

**EFEKTIVITAS ANTIFUNGI EKSTRAK ETANOL DAN MINYAK ATSIRI
DAUN SIRIH (*Piper betle*) TERHADAP *Trichophyton verrucosum* SECARA *IN VITRO*
*The In Vitro Study of Antifungal Effect of Ethanol Extract and Essential Oil of Sirih Leaf (Piper
betle) Against Trichophyton verrucosum***

Djaenudin Gholib

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jalan RE Martadinata No. 30 Bogor 16114
zaemiko@gmail.com

(diterima 08 Agustus 2014, direvisi 23 Oktober 2014, disetujui 28 November 2014)

ABSTRAK

Daun sirih (*Piper betle* L.) diketahui mempunyai efek antifungi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek daun sirih sebagai antifungi secara *in vitro*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (BB Litvet) tahun 2012. Bahan penelitian adalah ekstrak etanol dan minyak atsiri. Fungi (cendawan) yang digunakan dalam pengujian ini adalah *Trichophyton verrucosum*, yaitu cendawan jenis kapang, penyebab penyakit kurap pada kulit (dermatofitosis) hewan dan manusia. Media yang digunakan, *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Hasil penelitian ditentukan dengan perolehan nilai konsentrasi hambat minimal (KHM). Bahan uji diencerkan dengan pengenceran ganda 6,250; 3,125; 1,56; 0,78; dan 0,39% untuk ekstrak etanol, dan 12,50; 6,250; 3,125; 1,56; 0,78; dan 0,39% untuk minyak atsiri. Koloni cendawan yang diuji ditumbuhkan pada media SDA dalam cawan petri selama 7 hari, masing-masing disuspensikan dengan aquades steril. Suspensi terdiri dari hifa dan sel spora. Kedua bahan yang diuji dituangkan ke dalam cawan petri steril dengan perbandingan 1:1, masing-masing 1 ml. Suspensi cendawan tanpa ekstrak atau minyak atsiri dituangkan ke dalam cawan petri sebagai kontrol negatif (0%). Media SDA yang masih cair dituangkan sebanyak 20 ml ke masing-masing petri. Inkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Pengujian dilakukan dua kali ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak etanol adalah 1,56%, dan minyak atsiri 12,5%. Ekstrak etanol mempunyai efek antifungi yang lebih kuat dibandingkan dengan minyak atsiri.

Kata kunci: *Piper betle*, minyak atsiri, ekstrak etanol, *Trichophyton verrucosum*, KHM

ABSTRACT

Piper betle leaf is known as anti-fungi. This research was aimed to examine the effect of *P. betle* leaf as anti-fungi, using in vitro dilution methods, conducted at Mycology Laboratory, Research Institute of Veterinary Sciences (RIVS) in 2012. The material used were ethanol extract and essential oil of *P. betle* leaf. Fungi tested was *Trichophyton verrucosum* cause of skin disease (dermatophytosis) on human and animals. The media used in the research was Sabouraud Dextrose Agar (SDA). The effectiveness of the solution was determined based on Minimal Inhibition Concentration (MIC). The extract and essential oil were diluted using ethanol extract (6.25; 3.125; 1.56; 0.78; 0.39%) and essential oil (12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.78 and 0.39%). The colony of tested fungi was grown on SDA media for 7 days and was diluted with distilled water. The suspension consisted of hyphae and spore cells. Both tested suspensions were poured and mixed in sterile petri dishes in 1:1 proportion, 1 ml for each treatment. Suspension without extract or essential oil was used as negative control (0%). A 20 ml of suspension was poured into petri dishes, and incubated for 7 days at 37°C. The test was repeated two times. The results showed that MIC of ethanol extract was 1.56%, and essential oil was 12.5% respectively. The effect of anti-fungi of ethanol extract was much stronger than essential oil.

Key words: *Piper betle*, essential oil, ethanol extract, *Trichophyton verrucosum*, MIC

PENDAHULUAN

Indonesia mempunyai iklim tropis, dengan kelembaban yang tinggi sehingga cocok untuk pertumbuhan cendawan. Cendawan disebut juga mikotik termasuk mikroorganisme, dan dibagi menjadi dua jenis yaitu khamir (ragi) dan kapang (*mold*). Sejumlah mikotik berperan menimbulkan kerugian secara langsung yaitu terjadinya infeksi yang menimbulkan penyakit disebut mikosis. Kerugian secara tidak langsung adalah akibat zat metabolit yang dihasilkannya berupa toksin, dinamakan mikotoksin, dan penyakitnya disebut mikotoksikosis. Di bidang kedokteran hewan (veteriner) dikenal beberapa penyakit mikosis, antara lain dermatofitosis yang menginfeksi permukaan tubuh, yaitu kulit. Dermatofitosis cukup merugikan terutama bagi hewan ternak, walaupun akibat yang ditimbulkan tidak fatal, tetapi menimbulkan kerugian berupa kerusakan kulit, dan bulu rontok sehingga menurunkan kualitasnya bagi industri kulit. Selama infeksi berlangsung, induk semang terganggu karena rasa gatal serta mempengaruhi pertambahan bobot badan atau produksi susu menurun. Salah satu jenis mikotik dermatofit adalah kapang dari genus *Trichophyton* yaitu *Trichophyton verrucosum*. Penanggulangan penyakit yang selama ini dilakukan, dengan terapi pemberian obat antifungi, yaitu berupa obat-obat sintesis (zat kimia) secara lokal (topikal), dengan obat bentuk salep atau krim, dan secara sistemik melalui mulut. Penggunaan obat-obat sintesis disamping mahal ongkosnya bagi peternak, juga dikhawatirkan meninggalkan residu yang bisa membahayakan hewan, maupun produk dari hewan yang tercemar dan dikonsumsi manusia.

Akhir-akhir ini obat-obat asal tanaman (herbal) mulai dikembangkan dalam penggunaannya di dunia kesehatan manusia dan hewan. Potensi kekayaan hayati Indonesia harus digunakan secara maksimal, oleh sebab itu penelitian tentang khasiat tanaman obat perlu

dikembangkan. Salah satu tanaman herbal yang bermanfaat adalah daun sirih (*Piper betle* L.). Daun sirih digunakan sebagai antibakteri, antifungi, dan pengobatan tradisional (Arambewela *et al.*, 2005; Chahal *et al.*, 2011). Khasiat daun sirih diantaranya sebagai penyegar mulut, karminatif (kembung), penguat jantung, astringen (jus daun dengan minyak), stimulan, antiseptik, sialagoga (peluruh ludah), pengurang rasa sakit (untuk persendian) penyembuh luka (dinding lambung), dan afrodisiak (Bhattacharya *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2010). Wirotasangthong *et al.* (2008) melaporkan pemakaian secara klinis. Salep *P. betle* menyembuhkan penyakit dermatofitosis (*ringworm*), sedangkan gel *P. betle* menunjukkan penghambatan pertumbuhan kapang dermatofit sebagai penyebab penyakit *ringworm* dan *Candida* spp. penyebab penyakit kandidiasis. Hasilnya lebih efektif dari obat sintesis *tolnaftate* dan efeknya setara dengan *clotrimazole* (Bhalerao *et al.*, 2013).

Daun sirih akan terasa hangat bila dikunyah, beraroma, rasanya pahit. Minyak atsiri merupakan kandungan utama dalam daun sirih, berwarna kuning cerah sampai coklat tua, berbau seperti minyak cengkeh, terdiri dari terpen, fenol, dan juga safrole di dalam daun, tangkai, batang dan akar, serta β -phellandrene dalam akar. Kandungan senyawa kimia lainnya dalam daun sirih adalah *diosgenin*, *eugenol*, *allylpyrocatechol*, *methyl eugenol*, *chavibetol*, *hydroxychavicol*, triterpen, dan β -sitosterol. Senyawa utama adalah *chavibetol* dan *allylpythocatechol*. *Chavicol* diduga sebagai antiseptik yang kuat dan isomerik dengan *eugenol* (Bhalerao *et al.*, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa daun sirih berperan sebagai antimikroba. Berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya, maka dilakukan penelitian tentang efektifitas daun sirih sebagai antifungi dengan tujuan untuk digunakan sebagai obat dalam pengobatan dermatofitosis pada hewan.

BAHAN DAN METODE

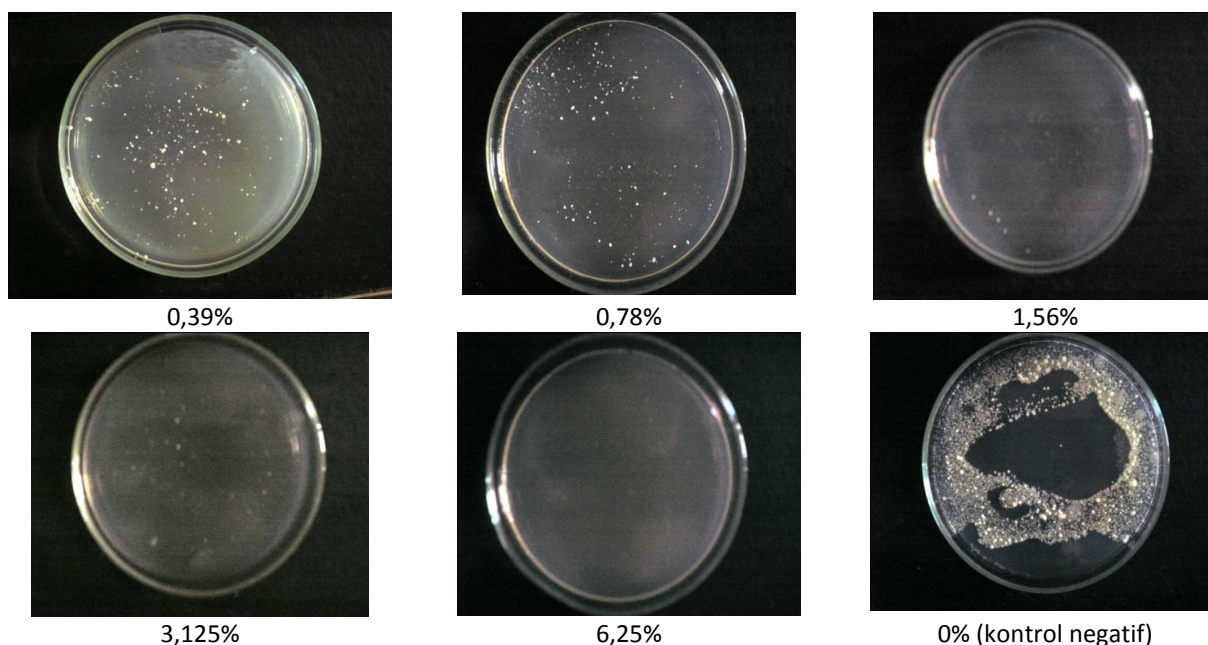
Penelitian dilakukan secara *in vitro*, yaitu dengan metode dilusi (pengenceran), di Laboratorium Mikologi Balai Besar Penelitian Veteriner (BB LITVET), Bogor tahun 2012.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ada dua macam yaitu minyak atsiri dan ekstrak etanol daun sirih, dibuat di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor, dan diuji efek daya hambatnya terhadap isolat satu jenis cendawan, yaitu kapang dermatofit, *T. verrucosum*. Bahan yang diuji diencerkan dengan menggunakan aquades steril masing-masing untuk ekstrak etanol 6,250; 3,125; 1,56; 0,78; dan 0,39%, sedangkan minyak atsiri diencerkan menjadi 12,50; 6,250; 3,125; 1,56; 0,78; dan 0,39%. Isolat berasal dari Balitvet. Isolat cendawan ditumbuhkan di dalam media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dalam cawan petri, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Koloni cendawan yang tumbuh disuspensikan dengan aquades steril. Kedua bahan yang diuji, masing-masing ekstrak etanol

dan minyak atsiri dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 1 ml, dan suspensi koloni cendawan dengan perbandingan (1:1), masing-masing 1 ml. Suspensi cendawan sebanyak 1 ml dituangkan ke dalam cawan petri steril, tanpa ekstrak atau tanpa minyak atsiri sebagai kontrol negatif (0%). Media SDA yang masih cair dituangkan sebanyak 20 ml ke masing-masing petri. Inkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Penelitian diulang dua kali, dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Hasil pengujian diperiksa secara makroskopis, yaitu dengan melihat jumlah koloni cendawan yang tumbuh di permukaan media biakan cawan petri, dan pemeriksaan mikroskopis dengan pembesaran 100 kali untuk melihat struktur hifa atau sel spora.

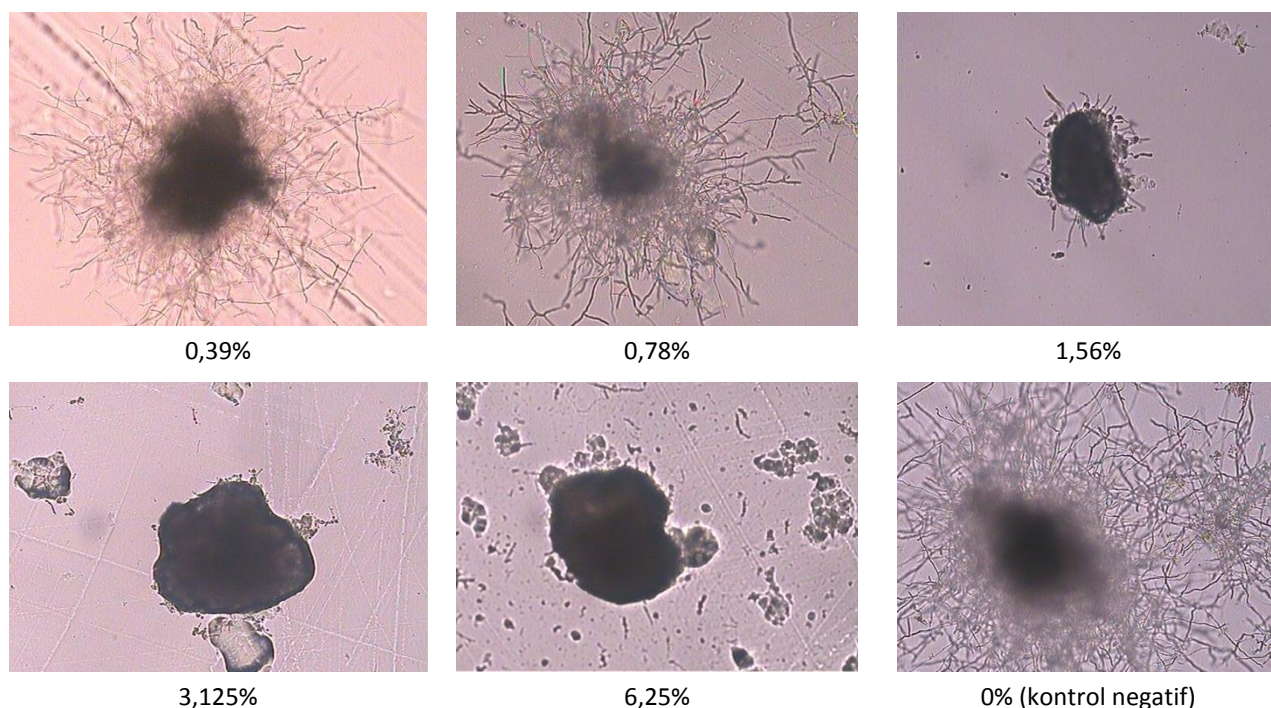
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian berdasarkan pemeriksaan secara makroskopik menunjukkan pertumbuhan koloni cendawan (Gambar 1 dan 3), dan pemeriksaan secara mikroskopis (Gambar 2 dan 4).



Gambar 1. Pertumbuhan koloni *T. verrucosum* pada media SDA yang mengandung ekstrak etanol daun sirih dengan enceran berturut-turut (0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25%; dan kontrol negatif, 0%).

Figure 1. The growth of *T. verrucosum* colony on SDA medium contained diluted ethanol extract of *P. betle* leaf (0.39; 0.78; 1.56; 3.125; 6.25%; and negative control, 0%).



Gambar 2. Pertumbuhan koloni *T. verrucosum*, tampak hifa menyebar dan bercabang pada media SDA yang mengandung ekstrak etanol daun sirih dengan pengenceran (0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25%; dan kontrol negatif, 0%), morfologi mikroskopik, pembesaran 100 kali.

Figure 2. The growth of *T. verrucosum* colony indicated by hyphae development on SDA medium contained diluted ethanol extract of *P betle* leaf (0.39; 0.78; 1.56; 3.125; 6.25%, and negative control, 0%), microscopic morphology, magnified 100 times.

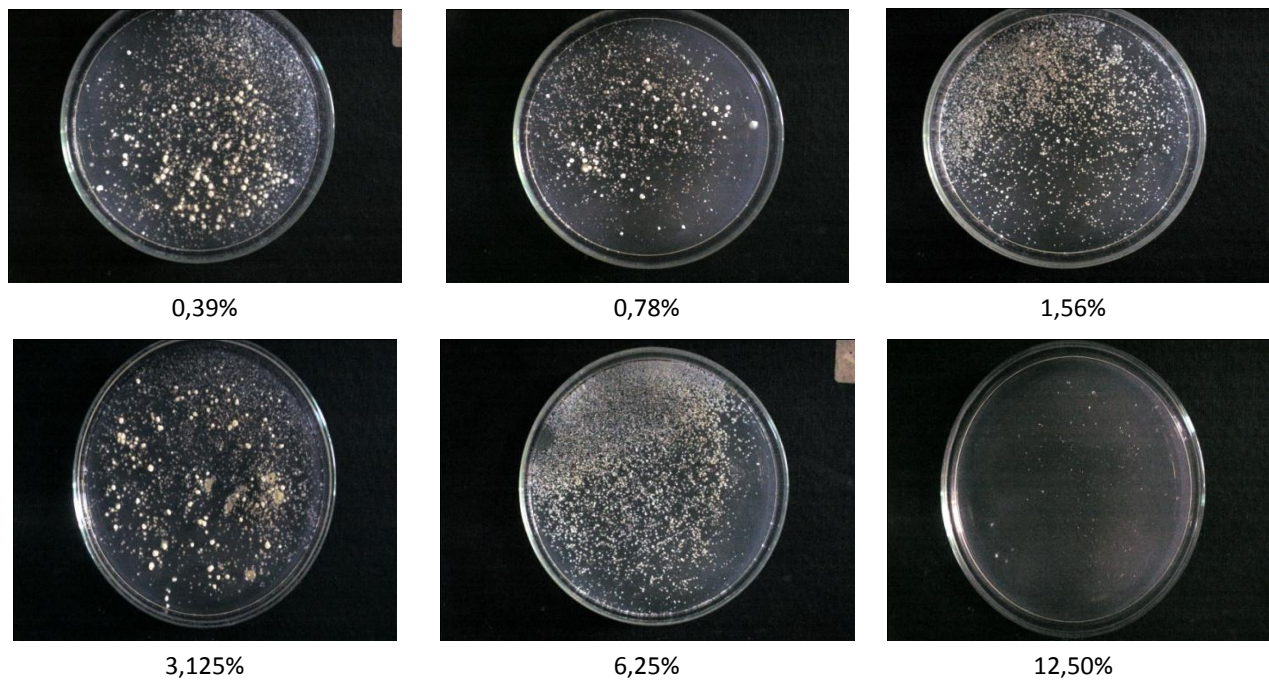
Hasil uji ekstrak etanol daun sirih dengan pemeriksaan makroskopis, terlihat pertumbuhan koloni di permukaan media SDA pada enceran 0,39 dan 0,78%, tetapi tidak ada pertumbuhan pada enceran 1,56%. Pada cawan petri kontrol negatif pertumbuhan koloni tampak padat (Gambar 1).

Pemeriksaan mikroskopis dengan pembesaran 100 kali menunjukkan pertumbuhan koloni cendawan terhambat pada konsentrasi 1,56%, struktur yang tampak berupa pecahan koloni yang padat, bentuk tak teratur. Pada enceran lebih rendah, yaitu 0,39; dan 0,78% serta 0% (kontrol negatif) tampak pertumbuhan koloni cendawan (Gambar 1). Pemeriksaan mikroskopik menunjukkan hifa berkembang subur, bercabang dan menyebar radier. Pada konsentrasi 1,56; 3,125; dan 6,25% menunjukkan efek penghambatan, tampak bagian (pecahan) koloni jamur yang utuh dan kompak, menunjukkan tidak ada pertumbuhan hifa (miselium) (Gambar 2).

Hasil uji dari minyak atsiri daun sirih secara makroskopis tampak pertumbuhan koloni cendawan di permukaan media SDA pada enceran 0,39% sampai dengan 6,25%. dan terjadi penghambatan dimulai pada konsentrasi 12,50% (Gambar 3).

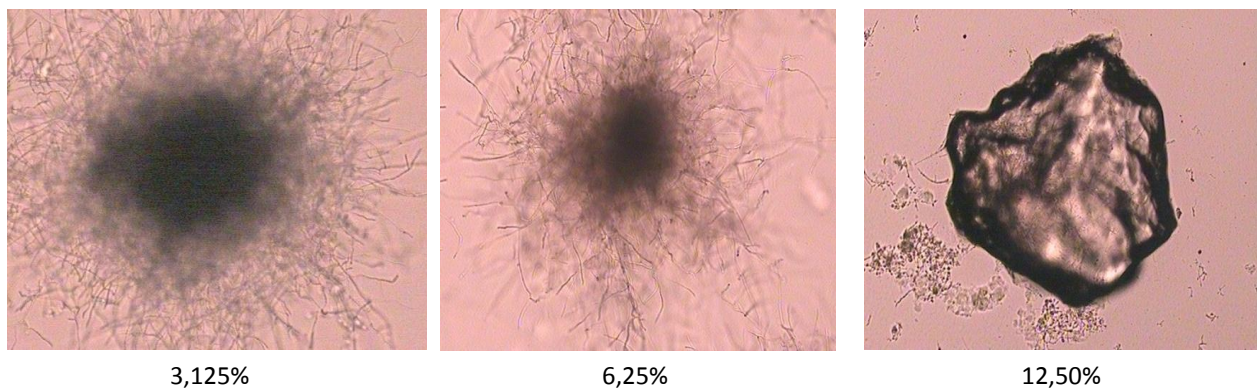
Pemeriksaan secara mikroskopis dengan pembesaran 100 kali (Gambar 4) menunjukkan pertumbuhan hifa yang radier, bercabang-cabang dari koloni yang tumbuh pada enceran minyak atsiri 0,39% sampai dengan 6,25%, sedangkan pada media yang mengandung minyak atsiri dengan enceran 12,50% terlihat berupa bagian (pecahan) koloni cendawan yang utuh dan kompak. Hifa tidak berkembang pada enceran 3,125; 6,25; dan 12,50% (Gambar 4).

Populasi koloni cendawan yang tumbuh tidak dihitung jumlahnya, karena suspensi yang dibuat dengan menggunakan pelarut aquades steril tidak homogen. Hal ini disebabkan karena koloni *T. verrucosum* strukturnya padat dan



Gambar 3. Pertumbuhan koloni *T. verrucosum* pada media SDA yang mengandung minyak atsiri daun sirih dengan enceran (0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; dan 12,50%).

Figure 3. The growth of *T. verrucosum* colony on SDA medium contained diluted essential oil of *P. betle* leaf (0.39; 0.78; 1.56; 3.125; 6.25; and 12.50%).



Gambar 4. Pertumbuhan koloni *T. verrucosum* pada media SDA yang mengandung minyak atsiri daun sirih dengan enceran (3,125; 6,25; dan 12,50%), morfologi mikroskopik, pembesaran 100 kali.

Figure 4. The growth of *T. verrucosum* colony on SDA medium contained diluted essential oil of *P. betle* leaf (3.125; 6.25; and 12.50%), microscopic morphology, magnified 100 times.

menyatu dengan media agar sehingga sukar dipecahkan (dihancurkan) untuk dijadikan suspensi homogen. Suspensi tersebut terdiri dari pecahan (bagian) yang terdiri dari kumpulan hifa dan sel spora, berupa arthrospora (spora berbuku-buku). Kapang *T. verrucosum* yang diisolasi dan dideterminasi untuk penelitian berasal dari kasus *ringworm* sapi perah (Gholib dan Rachmawati, 2010) (Gambar 5, 6 dan 7).

Pecahan koloni tidak merata di dalam suspensi yang dibiakkan ke dalam cawan petri sehingga penanaman kultur di permukaan media tidak merata. Koloni yang tumbuh sulit dibedakan dengan bagian (pecahan) koloni yang terhambat pertumbuhannya, sehingga perlu dilakukan pemeriksaan mikroskopis langsung pada permukaan biakkan di dalam cawan petri. Gambaran mikroskopis koloni cendawan yang

terhambat pertumbuhannya, menunjukkan tidak ada bagian vegetatif yaitu hifa atau sel spora yang tumbuh. Sebaliknya koloni yang tidak terhambat pertumbuhannya sama dengan pertumbuhan koloni pada biakan kontrol negatif, ditunjukkan dengan hifa (miselium) yang tumbuh subur.



Gambar 5. Gambaran mikroskopis *T. verrucosum* dengan pewarnaan Lactophenol Cotton Blue. Tampak filamen (hifa) padat, bercabang, arthrospora tidak tampak, spora seperti tetes embun. Pembesaran 100 kali.

Figure 5. Microscopic image of *T. verrucosum* with Lactophenol Cotton Blue staining. Branched and compact mycelia, no arthrospora, spores resemble mist drops. Magnified 100 times.



Gambar 6. Koloni *T. verrucosum*, yang tumbuh di media SDA, koloni menyembul, padat, melekat di media agar, diameter kira-kira 1,5-2 cm, permukaan berlipat.

Figure 6. Colonies of *T. Verrucosum* in SDA medium, convex and compact colony, attached on agar medium, diameter 1.5-2 cm, folded surface.



Gambar 7. Hifa berbuku-buku (arthrospora) dari *T. verrucosum*, pewarnaan Lactophenol Cotton Blue, pembesaran 100 x.

Figure 7. Arthrospore hyphae of *T. verrucosum*, Lactophenol Cotton Blue staining, magnified 100 times.

Proses terjadinya penghambatan pertumbuhan oleh ekstrak etanol dan minyak atsiri yang diuji terhadap koloni cendawan sedikit sekali kajiannya. Aktivitas dari obat antifungi sintesis dapat diambil sebagai analogi untuk menerangkan mekanisme senyawa aktif terhadap organisme cendawan, contohnya adalah Ciclopirox. Mekanisme kerja antifungi tersebut tampaknya kompleks, efeknya terhadap bermacam-macam proses metabolisme di dalam sel cendawan, seperti mengikat dengan kuat logam trivalensi seperti Fe^{3+} , yang berperan sebagai cofactor enzim, sehingga aktivitas dari enzim sitokrom terhambat. Enzim tersebut penting di dalam proses transpor elektron oleh mitochondria untuk menghasilkan energi. Obat tersebut juga menghambat aktivitas enzim katalase dan peroxidase yang berperanan dalam degradasi zat bersifat racun peroksida, dan efek lainnya terhadap mekanisme transpor pada membran sel. Sejumlah penelitian lainnya menunjukkan efek terhadap masukan nutrisi, sel yang sedang tumbuh, kekurangan asam amino dan nukleotida sehingga mengurangi sintesis protein dan asam nukleat (Shuster, 1999). Ekstrak kasar (*crude*) daun sirih menghambat enzim *glucosyl transferase* yang berefek terhadap pembentukan *glucan* sehingga menimbulkan kondisi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri dan daya perlekatan dari *Streptococcus mutans* (Nalina and Rahim,

2006). Cakraborty dan Shah (2011) menyatakan bahwa senyawa aktif ekstrak daun sirih yang diduga berperan sebagai antibakteri adalah sterol. Mekanisme kerja kemungkinannya secara interaksi permukaan dari molekul sterol dengan dinding sel bakteri, sehingga terjadi perubahan struktur, dan menyebabkan terbentuknya lubang (*pore*) dan kerusakan komponen sel. Hal ini diterangkan bahwa sterol mengganggu daya permeabilitas (*permeability barrier*) dari struktur membran mikroba (Bhalerao *et al.*, 2013). *Hydroxychavicol* adalah senyawa yang dominan dalam daun sirih, dan dinyatakan secara luas sebagai antibakteri, yaitu dengan mekanisme pengrusakan membran sitoplasmik sel bakteri (Ali *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2009; Ramji *et al.*, 2002). Hal ini dideteksi dengan pewarna *fluoresen propidium iodide* pada asam nukleat sel. Zat pewarna dengan bantuan *deoxycholate* meningkatkan difusi melalui membran sitoplasma yang rusak, lalu mewarnai asam nukleat dari sel bakteri, dan pada cendawan jenis khamir (ragi) kerusakan terjadi pada membran sel (Cox *et al.*, 2001; Ramani *et al.*, 1997; Joung *et al.*, 2007). Senyawa aktif *hydroxychavicol* merusak daya permeabilitas membran sel ragi (khamir) *Candida albicans* (Ali, 2010; Nalina and Rahim, 2007). Kemungkinan senyawa *hydroxychavicol* digunakan untuk pengobatan sistemik, lewat saluran pencernaan (Sharma *et al.*, 2009). Sedikit sekali penelitian tentang farmakokinetik dan keamanan zat ini dalam tubuh induk semang. Hal ini dianalogikan dengan profil sitotoksitas penggunaan *thymol* di waktu awal digunakan luas sebagai preservatif (pengawet) makanan dan zat pemelihara kesehatan rongga mulut dari senyawa fenol. Berdasarkan keterangan di atas, dan hasil penelitian pengujian *in vitro*, maka efek antifungi daun sirih kemungkinan berhubungan dengan peranan zat aktif *hydroxychavicol* atau secara sinergis bersama dengan zat aktif lainnya.

Minyak atsiri sifatnya mudah menguap, tidak bercampur dengan air (*hydrophobe*), dengan prosedur pengujian, kemungkinan mengurangi

kandungan zat aktif dan efektivitasnya dibandingkan dengan ekstrak etanol yang bersifat *hydrophyle*. Sifat ekstrak etanol bercampur dengan air, dan kemungkinan lebih banyak mengandung zat-zat aktif yang tertarik dalam proses ekstraksi, sehingga efek sinergi antifungi ekstrak etanol lebih kuat dibandingkan dengan minyak atsiri.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian efek antifungi ekstrak etanol dan minyak atsiri daun sirih terhadap pertumbuhan cendawan dermatofit *T. verrucosum* secara *in vitro* dengan metode pengenceran, menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan minyak atsiri daun sirih mempunyai efek daya hambat terhadap pertumbuhan koloni kapang dermatofit *T. verrucosum*, yaitu masing-masing pada enceran 1,56 dan 12,50%, yang merupakan konsentrasi hambat minimal (KHM). Ekstrak etanol mempunyai efek antifungi lebih kuat dibandingkan dengan minyak atsiri.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali I, FG Khan, KA Suri, BD Gupta, NK Satti, P Dutt, F Afrin, GN Qazi, and IA Khan. 2010. *In Vitro* Antifungal Activity of Hydroxychavicol Isolated from *Piper betle* L. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9(7): 1-9.
- Arambewela LS, LD Arawwawala, and WD Ratnasooriya. 2005. Antidiabetic Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Piper betle* Leaves in Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 239-245.
- Bhalerao SA, DR Verma, RV Gavankar, NC Teli, YY Rane, VS Didwana, and A Trikanad. 2013. Phytochemistry, Pharmacological Profile and Therapeutic Uses of *Piper betle* Linn. An Overview. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(2): 10-19.
- Bhattacharya S, D Banerjee, AK Bauri, S Chattopadhyay, and SK Bandyopadhyay. 2007. Healing Properties of the *Piper betle* Phenol, Allypyrocatechol Against Indomethacin-Induced Stomach Ulceration and Mechanism of Action. *World J. Gastroenterol* 21: 3705-3713.

- Chacraborty D and B Shah. 2011. Antimicrobial, Antioxidative and Antihemolytic Activity of *Piper betle* Leaf Extracts. *Int. J. Pharm. Sci* 3(3): 192-199.
- Chahal J, O Renu, K Ajit, W Anu, and P Sidharth. 2011. Introduction, Phytochemistry, Traditional uses and Biological Activity of Genus *Piper* : A Review. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* (2)2: 130-144.
- Cox SD, CM Mann, JL Markham, JE Gustafson, JR Warmington, and SG Wyllie. 2001. Determining the Antimicrobial Action of Tea Tree Oil. *Molecules*. 6: 87-91.
- Gholib D dan S Rachmawati. 2010. Kapang Dermatofit *Trichophyton verrucosum* Penyebab Penyakit Ringworm Pada Sapi. *Wartazoa, Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia* 1(20): 43-53.
- Joung YH, HR Kim, MK Lee, and AJ Park. 2007. Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida* Species by Flow Cytometry. *J. Infect.* 54: 504-508.
- Nalina T and ZHA Rahim. 2006. Effect of *Piper betle* L. Leaf Extract on the Virulence Activity of *Streptococcus mutans*- An *In Vitro* Study. *Pak. J. Biol. Sci* 9: 1470-1475.
- Nalina T and ZHA Rahim. 2007. The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L. and Its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus Mutans*. *Am. J. Biotechnol. Biochem* 3: 10-15.
- Ramani R, A Ramani, and SJ Wong. 1997. Rapid Flow Cytometry Susceptibility Testing of *Candida albicans*. *J. Clinical Microbiol* 35: 2320-2324.
- Ramji N, R Iyer, and S Chandrasekaran. 2002. Phenolic Antibacterials from *Piper betle* in the Prevention of Halitosis. *J. Ethnopharmacol* 83: 149-152.
- Sharma S, IA Khan, I Ali, F Ali, M Kumar, A Kumar, RK Johri, ST Abdullah, S Bani, A Pandey, KA Suri, BD Gupta, NK Satti, P Dutt, and GN Qazi. 2009. Evaluation of The Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydroxychavicol for Its Potential Use as An Oral Care Agent. *Antimicrobe Agents Chemoter* 53: 216-222.
- Shuster, S. 1999. Hydroxy-Pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 109 p.
- Singh M, S Shakya, VK Soni, A Dangi, N Kumar, and SM Battacharya. 2009. The N-Hexane and Chloroform Fractions of *Piper betle* L., Trigger Different Arms of Immune Responses in BALB/C Mice and Exhibit Antifilarial Activity Against Human Lymphatic Filariid *Brugia Malay*. *Int. Immunopharmacol* 2009. 9: 716-728.
- Wirotasangthong M, I Naoki, dan T Hiroyuki. 2008. Inhibitory Effects of *Piper betle* on Production of Allergic Mediators by Bone Marrow-Derived Mast Cells and Lung Epithelial Cells. *International Immunopharmacology* 8: 453-457.