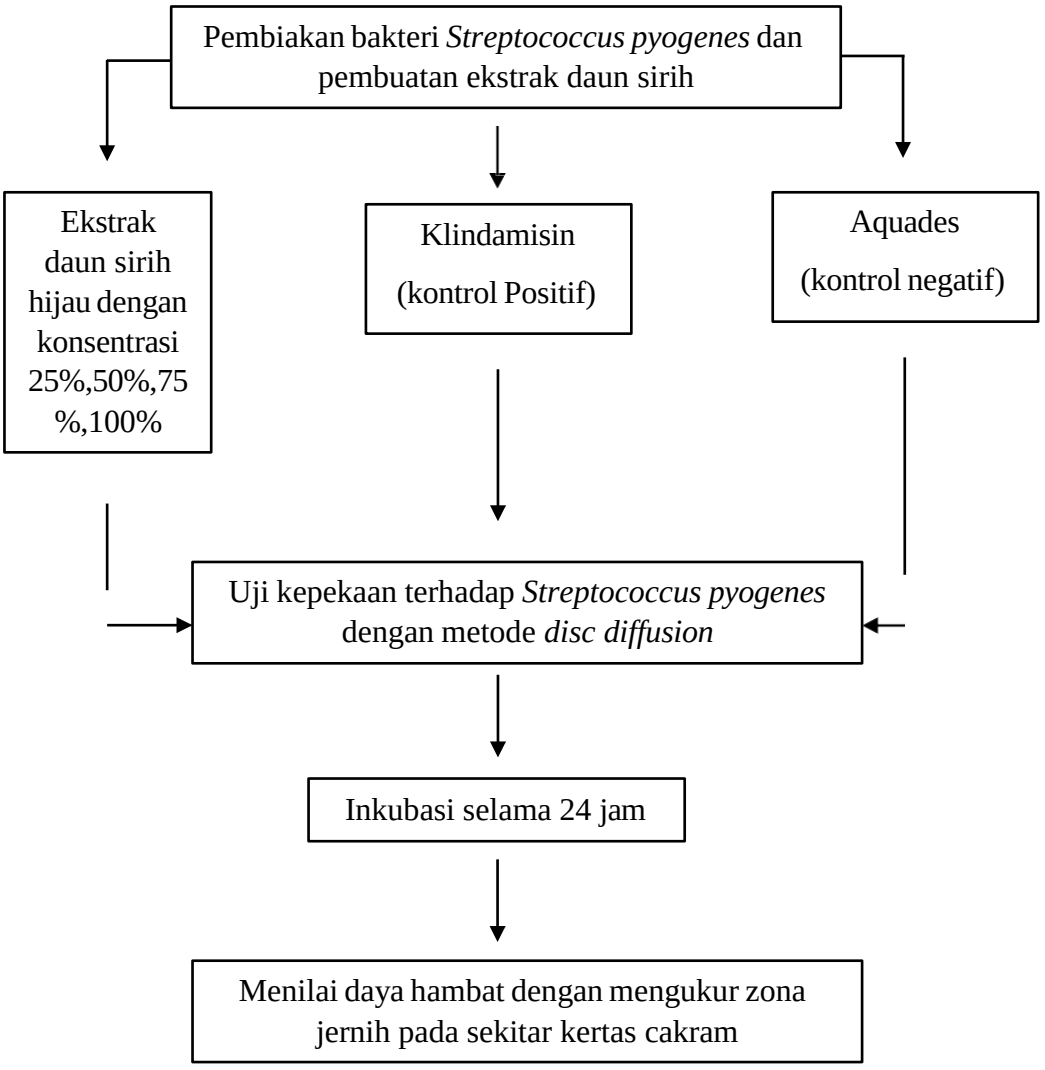
### 3.8 Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh berbentuk data numerik. Analisis statistik diawali dengan menilai distribusi data melalui uji Shapiro–Wilk, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan homogenitas varians untuk menentukan keseragaman varians di antara kelompok perlakuan. Data yang memenuhi kriteria distribusi normal dan varians homogen dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* pada tingkat kepercayaan 95% dengan $\alpha = 0{,}05$.

Apabila hasil pemeriksaan menunjukkan distribusi data yang tidak normal, analisis dilakukan dengan pendekatan nonparametrik melalui uji Kruskal–Wallis pada $\alpha = 0{,}05$ guna mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antarkelompok. Pada data yang memenuhi asumsi normalitas, pengujian lanjutan dilakukan menggunakan *Post Hoc LSD* (*Least Significant Difference*) untuk mengidentifikasi perbedaan rerata efektivitas antibakteri ekstrak daun sirih (*Piper betle* Linn.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Sementara itu, apabila data tidak memenuhi asumsi normalitas, hasil uji

Kruskal–Wallis diteruskan dengan pengujian *post hoc* yang sesuai guna menentukan kelompok yang memiliki perbedaan bermakna.

### 3.7. Alur Penelitian




Gambar 3. 1 Alur Penelitian

# BAB IV
# HASIL DAN PEMBAHASAN

## 4.1. Hasil Penelitian

Kajian eksperimental laboratorium ini diselenggarakan pada rentang waktu Mei–Juli 2026 setelah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Preparasi ekstrak daun sirih hijau bertempat di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, sedangkan pemeriksaan aktivitas penghambatan terhadap *Streptococcus pyogenes* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Rangkaian percobaan terdiri atas empat kelompok perlakuan berdasarkan konsentrasi ekstrak, yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%, serta dua kelompok pembanding, yakni klindamisin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Masing-masing kelompok diberikan pengulangan sebanyak empat kali.

### 4.1.1. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia yang diselenggarakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Medan, ekstrak daun sirih hijau memperlihatkan adanya kandungan flavonoid, tanin, dan saponin, sedangkan alkaloid menunjukkan hasil negatif. Pemeriksaan flavonoid dengan menggunakan $FeCl_3$ 5%, magnesium, dan HCl pekat memperlihatkan reaksi positif. Identifikasi tanin menggunakan $FeCl_3$ 1% turut memberikan hasil positif, sedangkan pemeriksaan saponin dengan akuades dan HCl pekat juga menunjukkan hasil positif. Sebaliknya, pengujian alkaloid menggunakan pereaksi Dragendorff dan Mayer tidak memperlihatkan reaksi yang menandakan keberadaan alkaloid, sehingga senyawa tersebut tidak terdeteksi pada ekstrak yang diperiksa.

Hasil penapisan tersebut memberikan indikasi bahwa kemampuan ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada kajian ini diduga

berkaitan dengan keberadaan flavonoid, tanin, dan saponin. Flavonoid dapat mengganggu integritas dinding maupun membran sel bakteri serta berikatan dengan protein sel membentuk suatu kompleks. Tanin dapat menyebabkan presipitasi protein dan menghambat aktivitas enzim bakteri, sedangkan saponin mampu meningkatkan permeabilitas membran yang selanjutnya dapat memicu keluarnya komponen intraseluler. Walaupun sejumlah literatur menyatakan bahwa daun sirih mengandung alkaloid, senyawa tersebut tidak teridentifikasi pada ekstrak yang diperiksa dalam kajian ini. Perbedaan hasil tersebut dapat berkaitan dengan kondisi tanaman, tahapan ekstraksi, karakteristik pelarut, kadar senyawa, serta sensitivitas metode identifikasi kualitatif yang digunakan.

Hasil pemeriksaan tersebut diperkuat oleh Surat Keterangan Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Medan Nomor 0030/UN33.4.6.3/LF/2025, tertanggal 9 Juli 2025.

**Tabel 4. 1 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih**

| Nama Sample | No | Senyawa Metabolit Sekunder | Pereaksi | Hasil Skrining |
|---|---|---|---|---|
| **Ekstrak Daun Sirih** | 1 | Flavonoid | $FeCl_{3(aq)}$ 5% | + |
| | | | $Mg_{(s)}+HCL_{(p)}$ | + |
| | 2 | Alkaloid | Dragendorff | - |
| | | | Mayer | - |
| | 3 | Tanin | $FeCl_{3(aq)}$ 1% | + |
| | 4 | Saponin | Aquadest | + |
| | | | $HCL_{(p)}$ | + |

### 4.1.2 Daya Hambat Ekstrak Daun Sirih Terhadap *Streptococcus Pyogenes*

**Tabel 4. 2 Perbedaan Zona Hambat**

| Pengulangan | Pengulangan 1 | Pengulangan 2 | Pengulangan 3 | Pengulangan 4 | Rata-Rata |
|---|---|---|---|---|---|
| Ekstrak Daun sirih 25% | 9,2 mm | 9,5 mm | 9 mm | 13,4 mm | 10,27mm |
| Ekstrak Daun sirih 50% | 12,7 mm | 12,2 mm | 11,7 mm | 15,2 mm | 12,95 mm |
| Ekstrak Daun sirih 75% | 14,3 mm | 14,2 mm | 14,7 mm | 19,2 mm | 15,6 mm |
| Ekstrak Daun sirih 100% | 14,7 mm | 15,1 mm | 14,5 mm | 20,5 mm | 16,2 mm |
| Kontrol + | 22 mm | 19,4 mm | 23,6 mm | 23 mm | 22 mm |
| Kontrol - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Hasil pengamatan memperlihatkan variasi ukuran area bening setelah pemberian sediaan ekstrak daun sirih dalam beberapa taraf perlakuan. Pada kadar 25%, ukuran area bening paling kecil ditemukan pada pengulangan ke-3, yaitu 9 mm, sedangkan ukuran paling besar diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan 13,4 mm. Nilai tengah hasil pengukuran untuk kadar tersebut mencapai 10,27 mm.

Pada taraf 50%, ukuran area jernih terendah tercatat pada pengulangan ke-3, yakni 11,7 mm. Sementara itu, hasil pengukuran tertinggi diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan ukuran 15,2 mm. Rerata pengukuran yang diperoleh dari taraf 50% mencapai 12,95 mm.

Pada taraf perlakuan 75%, nilai pengukuran paling rendah dijumpai pada pengulangan ke-2 sebesar 14,2 mm, sedangkan nilai tertinggi tercatat pada

pengulangan ke-4 dengan ukuran 19,2 mm. Rata-rata hasil pengukuran pada taraf ini mencapai 15,6 mm.

Pada taraf 100%, hasil pengukuran minimum ditemukan pada pengulangan ke-3, yaitu 14,5 mm, sedangkan nilai maksimum tercatat pada pengulangan ke-4 sebesar 20,5 mm. Nilai rata-rata yang diperoleh dari perlakuan 100% adalah 16,2 mm.

Pada kelompok pembanding positif yang menggunakan antibiotik klindamisin, hasil pengukuran paling rendah diperoleh pada pengulangan ke-2 sebesar 19,4 mm, sedangkan hasil tertinggi ditemukan pada pengulangan ke-3 dengan ukuran 23,6 mm. Rata-rata ukuran area bening pada kelompok tersebut mencapai 22 mm. Sebaliknya, kelompok pembanding negatif tidak memperlihatkan terbentuknya area jernih.

Mengacu pada standar CLSI, hasil pengukuran klindamisin sebesar 22,00 mm termasuk kategori sensitif, sebab telah memenuhi batas kriteria ≥19 mm. Sementara itu, hasil pengukuran dari sediaan daun sirih tidak dapat ditempatkan dalam kategori sensitif, intermediet, maupun resisten menurut CLSI, karena nilai *breakpoint* yang digunakan tersebut ditetapkan untuk klindamisin dan tidak ditujukan bagi bahan ekstrak herbal.

**Tabel 4.3 Hasil analisis uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas**

| Kelompok | Uji Normalitas | Uji Homogenitas |
|---|---|---|
| 25% | 0,019 | 0,996 |
| 50% | 0,240 | |
| 75% | 0,013 | |
| 100% | 0,014 | |
| Kontrol(+) | 0,447 | |

Berdasarkan Tabel 4.3, hasil pemeriksaan kenormalan data dengan Shapiro–Wilk memperlihatkan bahwa kelompok ekstrak daun sirih pada konsentrasi 25% memiliki nilai p=0,019, sedangkan konsentrasi 75% menunjukkan nilai p=0,013. Kedua nilai tersebut berada di bawah taraf kemaknaan 0,05, sehingga sebaran data

pada kedua kelompok tersebut dinyatakan tidak normal. Adapun kelompok konsentrasi 50% memperoleh nilai p=0,240, konsentrasi 100% sebesar p=0,447, dan kelompok kontrol positif sebesar p=0,447. Ketiga kelompok tersebut memiliki nilai p>0,05, sehingga pola distribusi datanya dinyatakan normal.

Hasil pengujian keseragaman varians menunjukkan nilai p=0,996. Karena nilai tersebut melampaui 0,05, varians data antarkelompok dinyatakan homogen. Kendati kesamaan varians telah terpenuhi, persyaratan kenormalan data belum tercapai, mengingat kelompok konsentrasi 25% dan 75% memperlihatkan distribusi yang tidak normal. Dengan demikian, penggunaan analisis parametrik *One-Way ANOVA* tidak memenuhi prasyarat statistik. Analisis selanjutnya untuk menilai perbedaan daya hambat di antara kelompok penelitian dilakukan dengan pendekatan nonparametrik melalui uji Kruskal–Wallis.

**Tabel 4. 4 Hasil uji Kruskall-Wallis**

| **Kelompok** | **n** | **Rata-rata ±SD** | **P** |
|---|---|---|---|
| 25% | 4 | 10,27 ± 2,09 | 0,001 |
| 50% | 4 | 12,95 ± 1,55 | |
| 75% | 4 | 15,6 ± 2,40 | |
| 100% | 4 | 16,2 ± 2,87 | |
| Kontrol (+) | 4 | 22 ± 1,85 | |

Data tersebut memuat gambaran rerata kemampuan hambat ekstrak daun sirih pada setiap jenjang konsentrasi. Pada konsentrasi 25%, diperoleh rerata daya hambat sebesar 10,27 mm dengan standar deviasi 2,09. Konsentrasi 50% menghasilkan rerata 12,95 mm dengan standar deviasi 1,55. Pada konsentrasi 75%, rerata daya hambat mencapai 15,6 mm dengan standar deviasi 2,40, sedangkan konsentrasi 100% memperlihatkan rerata sebesar 16,2 mm dengan standar deviasi 2,87. Sementara itu, kelompok kontrol positif dengan klindamisin menunjukkan rerata daya hambat sebesar 22 mm dan standar deviasi 1,85.

Hasil analisis Kruskal–Wallis memperoleh nilai $p$ <0,001 ($p$<0,05). Hasil tersebut mengindikasikan adanya disparitas yang bermakna pada rerata daya hambat antarkelompok perlakuan, sehingga konsentrasi ekstrak daun sirih dapat

dikaitkan dengan kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Untuk menguraikan perbedaan yang lebih spesifik pada masing-masing pasangan kelompok, analisis selanjutnya dilakukan menggunakan uji Mann–Whitney.

**Tabel 4. 5 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 50%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,149 |
| 50% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,149 ($p < 0,05$) pada perbandingan ekstrak daun sirih berkonsentrasi 25% dan 50%, yang menunjukkan bahwa perbedaan daya hambat di antara kedua konsentrasi tersebut tidak menunjukkan kemaknaan secara statistik.

**Tabel 4. 6 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 75%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| 75% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,021 ($p < 0,05$) pada perbandingan ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dan 75%, yang menandakan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 7 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| 100% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,021 (p < 0,05) pada perbandingan ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dan 100%, yang menunjukkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik di antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 8 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| Klindamisin | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) pada perbandingan ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan kontrol positif klindamisin, yang mengisyaratkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut. Rapiin

**Tabel 4. 9 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,014 (p < 0,05) pada perbandingan ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan kontrol negatif akuades, yang mengisyaratkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 10 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 75%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,149 |
| 75% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney menunjukkan nilai p sebesar 0,149 (p < 0,05) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dan 75%, yang mengindikasikan bahwa perbedaan daya hambat kedua kelompok tersebut tidak bermakna secara statistik.

**Tabel 4. 11 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,149 |
| 100% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,149 (p < 0,05) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dan 100%, yang mengisyaratkan bahwa perbedaan daya hambat pada kedua kelompok tersebut tidak mencapai kemaknaan statistik.

**Tabel 4. 12 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,021 |
| Klindamisin | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,021 (p < 0,05) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dan kontrol positif klindamisin, yang mengisyaratkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 13 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,014 (p < 0,05) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dan kontrol negatif akuades, yang mengisyaratkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 14 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,309 |
| 100% | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,309 (p < 0,05) pada komparasi ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 100%, yang menunjukkan bahwa perbedaan daya hambat antara kedua kelompok tersebut tidak mencapai kemaknaan secara statistik.

**Tabel 4. 15 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,021 |
| klindamisin | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,021 (p < 0,05) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dan kontrol positif klindamisin, yang mengisyaratkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik di antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 16 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperlihatkan nilai p sebesar 0,014 ($p < 0,05$) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dan kontrol negatif akuades, yang mengindikasikan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 17 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 100% | 4 | 0,043 |
| klindamisin | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,043 ($p < 0,05$) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dan kontrol positif klindamisin, yang menunjukkan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 18 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 100% | 4 | 0,014 |
| Aquadest | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney memperoleh nilai p sebesar 0,014 ($p < 0,05$) pada komparasi antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dan kontrol negatif akuades, yang mengindikasikan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik di antara kedua kelompok tersebut.

**Tabel 4. 19 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih klindamisin dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| Klindamisin | 4 | 0,014 |
| Aquadest | 4 | |

Hasil uji Mann–Whitney menunjukkan nilai p sebesar 0,014 ($p < 0,05$) pada komparasi antara kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif akuades, yang menandakan terdapat perbedaan daya hambat yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok tersebut.

### 4.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kemampuan ekstrak DMSO daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, serta membandingkan aktivitas tersebut dengan klindamisin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak mampu membentuk zona hambat, dengan rerata diameter masing-masing sebesar 10,28 mm, 12,95 mm, 15,60 mm, dan 16,20 mm. Klindamisin menghasilkan rerata zona hambat sebesar 22,00 mm, sedangkan akuades tidak memperlihatkan pembentukan zona hambat. Berdasarkan uji Kruskal–Wallis, diperoleh nilai $p = 0,001$, yang mengindikasikan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna antarkelompok penelitian.

Kemaknaan yang diperoleh melalui uji Kruskal–Wallis dapat dikaitkan dengan adanya rentang diameter zona hambat yang cukup mencolok antara kelompok ekstrak, kontrol positif, dan kontrol negatif. Kelompok akuades tidak memperlihatkan zona hambat, sedangkan seluruh konsentrasi ekstrak menghasilkan zona hambat dengan kisaran 10,28–16,20 mm dan klindamisin mencapai 22,00 mm. Sebaran nilai yang relatif lebar tersebut menyebabkan peringkat hasil pengamatan antarkelompok memiliki perbedaan yang nyata, sehingga uji Kruskal–Wallis mampu mengidentifikasi setidaknya satu kelompok dengan perbedaan bermakna. Kendati demikian, kemaknaan hasil tersebut tidak serta-merta menunjukkan bahwa setiap konsentrasi ekstrak memiliki perbedaan satu sama lain, sebab Kruskal–Wallis merupakan uji

omnibus yang digunakan untuk menilai perbedaan secara keseluruhan.[27]

Terbentuknya zona hambat pada seluruh tingkatan konsentrasi mengisyaratkan adanya komponen bioaktif dalam daun sirih hijau yang berkemampuan menghambat pertumbuhan *S. pyogenes*. Daun sirih diketahui mengandung senyawa fenolik, hidroksikavikol, kavikol, kavibetol, eugenol, flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan terpenoid. Beragam komponen tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri melalui intervensi terhadap struktur dinding sel, membran sitoplasma, protein, enzim, serta lintasan metabolisme bakteri. Dengan demikian, zona hambat yang terbentuk diduga merupakan konsekuensi dari aktivitas kolektif sejumlah senyawa bioaktif, bukan semata-mata berasal dari satu komponen tertentu.[28,29]

Secara fisiologis, senyawa fenolik yang terdapat pada daun sirih dapat berinteraksi dengan komponen lipid maupun protein penyusun membran bakteri, sehingga memicu peningkatan permeabilitas membran dan menyebabkan keluarnya ion serta substansi intraseluler. Flavonoid berpotensi berikatan dengan protein pada dinding sel dan menginterupsi fungsi membran, sedangkan tanin dapat menginduksi presipitasi protein sekaligus menghambat aktivitas enzim. Saponin memiliki karakteristik menyerupai surfaktan yang memungkinkan senyawa tersebut mengusik kestabilan membran sel. Kerusakan pada struktur membran disertai terganggunya aktivitas enzim dapat melemahkan kemampuan bakteri dalam mempertahankan keseimbangan internal (*homeostasis*), sehingga pada akhirnya pertumbuhan bakteri mengalami penghambatan.[28,29]

Kenaikan rerata diameter zona hambat pada konsentrasi 25% hingga 100% memperlihatkan adanya kecenderungan pola konsentrasi–respons. Dengan volume larutan yang dipertahankan sama, konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi mengandung proporsi senyawa bioaktif yang lebih besar. Semakin tinggi kandungan senyawa aktif yang terdeposit pada cakram, semakin besar pula peluang komponen tersebut berdifusi ke dalam medium dan berinteraksi dengan sel bakteri. Penelitian Ngamsurach dan Praipipat melaporkan bahwa ekstrak daun sirih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram

positif maupun Gram negatif, serta tingkat penghambatannya berkaitan dengan konsentrasi dan karakteristik ekstrak yang digunakan.[29]

Hasil penelitian ini memiliki kesesuaian dengan temuan Amanda et al. yang meneliti aktivitas antibakteri rebusan daun sirih terhadap *S. pyogenes*. Penelitian tersebut memperoleh rerata zona hambat 0 mm pada konsentrasi 20%, 12,9 mm pada konsentrasi 40%, 22,7 mm pada konsentrasi 60%, 25,5 mm pada konsentrasi 80%, dan 30 mm pada konsentrasi 100%, serta melaporkan adanya perbedaan diameter zona hambat yang bermakna antarkonsentrasi. Keteraturan pola tersebut memperlihatkan bahwa peningkatan konsentrasi daun sirih cenderung disertai peningkatan kemampuan penghambatan terhadap *S. pyogenes*. Adanya perbedaan ukuran zona hambat antara penelitian tersebut dan penelitian ini dapat berkaitan dengan perbedaan teknik preparasi bahan uji, kuantitas ekstrak yang diaplikasikan pada setiap cakram, jenis pelarut, komposisi media, ketebalan agar, karakteristik isolat bakteri, serta kondisi inkubasi.[30]

Penelitian Surjowardojo et al. pada *Streptococcus agalactiae* juga memperlihatkan pola peningkatan rerata zona hambat sejalan dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak air daun sirih muda. Diameter zona hambat meningkat dari 5,18 mm pada konsentrasi 10% menjadi 5,96 mm pada konsentrasi 20% dan 6,38 mm pada konsentrasi 30%. Walaupun menggunakan spesies bakteri yang berbeda, temuan tersebut turut memperkuat kecenderungan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih menyediakan lebih banyak komponen antibakteri, sehingga kemampuan penghambatannya cenderung mengalami peningkatan.[31]

Dalam penelitian ini, ekstrak berkonsentrasi 100% memperlihatkan rerata zona hambat paling besar di antara kelompok perlakuan ekstrak, yaitu sebesar 16,20 mm. Meskipun demikian, hasil uji Mann–Whitney menunjukkan bahwa kelompok konsentrasi 75% dan 100% tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna, dengan nilai p = 0,309. Keadaan tersebut dapat dikaitkan dengan perbedaan rerata yang relatif kecil, yakni hanya 0,60 mm, sementara variasi hasil pengukuran pada masing-masing kelompok cukup lebar. Diameter

zona hambat pada konsentrasi 75% berada dalam rentang 14,2–19,2 mm, sedangkan konsentrasi 100% berada pada rentang 14,5–20,5 mm. Terdapatnya irisan rentang nilai yang cukup luas menyebabkan selisih rerata kedua kelompok belum cukup kuat untuk menunjukkan kemaknaan secara statistik, terutama karena jumlah pengulangan pada setiap kelompok hanya empat kali.[27]

Ketiadaan perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 75% dan 100% dapat pula ditinjau dari keterbatasan teknik difusi cakram. Besarnya zona hambat tidak semata-mata ditentukan oleh aktivitas antibakteri, tetapi turut bergantung pada kapasitas senyawa aktif untuk bermigrasi melalui medium agar. Ekstrak dengan konsentrasi yang lebih tinggi berpotensi mempunyai viskositas yang lebih besar serta mengandung komponen yang lebih kompleks. Keadaan tersebut menyebabkan penambahan kandungan senyawa aktif tidak senantiasa berbanding lurus dengan laju maupun jangkauan difusi. Oleh karena itu, walaupun konsentrasi 100% mengandung komponen ekstrak dalam jumlah lebih tinggi, diameter zona hambat yang dihasilkan tidak selalu mengalami peningkatan secara proporsional apabila dibandingkan dengan konsentrasi 75%.[27,32]

Penerapan teknik difusi cakram pada bahan ekstrak tumbuhan turut dipengaruhi oleh karakteristik fisikokimia senyawa, meliputi polaritas, kelarutan, bobot molekul, serta interaksinya dengan medium. Senyawa aktif yang memiliki bobot molekul besar ataupun tingkat kelarutan rendah dapat tetap memperlihatkan aktivitas antibakteri, tetapi menghasilkan zona hambat yang relatif terbatas karena mobilitasnya di dalam medium agar tidak optimal. Sebaliknya, senyawa yang mempunyai kemampuan difusi lebih tinggi dapat membentuk zona hambat dengan diameter yang lebih luas. Dengan demikian, diameter zona hambat sebaiknya dimaknai sebagai manifestasi perpaduan antara aktivitas antibakteri dan kapasitas difusi senyawa, bukan sebagai representasi mutlak dari potensi antibakteri suatu bahan.[27,32]

Tidak ditemukannya perbedaan yang bermakna pada perbandingan konsentrasi 25% dengan 50%, 50% dengan 75%, serta 50% dengan 100% diduga berkaitan dengan terbatasnya jumlah pengulangan dalam setiap

kelompok. Dengan hanya empat kali pengulangan, satu hasil pengukuran yang menyimpang lebih tinggi maupun lebih rendah dapat memberikan pengaruh cukup besar terhadap rerata dan simpangan baku. Pada penelitian ini, pengulangan keempat memperlihatkan diameter zona hambat yang cenderung lebih besar pada seluruh kelompok ekstrak dibandingkan sebagian besar hasil pada pengulangan pertama hingga ketiga. Keragaman tersebut memperlebar sebaran data dan berpotensi mengurangi sensitivitas analisis statistik dalam mengenali perbedaan antarkonsentrasi yang relatif kecil.[27]

Ketidakseragaman pada pengulangan keempat dimungkinkan pula berkaitan dengan aspek teknis selama pelaksanaan pemeriksaan. Diameter zona hambat dapat dipengaruhi oleh ketebalan agar, kepadatan inokulum, pemerataan suspensi bakteri, volume larutan yang terserap pada cakram, jarak antarcakram, durasi perendaman, suhu, serta lama inkubasi. Agar dengan ketebalan lebih tipis memungkinkan zat antimikroba berpenetrasi dan menyebar lebih mudah, sehingga zona hambat dapat menjadi lebih luas, sedangkan lapisan agar yang lebih tebal cenderung membatasi penyebaran senyawa. Oleh sebab itu, penyeragaman ketebalan Mueller–Hinton agar, kekeruhan suspensi setara McFarland 0,5, volume ekstrak pada setiap cakram, serta kondisi inkubasi diperlukan untuk meminimalkan keragaman hasil antarpengulangan.[27,33]

Perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 25% dengan konsentrasi 75% dan 100%, yang masing-masing memiliki nilai $p = 0,021$, dapat dikaitkan dengan rentang perbedaan daya hambat yang lebih nyata. Rerata zona hambat pada konsentrasi 25% hanya mencapai 10,28 mm, sedangkan konsentrasi 75% dan 100% masing-masing mencapai 15,60 mm dan 16,20 mm. Kesenjangan konsentrasi yang lebih besar memungkinkan jumlah komponen aktif yang tersedia juga meningkat, sehingga menghasilkan pemisahan nilai zona hambat yang lebih jelas dibandingkan kelompok dengan konsentrasi berdekatan. Temuan ini selaras dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih dapat memperbesar diameter zona hambat, meskipun kenaikannya tidak selalu membentuk pola linear.[29,31]

Klindamisin menghasilkan diameter zona hambat terbesar, yakni 22,00 mm, sehingga secara deskriptif melampaui seluruh kelompok ekstrak. Daya hambat klindamisin yang lebih besar dapat dikaitkan dengan kandungan zat aktif, dosis cakram, tingkat kemurnian, kestabilan, serta karakteristik difusinya yang telah terstandar. Klindamisin bekerja dengan berikatan pada subunit ribosom 50S sehingga proses sintesis protein bakteri mengalami hambatan. Pada *S. pyogenes*, penghambatan tersebut turut berpotensi menekan pembentukan toksin dan sejumlah faktor virulensi, sehingga aktivitas klindamisin tidak hanya berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan bakteri, tetapi juga dengan penekanan ekspresi komponen yang menunjang *pathogenesis*.[34,35]

Sebaliknya, konsentrasi ekstrak 100% tidak dapat dimaknai sebagai kandungan senyawa antibakteri dalam keadaan murni. Ekstrak daun sirih masih berupa campuran berbagai komponen tanaman, yang meliputi senyawa aktif, komponen yang tidak memiliki aktivitas antibakteri, pigmen, serta substansi lain dengan kemampuan difusi yang beragam. Kadar hidroksikavikol, eugenol, flavonoid, maupun komponen aktif lainnya juga belum dilakukan kuantifikasi dalam penelitian ini. Dengan demikian, tingginya konsentrasi ekstrak tidak serta-merta mencerminkan tingginya kadar senyawa antibakteri secara spesifik. Walaupun ekstrak 100% merupakan konsentrasi paling pekat, aktivitas penghambatannya tetap berada di bawah klindamisin sebagai antibiotik yang telah terstandar.[28,29]

Akuades sebagai kontrol negatif tidak memperlihatkan pembentukan zona hambat pada seluruh pengulangan. Temuan tersebut mendukung dugaan bahwa aktivitas penghambatan pada kelompok perlakuan berasal dari komponen ekstrak daun sirih, bukan dari akuades. Meskipun demikian, pemilihan kontrol negatif perlu disesuaikan dengan pelarut yang digunakan dalam pembuatan sediaan ekstrak. Apabila ekstrak dilarutkan menggunakan DMSO, etanol, atau kombinasi pelarut tertentu, maka pelarut yang sama pada konsentrasi setara semestinya digunakan sebagai kontrol negatif. Penggunaan kontrol pelarut yang tepat diperlukan untuk memastikan bahwa zona hambat

yang terbentuk tidak berasal dari efek antimikroba pelarut.[32]

Tidak adanya perbedaan bermakna pada sejumlah pasangan konsentrasi dapat berkaitan dengan selisih diameter yang relatif sempit, irisan nilai antarkelompok, keragaman hasil pengulangan, serta jumlah pengulangan yang terbatas, yang secara bersama-sama dapat mengurangi kemampuan analisis dalam menangkap perbedaan kecil.[37] Selain itu, pada metode difusi cakram, ukuran zona hambat tidak hanya ditentukan oleh aktivitas antibakteri bahan uji, tetapi juga oleh karakteristik difusi senyawa aktif di dalam medium dan kondisi teknis selama pemeriksaan.[38]

Dalam penelitian ini, konsentrasi 100% memberikan diameter zona hambat terbesar secara deskriptif di antara kelompok ekstrak, tetapi tidak memperlihatkan perbedaan bermakna secara statistik dibandingkan konsentrasi 75%. Dengan demikian, konsentrasi 100% belum dapat dinyatakan mempunyai daya hambat yang secara statistik lebih tinggi daripada konsentrasi 75%, meskipun secara deskriptif nilai diameternya lebih besar.

# BAB V
# KESIMPULAN DAN SARAN

## 5.1. Kesimpulan

Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% memperlihatkan kemampuan menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat pada seluruh kelompok perlakuan. Rerata diameter zona hambat cenderung bertambah seiring peningkatan konsentrasi ekstrak, yaitu 10,28 mm pada konsentrasi 25%, 12,95 mm pada konsentrasi 50%, 15,60 mm pada konsentrasi 75%, dan 16,20 mm pada konsentrasi 100%.

Hasil analisis Kruskal–Wallis memperlihatkan adanya perbedaan diameter zona hambat yang bermakna di antara kelompok penelitian, dengan nilai $p = 0,001$. Konsentrasi 100% menghasilkan daya hambat terbesar secara numerik di antara kelompok ekstrak, tetapi tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan konsentrasi 75%. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi dari 75% menjadi 100% belum memberikan peningkatan daya hambat yang bermakna secara statistik.

Klindamisin sebagai kontrol positif memperoleh rerata zona hambat paling besar, yaitu 22,00 mm, sedangkan akuades sebagai kontrol negatif tidak memperlihatkan terbentuknya zona hambat. Dengan demikian, ekstrak daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*, tetapi daya hambat yang dihasilkan masih lebih rendah dibandingkan klindamisin dan belum dapat dipergunakan sebagai pengganti antibiotik standar.

## 5.2. Saran

### 1. Bagi Peneliti Selanjutnya

Penelitian berikutnya disarankan melibatkan jumlah pengulangan yang lebih banyak agar keragaman data dapat dikendalikan dengan lebih baik dan kekuatan analisis statistik semakin meningkat. Penambahan jumlah pengulangan juga diperlukan untuk memastikan apakah perbedaan daya hambat

antara konsentrasi 75% dan 100% benar-benar tidak bermakna atau dipengaruhi oleh keterbatasan jumlah sampel.[37]

**2. Pengembangan Metode Penelitian**

Penelitian mendatang diharapkan melakukan pemeriksaan kadar hambat minimum dan kadar bunuh minimum melalui metode dilusi atau mikrodilusi. Pemeriksaan tersebut diperlukan untuk menentukan konsentrasi terendah ekstrak yang mampu menghambat serta membunuh *Streptococcus pyogenes*, karena metode difusi cakram hanya memberikan gambaran berdasarkan diameter zona hambat dan hasilnya sangat dipengaruhi oleh kemampuan senyawa untuk berdifusi dalam media agar.[39]

**3. Standardisasi Ekstrak dan Prosedur Laboratorium**

Penelitian selanjutnya disarankan menerapkan standardisasi terhadap bahan tanaman dan ekstrak, meliputi usia daun, lokasi pengambilan tanaman, teknik pengeringan, jenis dan volume pelarut, durasi ekstraksi, rendemen, serta kadar senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, eugenol, kavikol, dan hidroksikavikol. Selain itu, volume ekstrak pada setiap cakram, ketebalan media, kepadatan inokulum, waktu perendaman cakram, serta kondisi inkubasi perlu diseragamkan guna menekan variasi hasil antarpengulangan.[40]

**4. Penggunaan Kontrol yang Sesuai**

Kontrol negatif sebaiknya menggunakan pelarut akhir yang sama dengan pelarut yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak. Apabila ekstrak dilarutkan menggunakan DMSO, etanol, atau campuran pelarut tertentu, maka pelarut tersebut juga perlu digunakan sebagai kontrol negatif agar pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri dapat dikendalikan secara tepat.[39]

**5. Pengembangan Penelitian**

Penelitian lanjutan dapat diarahkan pada pengembangan ekstrak daun sirih hijau menjadi bentuk sediaan yang lebih terstandar, seperti gel, obat kumur, atau sediaan topikal, setelah melalui uji toksisitas dan keamanan. Penelitian *in vivo* serta uji klinis juga diperlukan sebelum ekstrak daun sirih hijau dapat dipertimbangkan sebagai agen antibakteri tambahan untuk infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes*.

## 6. Implikasi Klinis

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa ekstrak daun sirih hijau memiliki potensi antibakteri secara *in vitro*, tetapi belum dapat digunakan sebagai pengganti klindamisin maupun antibiotik lainnya dalam praktik klinis. Penggunaan antibiotik tetap perlu didasarkan pada hasil pemeriksaan klinis, kultur, dan uji kepekaan bakteri serta pertimbangan tenaga medis.[41]

# DAFTAR PUSTAKA


1. Jespersen MG, Lacey JA, Tong SYC, Davies MR. Global genomic epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2020;86:104609. doi:10.1016/j.meegid.2020.104609.
2. Avire NJ, Whiley H, Ross K. A review of *Streptococcus pyogenes*: Public health risk factors, prevention and control. Pathogens. 2021;10(2):1-18. doi:10.3390/pathogens10020248.
3. Adamkova V, Adamkova VG, Kroneislova G, et al. Increasing rate of fatal *Streptococcus pyogenes* bacteriemia—A challenge for prompt diagnosis and appropriate therapy in real praxis. Microorganisms. 2024;12(5). doi:10.3390/microorganisms12050995.
4. Sadiah HH, Cahyadi AI, Windria S. Kajian potensi daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebagai antibakteri: A review of green betel leaf (*Piper betle* L.) potency as antibacterial. J Sain Vet. 2022;40(2):128-138. https://jurnal.ugm.ac.id/jsv.
5. Ni Luh Putu Taksayani Putri, Ni Luh Putu Vidya Paramita. Review aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) metode difusi dan mikrodilusi. J Sci MANDALIKA. 2023;4(2):6-18. doi:10.36312/10.36312/vol4iss2pp6-18.
6. Rahmawati N, Mujahid R, Widiyastuti Y. Budidaya dan manfaat sirih untuk kesehatan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Published online 2020:1-122.
7. Agung IG, Hervina, Sandi N. Nutrisi dan zat bioaktif daun sirih (*Piper betle* L.), kesehatan gigi dan mulut, serta COVID-19. 2021.
8. Jepriani N, Maulana F. Pemanfaatan tanaman obat tradisional oleh Suku Dayak Ma'anyan Desa Kalamus Kecamatan Paku Kabupaten Barito Timur. J Pendidik Hayati. 2022;8(2):61-87.

9. Hermanto LO, Nibenia J, Sharon K, Rosa D. Review artikel: Pemanfaatan tanaman sirih (*Piper betle* L.) sebagai obat tradisional. Pharm Sci J. 2023;3(1):33-42.
10. Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, et al. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. Molecules. 2019;24(7). doi:10.3390/molecules24071364.
11. Dwivedi V, Tripathi S. Review study on potential activity of *Piper betle*. J Pharmacogn Phytochem JPP. 2014;93(34):9398.
12. Pradhan D, Suri KA, Pradhan DK, Biswasroy P. Golden heart of the nature: *Piper betle* L. J Pharmacogn Phytochem. 2013;1(6):147-167.
13. Avire NJ, Whiley H, Ross K. A review of *Streptococcus pyogenes*: Public health risk factors, prevention and control. Pathogens (Basel, Switzerland). 2021;10(2). doi:10.3390/pathogens10020248.
14. Wessels MR. Cell wall and surface molecules of *Streptococcus pyogenes*: Capsule. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, eds. 2022.
15. Hurst JR, Shannon BA, Craig HC, Rishi A, Tuffs SW, McCormick JK. The *Streptococcus pyogenes* hyaluronic acid capsule promotes experimental nasal and skin infection by preventing neutrophil-mediated clearance. PLoS Pathog. 2022;18(11):e1011013. doi:10.1371/journal.ppat.1011013.
16. van Sorge NM, Cole JN, Kuipers K, et al. The classical Lancefield antigen of group A *Streptococcus* is a virulence determinant with implications for vaccine design. Cell Host Microbe. 2014;15(6):729-740. doi:10.1016/j.chom.2014.05.009.
17. Henningham A, Barnett TC, Maamary PG, Walker MJ. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Discov Med. 2012;13(72):329-342.
18. Oehmcke S, Shannon O, Mörgelin M, Herwald H. Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. Clin Chim Acta. 2010;411(17):1172-1180. doi:10.1016/j.cca.2010.04.032.
19. Suvilehto J, Jarva H, Seppänen M, Siljander T, Vuopio-Varkila J, Meri S. Binding of complement regulators factor H and C4b binding protein to

group A streptococcal strains isolated from tonsillar tissue and blood. Microbes Infect. 2008;10(7):757-763. doi:10.1016/j.micinf.2008.04.004.

20. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A *Streptococcus*. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):264-301. doi:10.1128/CMR.00101-13.
21. Barnett T, Indraratna A, Sanderson-Smith M. Secreted virulence factors of *Streptococcus pyogenes*. Published online 2022. http://europepmc.org/books/NBK587095.
22. Utari MHS, Bintari YR, Risandiansyah R. Kombinasi *Momordica charantia* dengan klindamisin atau amoksisilin pada pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. J Kedokt Komunitas. 2021;10(1):1-10.
23. Armillei MK, Lomakin IB, Del Rosso JQ, Grada A, Bunick CG. Scientific rationale and clinical basis for clindamycin use in the treatment of dermatologic disease. Antibiotics. 2024;13(3). doi:10.3390/antibiotics13030270.
24. Burhan AH, Bintoro DW, Mardiyaningsih A, Nurhaeni F. Studi literatur: Aktivitas antibakteri minyak atsiri daun dan batang tanaman terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Action Res Lit. 2022;6(2):118-133. doi:10.46799/arl.v6i2.126.
25. Nurhayati LS, Yahdiyani N, Hidayatulloh A. Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. J Teknol Has Peternak. 2020;1(2):41. doi:10.24198/jthp.v1i2.27537.
26. Monagas M, Brendler T, Brinckmann J, et al. Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. Front Pharmacol. 2022;13:981978. doi:10.3389/fphar.2022.981978.
27. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.

28. Sonphakdi T, Tani A, Payaka A, Ungcharoenwiwat P. Antibacterial and toxicity studies of phytochemicals from *Piper betle* leaf extract. J King Saud Univ Sci. 2024;36(10):103430. doi:10.1016/j.jksus.2024.103430.
29. Ngamsurach P, Praipipat P. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* of extracted *Piper betle* leaf materials by disc diffusion assay and batch experiments. RSC Adv. 2022;12(40):26435-26454. doi:10.1039/d2ra04611c.
30. Amanda S, Kurniati IM. Uji aktivitas antibakteri rebusan daun sirih terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Meditory J Med Lab. 2019;7(6):37-43.
31. Surjowardojo P, Susilorini TE, Sirait GRB. Antibacterial effects of green betel (*Piper betle* Linn.) leaf against *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. AGRIVITA J Agric Sci. 2019;41(3):569-574.
32. Bubonja-Šonje M, Giacometti J, Abram M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols: Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. Plants. 2020;9(2):216. doi:10.3390/plants9020216.
33. Flanagan JN, Steck TR. The relationship between agar thickness and antimicrobial susceptibility testing. Indian J Microbiol. 2017;57(4):503-506. doi:10.1007/s12088-017-0683-z.
34. Sawai J, Hasegawa M, Horikawa M, others. Growth phase-dependent effect of clindamycin on production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(2):461-467. doi:10.1128/AAC.00539-06.
35. Johnson AF, LaRock CN. Antibiotic treatment, mechanisms for failure, and adjunctive therapies for infections by group A *Streptococcus*. Front Microbiol. 2021;12:760255. doi:10.3389/fmicb.2021.760255.
36. Nahm FS. Nonparametric statistical tests for the continuous data: The basic concept and the practical use. Korean J Anesthesiol. 2016;69(1):8-14. doi:10.4097/kjae.2016.69.1.8.

37. Faber J, Fonseca LM. How sample size influences research outcomes. Dental Press J Orthod. 2014;19(4):27-29. doi:10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo.
38. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
39. Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. BMC Complement Altern Med. 2019;19:106. doi:10.1186/s12906-019-2519-3.
40. Monagas M, Brendler T, Brinckmann J, et al. Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. Front Pharmacol. 2022;13:981978. doi:10.3389/fphar.2022.981978.
41. Anand U, Nandy S, Mundhra A, Das N, Pandey DK, Dey A. Plant antibacterials: The challenges and opportunities. Heliyon. 2024;10. PMID:38803958.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Skrining Fitokimia

**LABORATORIUM BIOLOGI**
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**
Jl. Willem Iskandar Pasar V Medan Estate Kotak Pos 1589 Medan 20221
Telp. (061) 6625970, 6618754, 6613319

**SURAT KETERANGAN**
NO: 0030/UN33.4.6.3/LF/2025

Yth.
Saudara/i Moh Kurniawan

Bersama ini kami sampaikan hasil skrining fitokimia dari Ekstrak Daun Sirih yang saudara/i kirimkan ke Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan UNIMED, dengan No Surat: **0030/UN33.4.6.3/LF/2025 adalah sebagai berikut:**

| NAMA SAMPEL | NO | SENYAWA METABOLIT SEKUNDER | PEREAKSI | HASIL SKRINING |
|---|---|---|---|---|
| Ekstrak Daun Sirih | 1 | FLAVONOID | $FeCl_{3(aq)}$ 5% | + |
| | | | $Mg_{(s)} + HCL_{(l)}$ | + |
| | 2 | ALKALOID | Dragendorff | - |
| | | | Mayer | - |
| | 3 | TANIN | $FeCl_{3(aq)}$ 1% | + |
| | 4 | SAPONIN | Aquadest | + |
| | | | $HCL_{(l)}$ | + |

Keterangan:
+ : Mengandung Senyawa Metabolit Sekunder
- : Tidak mengandung Senyawa Metabolit Sekunder
Demikianlah surat ini dibuat untuk digunakan seperlunya

Medan, 09 Juli 2025
Kepala Laboratorium

Hendro Pranoto, S.Pd., M.Si
NIP:197703052001121002

## Case Processing Summary

| | | Cases | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | kelompok | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Daya_hambat | 25% | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |
| | 50% | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |
| | 75% | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |
| | 100% | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |
| | K (+) | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |
| | K (-) | 4 | 100,0% | 0 | 0,0% | 4 | 100,0% |

| | kelompok | | | Statistic | Std. Error |
|---|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | Mean | | 10,2750 | 1,04672 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 6,9439 | |
| | | | Upper Bound | 13,6061 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 10,1722 | |
| | | Median | | 9,3500 | |
| | | Variance | | 4,383 | |
| | | Std. Deviation | | 2,09344 | |
| | | Minimum | | 9,00 | |
| | | Maximum | | 13,40 | |
| | | Range | | 4,40 | |
| | | Interquartile Range | | 3,38 | |
| | | Skewness | | 1,943 | 1,014 |
| | | Kurtosis | | 3,804 | 2,619 |
| | 50% | Mean | | 12,9500 | ,77728 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 10,4763 | |
| | | | Upper Bound | 15,4237 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 12,8944 | |
| | | Median | | 12,4500 | |
| | | Variance | | 2,417 | |
| | | Std. Deviation | | 1,55456 | |
| | | Minimum | | 11,70 | |
| | | Maximum | | 15,20 | |
| | | Range | | 3,50 | |
| | | Interquartile Range | | 2,75 | |
| | | Skewness | | 1,597 | 1,014 |
| | | Kurtosis | | 2,704 | 2,619 |
| | 75% | Mean | | 15,6000 | 1,20485 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 11,7656 | |
| | | | Upper Bound | 19,4344 | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 5% Trimmed Mean | | 15,4778 | |
| | | Median | | 14,5000 | |
| | | Variance | | 5,807 | |
| | | Std. Deviation | | 2,40970 | |
| | | Minimum | | 14,20 | |
| | | Maximum | | 19,20 | |
| | | Range | | 5,00 | |
| | | Interquartile Range | | 3,85 | |
| | | Skewness | | 1,953 | 1,014 |
| | | Kurtosis | | 3,832 | 2,619 |
| | 100% | Mean | | 16,2000 | 1,43875 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 11,6213 | |
| | | | Upper Bound | 20,7787 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 16,0556 | |
| | | Median | | 14,9000 | |
| | | Variance | | 8,280 | |
| | | Std. Deviation | | 2,87750 | |
| | | Minimum | | 14,50 | |
| | | Maximum | | 20,50 | |
| | | Range | | 6,00 | |
| | | Interquartile Range | | 4,60 | |
| | | Skewness | | 1,956 | 1,014 |
| | | Kurtosis | | 3,846 | 2,619 |
| | K (+) | Mean | | 22,0000 | ,92736 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 19,0487 | |
| | | | Upper Bound | 24,9513 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 22,0556 | |
| | | Median | | 22,5000 | |
| | | Variance | | 3,440 | |
| | | Std. Deviation | | 1,85472 | |
| | | Minimum | | 19,40 | |
| | | Maximum | | 23,60 | |
| | | Range | | 4,20 | |
| | | Interquartile Range | | 3,40 | |
| | | Skewness | | -1,304 | 1,014 |
| | | Kurtosis | | 1,500 | 2,619 |
| | K (-) | Mean | | ,0000 | ,00000 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | ,0000 | |
| | | | Upper Bound | ,0000 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | ,0000 | |
| | | Median | | ,0000 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Variance | ,000 | |
| | Std. Deviation | ,00000 | |
| | Minimum | ,00 | |
| | Maximum | ,00 | |
| | Range | ,00 | |
| | Interquartile Range | ,00 | |
| | Skewness | . | . |
| | Kurtosis | . | . |

**Tests of Normality**

| | | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | kelompok | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Daya_hambat | 25% | ,394 | 4 | . | ,719 | 4 | ,019 |
| | 50% | ,314 | 4 | . | ,854 | 4 | ,240 |
| | 75% | ,396 | 4 | . | ,704 | 4 | ,013 |
| | 100% | ,399 | 4 | . | ,707 | 4 | ,014 |
| | K (+) | ,250 | 4 | . | ,903 | 4 | ,447 |
| | K (-) | . | 4 | . | . | 4 | . |

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variance**

| | | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | Based on Mean | 1,992 | 5 | 18 | ,129 |
| | Based on Median | ,403 | 5 | 18 | ,840 |
| | Based on Median and with adjusted df | ,403 | 5 | 11,258 | ,837 |
| | Based on trimmed mean | 1,603 | 5 | 18 | ,210 |

## Kruskal-Wallis Test

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank |
|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 7,25 |
| | 50% | 4 | 11,25 |
| | 75% | 4 | 14,88 |
| | 100% | 4 | 16,88 |
| | K (+) | 4 | 22,25 |
| | K (-) | 4 | 2,50 |

| | | |
|---|---|---|
| Total | 24 | |

**Test Statistics[a,b]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Kruskal-Wallis H | 20,013 |
| df | 5 |
| Asymp. Sig. | ,001 |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 3,25 | 13,00 |
| | 50% | 4 | 5,75 | 23,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 3,000 |
| Wilcoxon W | 13,000 |
| Z | -1,443 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,149 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,200[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | 75% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |

| | |
|---|---|
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,309 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,021 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | 100% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,309 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,021 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | K (+) | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,309 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,021 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 25% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | K (-) | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,460 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,014 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 50% | 4 | 3,25 | 13,00 |
| | 75% | 4 | 5,75 | 23,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 3,000 |
| Wilcoxon W | 13,000 |
| Z | -1,443 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,149 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,200[b] |

## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 50% | 4 | 3,25 | 13,00 |
| | 100% | 4 | 5,75 | 23,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 3,000 |
| Wilcoxon W | 13,000 |
| Z | -1,443 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,149 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,200[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 50% | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | K (+) | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,309 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,021 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 50% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | K (-) | 4 | 2,50 | 10,00 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,460 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,014 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 75% | 4 | 3,63 | 14,50 |
| | 100% | 4 | 5,38 | 21,50 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 4,500 |
| Wilcoxon W | 14,500 |
| Z | -1,016 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,309 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,343[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 75% | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | K (+) | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,309 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,021 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 75% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | K (-) | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,460 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,014 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 100% | 4 | 2,75 | 11,00 |
| | K (+) | 4 | 6,25 | 25,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 1,000 |
| Wilcoxon W | 11,000 |
| Z | -2,021 |

| | |
|---|---|
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,043 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,057[b] |

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | 100% | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | K (-) | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,460 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,014 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

**Mann-Whitney Test**

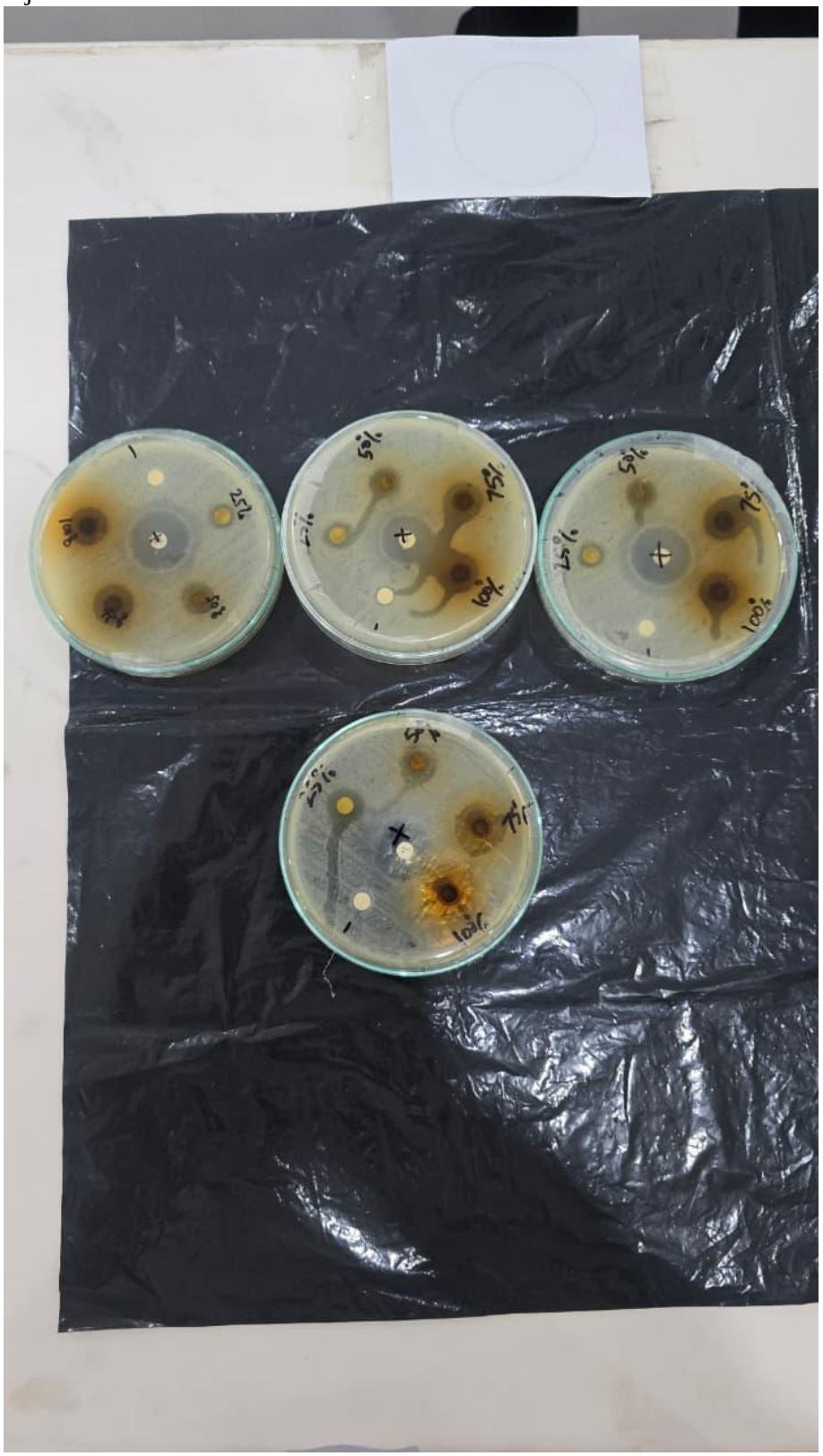
**Ranks**

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Daya_hambat | K (+) | 4 | 6,50 | 26,00 |
| | K (-) | 4 | 2,50 | 10,00 |
| | Total | 8 | | |

**Test Statistics[a]**

| | Daya_hambat |
|---|---|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 10,000 |
| Z | -2,460 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,014 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,029[b] |

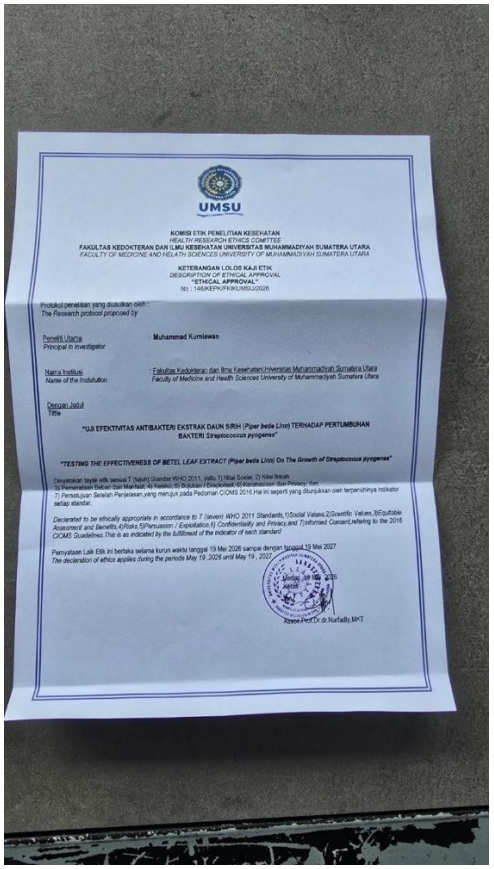
Uji sensitivitas



Ekstrak



## Surat Etik Penelitian



UMSU

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
*HEALTH RESEARCH ETHICS COMITTEE*
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
*FACULTY OF MEDICINE AND HELATH SCIENCES UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA*

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
*DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL*
"ETHICAL APPROVAL"
No : 148/KEPK/FKIKUMSU/2026

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
*The Research protocol proposed by*

Peneliti Utama
*Principal In investigator* : **Muhammad Kumiawan**

Nama Institusi
*Name of the Institution* : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan/Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
*Faculty of Medicine and Health Sciences University of Muhammadiyah Sumatera Utara*

Dengan Judul
*Title*

**"UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN SIRIH (*Piper betle Linn*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Streptococcus pyogenes*"**

**"*TESTING THE EFFECTIVENESS OF BETEL LEAF EXTRACT (Piper betle Linn) On The Growth of Streptococcus pyogenes*"**

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privasi, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016.Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

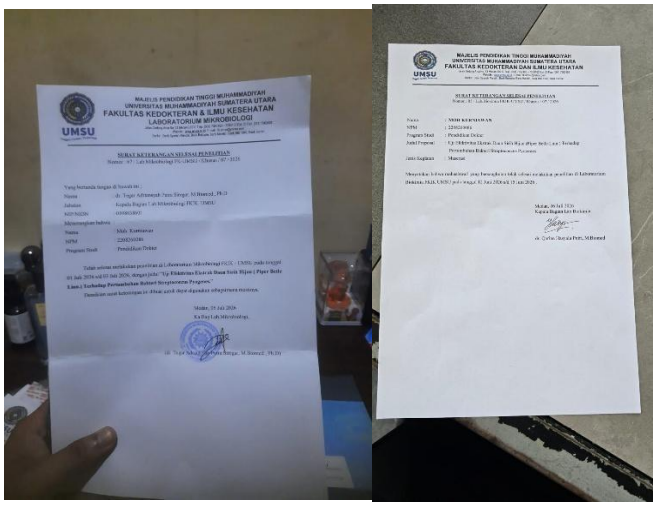
*Declaratred to be ethically appropriate in accordance th 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1)Social Values,2)Scientific Values,3)Equitable Assesment and Benefits,4)Risks,5)Persuasion / Exploitation,6) Confidentiality and Privacy,and 7)Informed Consent,referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard*

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 19 Mei 2026 sampai dengan tanggal 19 Mei 2027
*The declaration of ethics applies during the periods May 19 ,2026 until May 19 , 2027*

Medan, 19 Mei 2026
Ketua,

Assoc.Prof.Dr. dr.Nurfadly,MKT

## Surat Selesai Penelitian



UMSU

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI MUHAMMADIYAH
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN & ILMU KESEHATAN
LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI MUHAMMADIYAH
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN

SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN

# Uji Efektivitas Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus pyogenes

**Moh Kurniawan[1]**

**Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara[1]**

Corresponding author: Mohkurnia3@gmail.com

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai infeksi pada manusia. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki kandungan metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, dan saponin yang berpotensi memberikan aktivitas antibakteri. **Tujuan:** Untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. **Hasil:** Penelitian eksperimental laboratorium dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan empat konsentrasi ekstrak, klindamisin sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol negatif, dengan empat kali pengulangan pada setiap kelompok. Hasil penelitian menunjukkan rerata zona hambat sebesar 10,28 mm pada konsentrasi 25%, 12,95 mm pada konsentrasi 50%, 15,60 mm pada konsentrasi 75%, dan 16,20 mm pada konsentrasi 100%. Klindamisin menghasilkan rerata zona hambat sebesar 22,00 mm, sedangkan akuades tidak menghasilkan zona hambat. Uji Kruskal–Wallis menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok dengan nilai p=0,001. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*. Peningkatan konsentrasi ekstrak cenderung meningkatkan daya hambat, dengan konsentrasi 100% menghasilkan zona hambat terbesar secara numerik. Namun, daya hambat ekstrak masih lebih rendah dibandingkan klindamisin dan belum dapat menggantikan antibiotik standar.

**Kata kunci:** anti bakteri, ekstrak daun sirih hijau, *Piper betle* L., *Streptococcus pyogenes*, zona hambat.

# Effectiveness Test of Green Betel Leaf Extract (*Piper betle* L.) Against the Growth of *Streptococcus pyogenes*

**Moh Kurniawan[1]**

**Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara[1]**

Corresponding author: Mohkurnia3@gmail.com

## ABSTRACT

**Introduction:** *Streptococcus pyogenes* is a pathogenic bacterium that can cause various infections in humans. Green betel leaf (*Piper betle* L.) contains secondary metabolites such as flavonoids, tannins, and saponins that have potential antibacterial activity. **Objective:** To determine the inhibitory effect of green betel leaf ethanol extract (*Piper betle* L.) on the growth of *Streptococcus pyogenes* at concentrations of 25%, 50%, 75%, and 100%. **Results:** This laboratory experimental study used the disk diffusion method with four extract concentrations, clindamycin as the positive control, and distilled water as the negative control, with four replications for each group. The results showed mean inhibition zone diameters of 10.28 mm at 25%, 12.95 mm at 50%, 15.60 mm at 75%, and 16.20 mm at 100%. Clindamycin produced a mean inhibition zone of 22.00 mm, while distilled water produced no inhibition zone. The Kruskal–Wallis test showed a statistically significant difference among the groups (p=0.001). **Conclusion:** Green betel leaf ethanol extract (*Piper betle* L.) has antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes*. Increasing extract concentrations tended to increase the inhibitory effect, with the 100% concentration producing the largest inhibition zone numerically. However, the inhibitory effect of the extract was still lower than that of clindamycin and cannot yet replace standard antibiotics.

**Keywords:** *antibacterial activity, green betel leaf extract*, *Piper betle* L., *Streptococcus pyogenes*, antibacterial activity, inhibition zone.

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri masih menjadi salah satu masalah kesehatan yang berkontribusi terhadap morbiditas dan mortalitas secara global. Salah satu bakteri patogen yang memiliki dampak klinis penting adalah Streptococcus pyogenes, yaitu bakteri Gram-positif yang termasuk dalam kelompok Group A Streptococcus (GAS). Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai manifestasi klinis, mulai dari infeksi noninvasif seperti faringitis, impetigo, dan demam skarlatina hingga infeksi invasif berat seperti *necrotizing fasciitis* dan *streptococcal toxic shock syndrome*.[1] Diperkirakan terdapat lebih dari 18 juta kasus infeksi invasif yang berkaitan dengan bakteri ini setiap tahun dengan jumlah kematian secara global mencapai sekitar 500.000 kematian setiap tahun.[2] Pada anak usia 5–15 tahun, S. pyogenes juga merupakan penyebab penting faringitis akut.[1,2]

Penatalaksanaan infeksi S. pyogenes pada umumnya menggunakan antibiotik, dengan penisilin dan amoksisilin sebagai terapi pilihan utama untuk faringitis GAS.[3] Klindamisin dan makrolida dapat digunakan pada kondisi tertentu, terutama pada pasien dengan alergi terhadap penisilin.[3] Namun, resistensi terhadap makrolida dan klindamisin telah dilaporkan dan menunjukkan variasi berdasarkan wilayah serta waktu.[3,4] Kondisi tersebut menunjukkan pentingnya penggunaan antibiotik secara rasional sekaligus mendorong eksplorasi sumber antibakteri alternatif, termasuk bahan alam yang berpotensi dikembangkan sebagai agen antimikroba.

Salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber antibakteri alami adalah daun sirih hijau (Piper betle L.). Tanaman ini telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional di berbagai wilayah Asia, termasuk Indonesia. Daun P. betle mengandung berbagai senyawa fitokimia, antara lain flavonoid, tanin, saponin, fenolik, terpenoid, serta komponen minyak atsiri seperti eugenol, kavikol, dan hidroksikavikol.[5,6] Berbagai senyawa tersebut diketahui memiliki potensi aktivitas antimikroba melalui mekanisme yang beragam, termasuk mengganggu integritas membran sel, meningkatkan permeabilitas membran, menghambat aktivitas enzim, serta memengaruhi proses metabolisme bakteri.[5,6]

Aktivitas antibakteri P. betle terhadap berbagai bakteri telah dilaporkan dalam sejumlah penelitian. Sujono et al. menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hijau dapat menghambat pertumbuhan S. pyogenes pada beberapa konsentrasi.[7] Selain itu, penelitian terhadap ekstrak P. betle menggunakan berbagai jenis pelarut juga menunjukkan adanya aktivitas terhadap S. pyogenes, dengan aktivitas yang dapat berbeda bergantung pada jenis pelarut dan metode pengujian yang digunakan.[5,8] Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan senyawa aktif serta karakteristik proses ekstraksi dapat memengaruhi aktivitas antibakteri yang dihasilkan.

Meskipun demikian, hasil penelitian mengenai aktivitas antibakteri daun sirih terhadap S. pyogenes belum sepenuhnya seragam. Perbedaan jenis ekstrak, pelarut, konsentrasi, metode ekstraksi, serta metode pengujian dapat menghasilkan tingkat daya hambat yang berbeda. Skripsi ini juga mengidentifikasi adanya keterbatasan penelitian yang secara khusus mengevaluasi hubungan konsentrasi ekstrak daun sirih hijau dengan daya hambat terhadap S. pyogenes sekaligus membandingkannya dengan antibiotik standar. Selain itu, penelitian terdahulu mengenai P. betle menggunakan berbagai metode dan bahan uji sehingga hasilnya tidak dapat secara langsung disamakan dengan ekstrak etanol daun sirih hijau yang digunakan dalam penelitian ini.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian mengenai efektivitas ekstrak

daun sirih hijau (Piper betle L.) terhadap pertumbuhan Streptococcus pyogenes masih relevan untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daun sirih hijau pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% terhadap pertumbuhan S. pyogenes, serta membandingkan aktivitasnya dengan klindamisin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan desain post-test only control group. Penelitian dilakukan pada bulan Mei–Juli 2026 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Sampel penelitian berupa bakteri Streptococcus pyogenes yang diberikan perlakuan ekstrak daun sirih hijau (Piper betle L.) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Penelitian menggunakan 6 kelompok perlakuan, yaitu ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, klindamisin sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol negatif. Masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan, sehingga diperoleh total 24 unit pengamatan. Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer.

Daun sirih hijau sebanyak 1 kg dicuci, ditiriskan, dipotong, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kering. Daun yang telah kering dihaluskan dan diayak, kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% selama 3 × 24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan sesekali. Hasil maserasi disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram (Kirby-Bauer) pada media Mueller-Hinton Agar (MHA). Suspensi S. pyogenes disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 menggunakan NaCl 0,9%, kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan MHA. Cakram yang telah direndam dalam masing-masing konsentrasi ekstrak selama ±15 menit diletakkan pada media, bersama cakram klindamisin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Media kemudian diinkubasi pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam. Setelah inkubasi, diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

Data diuji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk dan homogenitas menggunakan Levene’s test. Karena data tidak seluruhnya berdistribusi normal, analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Nilai kemaknaan statistik ditetapkan pada $p < 0,05$.

## HASIL

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih hijau mengandung beberapa metabolit sekunder. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung flavonoid, tanin, dan saponin, sedangkan alkaloid tidak terdeteksi. Hasil pemeriksaan juga didukung oleh surat keterangan Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan Nomor 0030/UN33.4.6.3/LF/2025.

**Tabel 4. 1 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih**

| Nama Sample | No | Senyawa Metabolit Sekunder | Pereaksi | Hasil Skrining |
|---|---|---|---|---|
| Ekstrak Daun Sirih | 1 | Flavonoid | $FeCl_{3(aq)}$ 5% | + |
| | | | Mg(s)+HCL (p) | + |
| | 2 | Alkaloid | Dragendorff | - |
| | | | Mayer | - |
| | 3 | Tanin | $FeCl_{3(aq)}$ 1% | + |
| | 4 | Saponin | Aquadest | + |
| | | | $HCL_{(p)}$ | + |

**Tabel 4. 2 Perbedaan Zona Hambat**

| Pengulangan | Pengulangan 1 | Pengulangan 2 | Pengulangan 3 | Pengulang an 4 | Rata-Rata |
|---|---|---|---|---|---|
| Ekstrak Daun sirih 25% | 9,2 mm | 9,5 mm | 9 mm | 13,4 mm | 10,27mm |
| Ekstrak Daun sirih 50% | 12,7 mm | 12,2 mm | 11,7 mm | 15,2 mm | 12,95mm |
| Ekstrak Daun sirih 75% | 14,3 mm | 14,2 mm | 14,7 mm | 19,2 mm | 15,6 mm |
| Ekstrak Daun sirih 100% | 14,7 mm | 15,1 mm | 14,5 mm | 20,5 mm | 16,2 mm |
| Kontrol + | 22 mm | 19,4 mm | 23,6 mm | 23 mm | 22 mm |
| Kontrol - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan diameter zona hambat yang diperoleh melalui pemberian beberapa konsentrasi ekstrak daun sirih terhadap bakteri uji. Pada konsentrasi 25%, zona hambat terkecil terdapat pada pengulangan ke-3 dengan diameter 9 mm, sedangkan zona hambat terbesar diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan diameter 13,4 mm. Rerata zona hambat pada konsentrasi 25% adalah 10,27 mm. Pada konsentrasi 50%, zona hambat terendah terdapat pada pengulangan ke-3 dengan diameter 11,7 mm, sedangkan zona hambat terbesar diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan diameter 15,2 mm. Rerata zona hambat pada konsentrasi 50% adalah 12,95 mm. Pada konsentrasi 75%, zona hambat terendah terdapat pada pengulangan ke-2 dengan diameter 14,2 mm, sedangkan zona hambat terbesar diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan diameter 19,2 mm. Rerata zona hambat pada konsentrasi 75% adalah 15,6 mm. Pada konsentrasi 100%, zona hambat terendah terdapat pada pengulangan ke-3 dengan diameter 14,5 mm, sedangkan zona hambat terbesar diperoleh pada pengulangan ke-4 dengan diameter 20,5 mm. Rerata zona hambat pada konsentrasi 100% adalah 16,2 mm.

Pada kelompok kontrol positif yang menggunakan antibiotik klindamisin, zona hambat terkecil terdapat pada pengulangan ke-2 dengan diameter 19,4 mm, sedangkan zona hambat terbesar diperoleh pada pengulangan ke-3 dengan diameter 23,6 mm. Rerata zona hambat pada kelompok kontrol positif adalah 22 mm. Sementara itu, kelompok kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat sama sekali.

Berdasarkan kriteria Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), diameter zona hambat klindamisin sebesar 22,00 mm termasuk dalam kategori sensitif karena memenuhi kriteria ≥19 mm. Sementara itu, diameter zona hambat ekstrak daun sirih tidak dapat dikategorikan ke dalam kelompok sensitif, intermediet, atau resisten berdasarkan kriteria CLSI, karena breakpoint tersebut berlaku untuk antibiotik klindamisin dan bukan untuk ekstrak herbal.

**Tabel 4.3 Hasil analisis uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas**

| Kelompok | Uji Normalitas | Uji Homogenitas |
|---|---|---|
| 25% | 0,019 | 0,996 |
| 50% | 0,240 | |
| 75% | 0,013 | |
| 100% | 0,014 | |
| Kontrol(+) | 0,447 | |

Berdasarkan Tabel 4.3, hasil uji normalitas menggunakan Shapiro–Wilk menunjukkan bahwa kelompok ekstrak daun sirih konsentrasi 25% memperoleh nilai p=0,019 dan kelompok konsentrasi 75% memperoleh nilai p=0,013. Karena kedua nilai tersebut lebih kecil dari 0,05, data pada kelompok 25% dan 75% dinyatakan tidak berdistribusi normal. Sementara itu, kelompok konsentrasi 50% memperoleh nilai p=0,240, kelompok konsentrasi 100% memperoleh nilai p=0,447, dan kelompok kontrol positif memperoleh nilai p=0,447. Karena nilai p pada ketiga kelompok tersebut lebih besar dari 0,05, data dinyatakan berdistribusi normal.

Hasil uji homogenitas menunjukkan nilai p=0,996. Nilai tersebut lebih besar dari 0,05, sehingga varians data antarkelompok dinyatakan homogen. Meskipun data memiliki varians yang homogen, terdapat kelompok yang tidak berdistribusi normal, yaitu kelompok konsentrasi 25% dan 75%. Oleh karena itu, asumsi normalitas untuk melakukan uji parametrik One-Way ANOVA tidak terpenuhi. Analisis perbedaan daya hambat antarkelompok selanjutnya dilakukan menggunakan uji nonparametrik Kruskal–Wallis.

**Tabel 4. 4 Hasil uji Kruskall-Wallis**

| Kelompok | n | Rata-rata ±SD | P |
|---|---|---|---|
| 25% | 4 | 10,27 ± 2,09 | 0,001 |
| 50% | 4 | 12,95 ± 1,55 | |
| 75% | 4 | 15,6 ± 2,40 | |

| | | |
|---|---|---|
| 100% | 4 | 16,2 ± 2,87 |
| Kontrol (+) | 4 | 22 ± 1,85 |

Menunjukkan data tentang rata-rata daya hambat ekstrak daun sirih pada berbagai konsentrasi. Pada konsentrasi 25%, rata-rata daya hambat tercatat 10,27 mm dengan standar deviasi 2,09. Pada konsentrasi 50%, rata-rata daya hambat tercatat 12,95 mm dengan standar deviasi 1,55. Pada konsentrasi 75%, rata-rata daya hambat tercatat 15,6 mm dengan standar deviasi 2,40. Pada konsentrasi 100%, rata-rata daya hambat tercatat 16,2 mm dengan standar deviasi 2,87. Sedangkan pada kontrol positif menggunakan klindamisin menunjukkan rata-rata 22 mm dengan standar deviasi 1,85. Hasil uji Kruskall-Wallis memperoleh nilai p sebesar <0,001 (p<0,05), yang menyatakan adanya perbedaan signifikan diantara rerata daya hambat di setiap kelompok perlakuan, mengindikasikan bahwa konsentrasi ekstrak daun sirih berpengaruh pada daya hambat pertumbuhan bakteri streptococcus pyogenes. Untuk mengevaluasi perbedaan lebih lanjut antar kelompok, dilakukan uji Mann-Whitney.

**Tabel 4. 5 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 50%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,149 |
| 50% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,149 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 25% dan 50%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang tidak bermakna.

**Tabel 4. 6 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 75%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| 75% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 25% dan 75%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 7 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| 100% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 25% dan 100%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan

**Tabel 4. 8 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,021 |
| Klindamisin | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 25% dan kontrol positif klindamisin yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 9 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 25% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 25% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,014 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 25% dan kontrol negatif aquadest yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 10 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 75%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,149 |
| 75% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,149 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 50% dan 75%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang tidak bermakna.

**Tabel 4. 11 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan konsentrasi 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,149 |
| 100% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,149 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 50% dan 100%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang tidak bermakna.

**Tabel 4.12 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan klindamisi**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,021 |
| Klindamisin | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 50% dan kontrol positif klindamisin yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 13 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 50% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 50% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,014 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 50% dan kontrol negatif aquadest yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 14 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100%**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,309 |
| 100% | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,309 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 50% dan 100%, yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 15 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,021 |
| klindamisin | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,021 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 75% dan kontrol positif klindamisin yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 16 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 75% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 75% | 4 | 0,014 |
| aquadest | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,014 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 75% dan kontrol negatif aquadest yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 17 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan klindamisin**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 100% | 4 | 0,043 |
| klindamisin | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,043 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 100% dan kontrol positif klindamisin yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 18 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih konsentrasi 100% dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| 100% | 4 | 0,014 |
| Aquadest | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,014 (p<0,05) antara ekstrak daun sirih 100% dan kontrol negatif aquadest yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan.

**Tabel 4. 19 Uji Mann-Whitney antara ekstrak daun sirih klindamisin dengan aquadest**

| Kelompok | n | P |
|---|---|---|
| Klindamisin | 4 | 0,014 |
| Aquadest | 4 | |

Temuan uji Mann-Whitney Whitney menampilkan nilai p sebesar 0,014 (p<0,05) antara kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif aquadest yang mengindikasikan terdapat perbedaan daya hambat yang signifikan

**PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kemampuan ekstrak DMSO daun sirih hijau (Piper betle L.) dalam menghambat pertumbuhan Streptococcus pyogenes pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, serta membandingkan aktivitas tersebut dengan klindamisin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak mampu membentuk zona hambat, dengan rerata diameter masing-masing sebesar 10,28 mm, 12,95 mm, 15,60 mm, dan 16,20 mm. Klindamisin menghasilkan rerata zona hambat sebesar 22,00 mm, sedangkan akuades tidak memperlihatkan pembentukan zona hambat. Berdasarkan uji Kruskal–Wallis, diperoleh nilai p = 0,001, yang mengindikasikan adanya perbedaan daya hambat yang bermakna antarkelompok penelitian.

Kemaknaan yang diperoleh melalui uji Kruskal–Wallis dapat dikaitkan dengan adanya rentang diameter zona hambat yang

cukup mencolok antara kelompok ekstrak, kontrol positif, dan kontrol negatif. Kelompok akuades tidak memperlihatkan zona hambat, sedangkan seluruh konsentrasi ekstrak menghasilkan zona hambat dengan kisaran 10,28–16,20 mm dan klindamisin mencapai 22,00 mm. Sebaran nilai yang relatif lebar tersebut menyebabkan peringkat hasil pengamatan antarkelompok memiliki perbedaan yang nyata, sehingga uji Kruskal–Wallis mampu mengidentifikasi setidaknya satu kelompok dengan perbedaan bermakna. Kendati demikian, kemaknaan hasil tersebut tidak serta-merta menunjukkan bahwa setiap konsentrasi ekstrak memiliki perbedaan satu sama lain, sebab Kruskal–Wallis merupakan uji omnibus yang digunakan untuk menilai perbedaan secara keseluruhan.[6]

Terbentuknya zona hambat pada seluruh tingkatan konsentrasi mengisyaratkan adanya komponen bioaktif dalam daun sirih hijau yang berkemampuan menghambat pertumbuhan S. pyogenes. Daun sirih diketahui mengandung senyawa fenolik, hidroksikavikol, kavikol, kavibetol, eugenol, flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan terpenoid. Beragam komponen tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri melalui intervensi terhadap struktur dinding sel, membran sitoplasma, protein, enzim, serta lintasan metabolisme bakteri. Dengan demikian, zona hambat yang terbentuk diduga merupakan konsekuensi dari aktivitas kolektif sejumlah senyawa bioaktif, bukan semata-mata berasal dari satu komponen tertentu.[7,8]

Secara fisiologis, senyawa fenolik yang terdapat pada daun sirih dapat berinteraksi dengan komponen lipid maupun protein penyusun membran bakteri, sehingga memicu peningkatan permeabilitas membran dan menyebabkan keluarnya ion serta substansi intraseluler. Flavonoid berpotensi berikatan dengan protein pada dinding sel dan menginterupsi fungsi membran, sedangkan tanin dapat menginduksi presipitasi protein sekaligus menghambat aktivitas enzim. Saponin memiliki karakteristik menyerupai surfaktan yang memungkinkan senyawa tersebut mengusik kestabilan membran sel. Kerusakan pada struktur membran disertai terganggunya aktivitas enzim dapat melemahkan kemampuan bakteri dalam mempertahankan keseimbangan internal (homeostasis), sehingga pada akhirnya pertumbuhan bakteri mengalami penghambatan.[7,8]

Kenaikan rerata diameter zona hambat pada konsentrasi 25% hingga 100% memperlihatkan adanya kecenderungan pola konsentrasi–respons. Dengan volume larutan yang dipertahankan sama, konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi mengandung proporsi senyawa bioaktif yang lebih besar. Semakin tinggi kandungan senyawa aktif yang terdeposit pada cakram, semakin besar pula peluang komponen tersebut berdifusi ke dalam medium dan berinteraksi dengan sel bakteri. Penelitian Ngamsurach dan Praipipat melaporkan bahwa ekstrak daun sirih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif, serta tingkat penghambatannya berkaitan dengan konsentrasi dan karakteristik ekstrak yang digunakan.[8]

Hasil penelitian ini memiliki kesesuaian dengan temuan Amanda et al. yang meneliti aktivitas antibakteri rebusan daun sirih terhadap S. pyogenes. Penelitian tersebut memperoleh rerata zona hambat 0 mm pada konsentrasi 20%, 12,9 mm pada konsentrasi 40%, 22,7 mm pada konsentrasi 60%, 25,5 mm pada konsentrasi 80%, dan 30 mm pada konsentrasi 100%, serta melaporkan adanya perbedaan diameter zona hambat yang bermakna antarkonsentrasi. Keteraturan pola tersebut memperlihatkan bahwa peningkatan konsentrasi daun sirih cenderung disertai peningkatan kemampuan penghambatan terhadap S. pyogenes. Adanya perbedaan ukuran zona hambat antara penelitian tersebut dan penelitian ini dapat berkaitan dengan perbedaan teknik preparasi bahan

uji, kuantitas ekstrak yang diaplikasikan pada setiap cakram, jenis pelarut, komposisi media, ketebalan agar, karakteristik isolat bakteri, serta kondisi inkubasi.[9]

Penelitian Surjowardojo et al. pada Streptococcus agalactiae juga memperlihatkan pola peningkatan rerata zona hambat sejalan dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak air daun sirih muda. Diameter zona hambat meningkat dari 5,18 mm pada konsentrasi 10% menjadi 5,96 mm pada konsentrasi 20% dan 6,38 mm pada konsentrasi 30%. Walaupun menggunakan spesies bakteri yang berbeda, temuan tersebut turut memperkuat kecenderungan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih menyediakan lebih banyak komponen antibakteri, sehingga kemampuan penghambatannya cenderung mengalami peningkatan.[10]

Dalam penelitian ini, ekstrak berkonsentrasi 100% memperlihatkan rerata zona hambat paling besar di antara kelompok perlakuan ekstrak, yaitu sebesar 16,20 mm. Meskipun demikian, hasil uji Mann–Whitney menunjukkan bahwa kelompok konsentrasi 75% dan 100% tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna, dengan nilai $p = 0,309$. Keadaan tersebut dapat dikaitkan dengan perbedaan rerata yang relatif kecil, yakni hanya 0,60 mm, sementara variasi hasil pengukuran pada masing-masing kelompok cukup lebar. Diameter zona hambat pada konsentrasi 75% berada dalam rentang 14,2–19,2 mm, sedangkan konsentrasi 100% berada pada rentang 14,5–20,5 mm. Terdapatnya irisan rentang nilai yang cukup luas menyebabkan selisih rerata kedua kelompok belum cukup kuat untuk menunjukkan kemaknaan secara statistik, terutama karena jumlah pengulangan pada setiap kelompok hanya empat kali.[6]

Ketiadaan perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 75% dan 100% dapat pula ditinjau dari keterbatasan teknik difusi cakram. Besarnya zona hambat tidak semata-mata ditentukan oleh aktivitas antibakteri, tetapi turut bergantung pada kapasitas senyawa aktif untuk bermigrasi melalui medium agar. Ekstrak dengan konsentrasi yang lebih tinggi berpotensi mempunyai viskositas yang lebih besar serta mengandung komponen yang lebih kompleks. Keadaan tersebut menyebabkan penambahan kandungan senyawa aktif tidak senantiasa berbanding lurus dengan laju maupun jangkauan difusi. Oleh karena itu, walaupun konsentrasi 100% mengandung komponen ekstrak dalam jumlah lebih tinggi, diameter zona hambat yang dihasilkan tidak selalu mengalami peningkatan secara proporsional apabila dibandingkan dengan konsentrasi 75%.[6,11]

Penerapan teknik difusi cakram pada bahan ekstrak tumbuhan turut dipengaruhi oleh karakteristik fisikokimia senyawa, meliputi polaritas, kelarutan, bobot molekul, serta interaksinya dengan medium. Senyawa aktif yang memiliki bobot molekul besar ataupun tingkat kelarutan rendah dapat tetap memperlihatkan aktivitas antibakteri, tetapi menghasilkan zona hambat yang relatif terbatas karena mobilitasnya di dalam medium agar tidak optimal. Sebaliknya, senyawa yang mempunyai kemampuan difusi lebih tinggi dapat membentuk zona hambat dengan diameter yang lebih luas. Dengan demikian, diameter zona hambat sebaiknya dimaknai sebagai manifestasi perpaduan antara aktivitas antibakteri dan kapasitas difusi senyawa, bukan sebagai representasi mutlak dari potensi antibakteri suatu bahan.[6,11]

Tidak ditemukannya perbedaan yang bermakna pada perbandingan konsentrasi 25% dengan 50%, 50% dengan 75%, serta 50% dengan 100% diduga berkaitan dengan terbatasnya jumlah pengulangan dalam setiap kelompok. Dengan hanya empat kali pengulangan, satu hasil pengukuran yang menyimpang lebih tinggi maupun lebih rendah dapat memberikan pengaruh cukup besar terhadap rerata dan simpangan baku. Pada penelitian ini, pengulangan keempat memperlihatkan diameter zona hambat

yang cenderung lebih besar pada seluruh kelompok ekstrak dibandingkan sebagian besar hasil pada pengulangan pertama hingga ketiga. Keragaman tersebut memperlebar sebaran data dan berpotensi mengurangi sensitivitas analisis statistik dalam mengenali perbedaan antarkonsentrasi yang relatif kecil.[6]

Ketidakseragaman pada pengulangan keempat dimungkinkan pula berkaitan dengan aspek teknis selama pelaksanaan pemeriksaan. Diameter zona hambat dapat dipengaruhi oleh ketebalan agar, kepadatan inokulum, pemerataan suspensi bakteri, volume larutan yang terserap pada cakram, jarak antarcakram, durasi perendaman, suhu, serta lama inkubasi. Agar dengan ketebalan lebih tipis memungkinkan zat antimikroba berpenetrasi dan menyebar lebih mudah, sehingga zona hambat dapat menjadi lebih luas, sedangkan lapisan agar yang lebih tebal cenderung membatasi penyebaran senyawa. Oleh sebab itu, penyeragaman ketebalan Mueller–Hinton agar, kekeruhan suspensi setara McFarland 0,5, volume ekstrak pada setiap cakram, serta kondisi inkubasi diperlukan untuk meminimalkan keragaman hasil antarpengulangan.[6,12]

Perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 25% dengan konsentrasi 75% dan 100%, yang masing-masing memiliki nilai p = 0,021, dapat dikaitkan dengan rentang perbedaan daya hambat yang lebih nyata. Rerata zona hambat pada konsentrasi 25% hanya mencapai 10,28 mm, sedangkan konsentrasi 75% dan 100% masing-masing mencapai 15,60 mm dan 16,20 mm. Kesenjangan konsentrasi yang lebih besar memungkinkan jumlah komponen aktif yang tersedia juga meningkat, sehingga menghasilkan pemisahan nilai zona hambat yang lebih jelas dibandingkan kelompok dengan konsentrasi berdekatan. Temuan ini selaras dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih dapat memperbesar diameter zona hambat, meskipun kenaikannya tidak selalu membentuk pola linear.[8,10]

Klindamisin menghasilkan diameter zona hambat terbesar, yakni 22,00 mm, sehingga secara deskriptif melampaui seluruh kelompok ekstrak. Daya hambat klindamisin yang lebih besar dapat dikaitkan dengan kandungan zat aktif, dosis cakram, tingkat kemurnian, kestabilan, serta karakteristik difusinya yang telah terstandar. Klindamisin bekerja dengan berikatan pada subunit ribosom 50S sehingga proses sintesis protein bakteri mengalami hambatan. Pada S. pyogenes, penghambatan tersebut turut berpotensi menekan pembentukan toksin dan sejumlah faktor virulensi, sehingga aktivitas klindamisin tidak hanya berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan bakteri, tetapi juga dengan penekanan ekspresi komponen yang menunjang patogenesis.[13,14]

Sebaliknya, konsentrasi ekstrak 100% tidak dapat dimaknai sebagai kandungan senyawa antibakteri dalam keadaan murni. Ekstrak daun sirih masih berupa campuran berbagai komponen tanaman, yang meliputi senyawa aktif, komponen yang tidak memiliki aktivitas antibakteri, pigmen, serta substansi lain dengan kemampuan difusi yang beragam. Kadar hidroksikavikol, eugenol, flavonoid, maupun komponen aktif lainnya juga belum dilakukan kuantifikasi dalam penelitian ini. Dengan demikian, tingginya konsentrasi ekstrak tidak serta-merta mencerminkan tingginya kadar senyawa antibakteri secara spesifik. Walaupun ekstrak 100% merupakan konsentrasi paling pekat, aktivitas penghambatannya tetap berada di bawah klindamisin sebagai antibiotik yang telah terstandar.[7,8]

Akuades sebagai kontrol negatif tidak memperlihatkan pembentukan zona hambat pada seluruh pengulangan. Temuan tersebut mendukung dugaan bahwa aktivitas penghambatan pada kelompok perlakuan berasal dari komponen ekstrak daun sirih, bukan dari akuades. Meskipun demikian, pemilihan kontrol negatif perlu disesuaikan dengan pelarut yang digunakan dalam pembuatan sediaan ekstrak. Apabila ekstrak dilarutkan menggunakan DMSO,

etanol, atau kombinasi pelarut tertentu, maka pelarut yang sama pada konsentrasi setara semestinya digunakan sebagai kontrol negatif. Penggunaan kontrol pelarut yang tepat diperlukan untuk memastikan bahwa zona hambat yang terbentuk tidak berasal dari efek antimikroba pelarut.[11]

Akuades sebagai kontrol negatif tidak memperlihatkan pembentukan zona hambat pada seluruh pengulangan. Temuan tersebut mendukung dugaan bahwa aktivitas penghambatan pada kelompok perlakuan berasal dari komponen ekstrak daun sirih, bukan dari akuades. Meskipun demikian, pemilihan kontrol negatif perlu disesuaikan dengan pelarut yang digunakan dalam pembuatan sediaan ekstrak. Apabila ekstrak dilarutkan menggunakan DMSO, etanol, atau kombinasi pelarut tertentu, maka pelarut yang sama pada konsentrasi setara semestinya digunakan sebagai kontrol negatif. Penggunaan kontrol pelarut yang tepat diperlukan untuk memastikan bahwa zona hambat yang terbentuk tidak berasal dari efek antimikroba pelarut.[15]

Tidak adanya perbedaan bermakna pada sejumlah pasangan konsentrasi dapat berkaitan dengan selisih diameter yang relatif sempit, irisan nilai antarkelompok, keragaman hasil pengulangan, serta jumlah pengulangan yang terbatas, yang secara bersama-sama dapat mengurangi kemampuan analisis dalam menangkap perbedaan kecil.[16] Selain itu, pada metode difusi cakram, ukuran zona hambat tidak hanya ditentukan oleh aktivitas antibakteri bahan uji, tetapi juga oleh karakteristik difusi senyawa aktif di dalam medium dan kondisi teknis selama pemeriksaan.[17]

Dalam penelitian ini, konsentrasi 100% memberikan diameter zona hambat terbesar secara deskriptif di antara kelompok ekstrak, tetapi tidak memperlihatkan perbedaan bermakna secara statistik dibandingkan konsentrasi 75%. Dengan demikian, konsentrasi 100% belum dapat dinyatakan mempunyai daya hambat yang secara statistik lebih tinggi daripada konsentrasi 75%, meskipun secara deskriptif nilai diameternya lebih besar.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sirih hijau (Piper betle L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan Streptococcus pyogenes pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Rerata diameter zona hambat masing-masing sebesar 10,28 mm, 12,95 mm, 15,60 mm, dan 16,20 mm. Uji Kruskal–Wallis menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok dengan nilai p=0,001. Konsentrasi 100% menghasilkan zona hambat terbesar secara numerik, tetapi tidak berbeda bermakna dibandingkan konsentrasi 75%. Meskipun demikian, daya hambat ekstrak masih lebih rendah dibandingkan klindamisin yang menghasilkan rerata zona hambat 22,00 mm, sehingga ekstrak daun sirih hijau belum dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik standar.

## SARAN

Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan jumlah pengulangan yang lebih banyak untuk meningkatkan kekuatan analisis statistik, khususnya dalam mengevaluasi perbedaan daya hambat antara konsentrasi 75% dan 100%.[16] Selain itu, penelitian dapat menggunakan metode dilusi atau mikrodilusi untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM), serta melakukan standardisasi bahan tanaman, proses ekstraksi, kadar senyawa aktif, dan kondisi pengujian laboratorium.[18] Penggunaan kontrol negatif yang sesuai dengan pelarut ekstrak juga perlu diperhatikan.[19] Penelitian lanjutan dapat diarahkan pada pengembangan sediaan ekstrak yang lebih terstandar dan dilanjutkan dengan uji toksisitas, in vivo, serta uji klinis sebelum dipertimbangkan untuk penggunaan sebagai agen antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Jespersen MG, Lacey JA, Tong SYC, Davies MR. Global genomic epidemiology of *Streptococcus*

*pyogenes*. *Infect Genet Evol.* 2020;86:104609. doi:10.1016/j.meegid.2020.104609.
2 Avire NJ, Whiley H, Ross K. A review of *Streptococcus pyogenes*: public health risk factors, prevention and control. *Pathogens.* 2021;10(2):248. doi:10.3390/pathogens10020248.
3 Adamkova V, Adamkova VG, Kroneislova G, et al. Increasing rate of fatal *Streptococcus pyogenes* bacteriemia—a challenge for prompt diagnosis and appropriate therapy in real praxis. *Microorganisms.* 2024;12(5):995. doi:10.3390/microorganisms12050995.
4 Sadiah HH, Cahyadi AI, Windria S. Kajian potensi daun sirih hijau (*Piper betle* L) sebagai antibakteri: a review of green betel leaf (*Piper betle* L) potency as antibacterial. *J Sain Vet.* 2022;40(2):128-138. doi:10.22146/jsv.58745.
5 Putri NLPT, Paramita NLPV. Review aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) metode difusi dan mikrodilusi. *J Sci Mandalika.* 2023;4(2):6-18. doi:10.36312/10.36312/vol4iss2pp6-18.
6 Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal.* 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
7 Sonphakdi T, Tani A, Payaka A, Ungcharoenwiwat P. Antibacterial and toxicity studies of phytochemicals from *Piper betle* leaf extract. *J King Saud Univ Sci.* 2024;36(10):103430. doi:10.1016/j.jksus.2024.103430.
8 Ngamsurach P, Praipipat P. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* of extracted *Piper betle* leaf materials by disc diffusion assay and batch experiments. *RSC Adv.* 2022;12(40):26435-26454. doi:10.1039/D2RA04611C.
9 Amanda S, Kurniati IM. Uji aktivitas antibakteri rebusan daun sirih terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. *Meditory J Med Lab.* 2019;7(6):37-43.
10 Surjowardojo P, Susilorini TE, Sirait GRB. Antibacterial effects of green betel (*Piper betle* Linn.) leaf against *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. *AGRIVITA J Agric Sci.* 2019;41(3):569-574.
11 Bubonja-Šonje M, Giacometti J, Abram M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols: challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Plants.* 2020;9(2):216. doi:10.3390/plants9020216.
12 Flanagan JN, Steck TR. The relationship between agar thickness and antimicrobial susceptibility testing. *Indian J Microbiol.* 2017;57(4):503-506. doi:10.1007/s12088-017-0683-z.
13 Sawai J, Hasegawa M, Horikawa M, et al. Growth phase-dependent effect of clindamycin on production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):461-467. doi:10.1128/AAC.00539-06.
14 Johnson AF, LaRock CN. Antibiotic treatment, mechanisms for failure, and adjunctive therapies for infections by group A *Streptococcus*. *Front Microbiol.* 2021;12:760255. doi:10.3389/fmicb.2021.760255.
15 Nahm FS. Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean J Anesthesiol.* 2016;69(1):8-14. doi:10.4097/kjae.2016.69.1.8.
16 Faber J, Fonseca LM. How sample size influences research outcomes. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(4):27-29. doi:10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo.
17 Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J*

*Pharm Anal.* 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.

18 Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complement AlternMed.* 2019;19:106. doi:10.1186/s12906-019-2519-3.

19 Monagas M, Brendler T, Brinckmann J, et al. Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. *Front Pharmacol.* 2022;13:981978. doi:10.3389/fphar.2022.981978.