

Research Report

Penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM) dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) ekstrak Daun Sirih Merah terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*

(Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Red Betel Vine extract against *Porphyromonas gingivalis* bacterial biofilms)

Senny Kandarani<sup>1</sup>, Dian Agustin W<sup>2</sup> Febriastuti Cahyani<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa S1

<sup>2</sup> Staff pengajar Bagian Ilmu Konservasi Gigi  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga  
Surabaya – Indonesia

**ABSTRACT**

**Background.** The endodontic pathogens are obligate anaerobic gram negative bacteria, conspicuously dominating in primary infections is *Porphyromonas gingivalis*. *Piper crocatum* is one of the most potential herbal plant in Indonesia with broad efficacy for various disease. Based on previous research, it is known that red betel vine extract contains 11 bioactive antimicrobial substances such as alkaloids, saponins, tannins, flavonoids, and polyphenols. This antimicrobial bioactive components have diverse mechanisms against bacteria. **Purpose.** The aim of this study is to find out the antimicrobial effect of red betel vine extract against *Porphyromonas gingivalis* bacterial biofilms, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). **Method.** This research is a laboratory experimental with the post test only control group design. The antimicrobial activity test was performed by direct contact and continued by colony count to determine the value of MIC and MBC of red betel vine extract against *Porphyromonas gingivalis* bacterial biofilms. **Result.** There is no decreasing in the number of *Porphyromonas gingivalis* bacterial colonies at any concentration of red betel vine extract. **Conclusion.** The red betel vine extract doesn't has antibacterial effect on *Porphyromonas gingivalis* biofilm and no MIC and MBC values obtained.

**Keywords:** Red Betel Vine extract, antimicrobial, *Porphyromonas gingivalis* bacterial biofilm, MIC, MBC

Korespondensi (correspondence): Senny Kandarani, Bagian Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: [sennykandarani@yahoo.com](mailto:sennykandarani@yahoo.com)

**PENDAHULUAN**

Sumber utama bakteri dalam pulpa adalah dari karies. Di Indonesia, menurut hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007, prevalensi karies gigi aktif penduduk usia 12 tahun ke atas sebesar 43,4% dan pengalaman karies sebesar 67,2% dengan rerata tingkat kerusakan gigi sebesar 4,85 artinya rerata penduduk Indonesia usia 12 tahun ke atas telah mengalami kerusakan gigi sebesar 5 buah per orang.<sup>1</sup> Bakteri karies yang mendominasi adalah anaerob obligat. Data saat ini

menunjukkan bahwa bakteri anaerob mempunyai peran utama dalam penyakit pulpa dan periapikal.<sup>2</sup>

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob penyebab utama penyakit periodontal dan dapat menginvasi saluran akar.<sup>3,4</sup> Walaupun jumlahnya sedikit, *Porphyromonas gingivalis* dapat memicu perubahan jumlah dan komposisi bakteri komensal oral yang pada akhirnya dapat menyebabkan inflamasi pada host. Pada beberapa kasus, penyakit periodontal memerlukan perawatan saluran akar untuk mempertahankan gigi dan menghilangkan pulpa yang terinfeksi.

Penggunaan bahan irigasi merupakan bagian penting dari perawatan endodontik. Bahan irigasi memfasilitasi pengambilan jaringan nekrotik, mikroorganisme dan serpihan dentin dari saluran akar dengan tindakan pembilasan. Bahan irigasi juga dapat membantu mencegah jaringan keras dan lunak yang terinfeksi di bagian apikal di saluran akar dan ke daerah periapikal.<sup>5</sup>

Hampir semua larutan irigasi yang berbahan dasar kimia memiliki kekurangan yang sama, yaitu efek samping yang buruk dan sifat toksik terhadap jaringan yang sehat, khususnya dalam konsentrasi yang tinggi. Mengingat hal tersebut, penelitian dan penggunaan larutan irigasi dari bahan herbal mulai diperhatikan. Bahan sintetik diketahui memiliki efek samping dan toksisitas yang lebih besar daripada bahan alami. Pengobatan menggunakan bahan alami lebih diutamakan karena mudah didapatkan, efek samping rendah, dan toksisitas rendah. Komponen bioaktif dalam tumbuhan maupun rempah-rempah, dapat memberi keuntungan dalam bidang kesehatan.

Tanaman sirih merah (*Piper crocatum*) termasuk salah satu dari tanaman berkhasiat obat di Indonesia dipercaya mempunyai khasiat penyembuhan berbagai macam penyakit. Salah satu bagiannya yang berupa daun bersifat antibiotik terhadap bakteri. Air rebusan sirih merah mengandung antiseptik atau karvakol yang bersifat desinfektan dan antijamur. Secara empiris, sirih merah juga dipercaya bersifat antiseptik, artinya ia mampu mengeliminasi pertumbuhan mikroorganisme pada kulit. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Juliantina, et al. (2009) tentang KHM dan KBM ekstrak etanol sirih merah memiliki kemampuan antibakteri dengan KHM 25% dan KBM 25% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sedangkan KHM 6,25% dan KBM 6,25% terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218.<sup>6,7,8</sup>

Tujuan penelitian adalah Untuk mengetahui besar Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in-vitro* dengan rancangan penelitian yang digunakan *post test only control group design*, menggunakan

sampel biofilm spesies tunggal *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Terdiri dari 3 kelompok yaitu, kelompok kontrol positif yang berisi biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* tanpa penambahan ekstrak daun sirih merah, kelompok kontrol negatif yang hanya diberi ekstrak daun sirih merah, dan kelompok perlakuan yang berisi biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan diberi penambahan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 3,125%, 1,562%, dan 0,781%. Stok bakteri *P. gingivalis* ATCC 33277 diencerkan sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) dengan metode dilusi pada media TSB. Kemudian 0,1 mL bakteri *Porphyromonas gingivalis* diisikan ke *microtiterplate flexible U bottom* dengan media TSB. *Microtiterplate* diinkubasi selama 6 x 24 jam pada suhu 37°C untuk pembentukan biofilm dan dilihat pertumbuhannya menggunakan mikroskop *inverted*. Dilakukan pewarnaan *Simple Staining* atau *Crystal Violet* untuk mengecek fase pertumbuhan logaritme atau tidak mengalami mutasi, ataupun fase lag atau mati. Kemudian, 1 mL suspensi biofilm bakteri ditambahkan kedalam tabung suspensi bahan uji berupa larutan ekstrak daun sirih merah (telah diencerkan sebelumnya dengan suhu tidak lebih dari 50°C) yang telah disediakan sesuai konsentrasi bahan uji dan diberi label masing-masing. Dilakukan inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37° C dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah inkubasi, dilakukan vorteks atau pencampuran kemudian diambil 50 µL dan ditanam dalam media padat *Mueller-Hinton* dengan metode *Drop Plates Miles Misra*. Media diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37° C dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal ekstrak daun sirih merah terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* didapatkan melalui penghitungan jumlah koloni biofilm bakteri yang dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU).

## HASIL

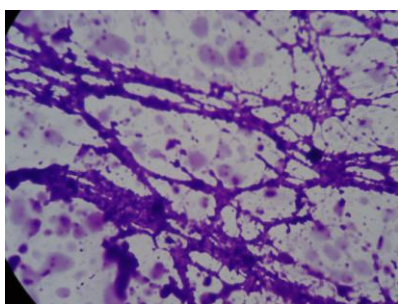
Dari hasil penelitian dan pengamatan, didapatkan bahwa hasil uji ekstrak daun sirih merah terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah TBUD (Tidak Bisa Untuk Dihitung; jumlah koloni >300). artinya Pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% dan 1,56% tidak didapatkan penurunan jumlah koloni biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

**Tabel 1.** Hasil Penghitungan Jumlah Koloni Biofilm Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

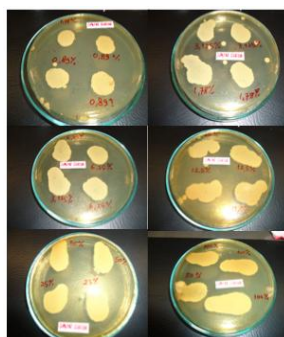
Kelompok Perlakuan	N	X Jumlah Koloni (CFU/ml)	X Jumlah Koloni (%)
Kontrol (+)	3	2,96.10 <sup>5</sup>	100
Kontrol (-)	3	0	0
Konsentrasi 100%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 50%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 25%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 12,5%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 3,125%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 1,562%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 0,781%	3	TBUD	TBUD

Keterangan:

Kontrol (+) adalah media cair TSB yang berisi biofilm bakteri tanpa penambahan ekstrak daun sirih merah. Kontrol (-) adalah ekstrak dau sirih merah yang ditanam sebelum dikontakkan dengan kuman. TBUD (tidak bisa untuk dihitung; jumlah koloni >300). CFU/ml (*Colony Forming Unit per milliliter*).



**Gambar 1.** Jaring-Jaring Biofilm Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan Pewarnaan Kristal Violet



**Gambar 2.** Media Berisi Biofilm Bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang telah diberi ekstrak Daun Sirih Merah

## PEMBAHASAN

Bakteri yang menginvasi ke dalam pulpa melalui proses karies dapat menyebabkan inflamasi pulpa dan periapikal. Eliminasi mikroba melalui perawatan saluran akar diperlukan untuk mempertahankan gigi dan membuang pulpa yang terinfeksi. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob yang walaupun hadir dalam jumlah sedikit dapat menyebabkan respon inflamasi pada host. *Porphyromonas gingivalis* dapat membentuk biofilm sebagai bentuk pertahanan bakteri dalam lingkungan yang dianggap merugikan untuk pertumbuhan dan merupakan bakteri inisiator dalam pembentukan awal biofilm. Dalam waktu yang relatif cepat; yaitu 4 jam, bakteri *Porphyromonas gingivalis* ada dalam plak. Berdasarkan faktor virulensi dan patogenitas tersebut, kegagalan perawatan saluran akar dapat terjadi. Debridemen saluran akar yang sempurna disertai penggunaan bahan irigasi, merupakan salah satu dari triad endodontik. Larutan irigasi yang berbahan dasar kimia memiliki efek samping dan toksisitas lebih besar daripada yang berbahan dasar herbal. Salah satu bahan herbal yang memiliki komponen bioaktif yang bersifat antibiotik adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah tidak dapat bersifat sebagai antibiotik terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Tidak adanya penurunan jumlah koloni biofilm bakteri dapat disebabkan karena berbagai macam faktor. Bakteri dalam bentuk biofilm memiliki sistem pertahanan dan mekanisme beragam untuk bertahan hidup, seperti pertahanan terhadap fagositosis, radiasi sinar UV, serangan virus, dehidrasi, dan bahkan dari agen biosida, antibiotik, dan respon imun host. Biofilm dijabarkan sebagai komunitas struktural dari sel-sel bakteri yang terkumpul di dalam EPM (*extracellular polymeric matrix*) yang diproduksi oleh bakteri itu sendiri dan menempel pada permukaan benda hidup atau mati. Biofilm menunjukkan kemampuan untuk bertahan dalam 100-1000 kali konsentrasi antibiotik dan biosida yang dapat menghambat sel-sel planktonik. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam bentuk biofilm mempunyai banyak faktor virulensi seperti *fimbriae*, lipopolisakarida, sistein proteinase, dan produk akhir metabolisme. EPM (*Extracellular Polymetric Matrix*) pada biofilm meningkatkan resistensi terhadap pertahanan host dan agen

antimikroba, dibandingkan dengan sel-sel planktonik yang rentan, dan membentuk barier biopolimer terhidrasi antara sel-sel dan lingkungan eksternal biofilm yang disebut sebagai *slime* atau EPS (*Extracellular Polymeric Substances*). Secara kimia, struktur EPM cukup kompleks tergantung strain bakteri dan kondisi kultur. Komponen utama EPM adalah polisakarida, protein, dan DNA. Dalam beberapa penelitian terdahulu, cara terbaik untuk mengeliminasi biofilm adalah secara mekanik.<sup>9,10</sup>

Tahap penghancuran biofilm bakteri adalah dengan menembus EPM biofilm, lalu dinding sel bakteri. Problem diperburuk akibat bakteri dalam bentuk biofilm adalah hipermutasi. Hal ini terjadi saat bakteri, dalam respon terhadap tekanan lingkungan (seperti antibiotik), bermutasi pada tingkat yang lebih tinggi untuk mengembangkan resistensi dan meringankan stress tertentu dari komunitas. Mekanisme resistensi biofilm terhadap antibiotik dan mikrobisida adalah melalui pembentukan EPS dan regulasi peningkatan gen-gen yang bertanggungjawab untuk protein porin atau pompa efluks khusus untuk menyingkirkan antibiotik dari dalam sel.<sup>11</sup>

Kesulitan penghancuran biofilm terletak pada EPM yang melindungi biofilm dari pertahanan host, agen biosida, maupun antibakteri. EPM yang menghasilkan *slime* membuat biofilm sulit untuk ditembus. Dari penjelasan diatas, kemungkinan yang terjadi adalah ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi tersebut tidak mampu menembus EPM biofilm sehingga tidak dapat membunuh bakteri *Porphyromonas gingivalis* di dalamnya. Ekstrak daun sirih merah dapat menghambat atau membunuh bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam bentuk planktonik karena tidak membutuhkan fase penghancuran EPM biofilm.

Komunitas bakteri dalam biofilm memiliki laju pertumbuhan yang lambat dan menjadi faktor naiknya resistensi terhadap eradikasi. Sel-sel bakteri yang terletak di paling bawah dari biofilm, tumbuh lebih lambat karena ketersediaan nutrisi yang sedikit. Sel-sel dengan aktivitas metabolisme yang dikurangi sifatnya menjadi lebih kebal terhadap eradikasi. Hal ini dapat dihubungkan dengan kekuatan penetrasi kedalam biofilm oleh agen antibiotik yang berbeda-beda, menjelaskan bagaimana kegagalan eradikasi. Kemungkinan yang terjadi adalah bahan bioaktif dalam ekstrak daun sirih merah tidak cukup kuat untuk dapat berpenetrasi sempurna ke dalam biofilm bakteri

*Porphyromonas gingivalis*, sehingga tidak dapat mengeradikasi.

Dari penelitian terdahulu menggunakan bakteri planktonik, ekstrak daun sirih merah memiliki kemampuan antibakteri baik terhadap bakteri Gram Positif maupun Gram Negatif. Penelitian oleh Haryadi (2010) diketahui bahwa konsentrasi efektif ekstrak daun sirih merah untuk menghambat *Staphylococcus aureus* adalah 18%.<sup>12</sup> Penelitian oleh Juliantina, et. al. (2009) menunjukkan bahwa KHM dan KBM ekstrak daun sirih merah terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 25% sedangkan KHM dan KBM ekstrak daun sirih merah terhadap *Escherichia coli* adalah 6,25%.<sup>8</sup> Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ratminto (2012) diketahui bahwa konsentrasi 80% ekstrak daun sirih merah adalah yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.<sup>13</sup>

Dari hasil penelitian terdahulu oleh Ratminto, tampak bahwa dibutuhkan konsentrasi yang cukup tinggi hanya untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.<sup>13</sup> Konsentrasi yang lebih tinggi mungkin dibutuhkan untuk membunuh bakteri ataupun biofilm bakteri.

Setiap bakteri memiliki karakteristik yang berbeda, yang tampak dari faktor virulensi dan patogenitasnya. Diketahui bahwa bakteri Gram Negatif memiliki lipopolisakarida pada dinding sel, lipid, dan lipoprotein yang tinggi sehingga lebih resisten terhadap antibiotik bila dibandingkan dengan bakteri Gram Positif. Menurut Gunawan (2008), bahan aktif saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menurunkan tegangan permukaan lipid bakteri sehingga tidak dapat mempertahankan bentuk dinding sel, yang mengakibatkan kerusakan membran sel serta menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, dan nukleotida.<sup>14</sup> Sintesis protein bakteri dapat terhambat dan pada akhirnya membuat pertumbuhan bakteri dan biofilm terhambat. Ternyata tidak didapatkan bahan aktif saponin dalam ekstrak daun sirih merah.

Eradikasi yang efektif untuk semua bahan antibiotik dan mikrobisida adalah saat mikroorganisme dalam bentuk planktonik. Dapat pula dengan cara memblok *initial attachment* bakteri ke permukaan. Bila mikroorganisme tersebut dalam perjalanan membentuk biofilm sudah pada fase sekresi EPS, akan sulit bagi bahan tersebut untuk dapat mengeradikasi. Bakteri

*Porphyromonas gingivalis* memiliki *fimbriae* yang merupakan salah satu faktor virulensi yang membantu adhesi, formasi koloni, dan biofilm. Plak gigi adalah salah satu bentuk biofilm dalam rongga mulut. Kecepatan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam plak gigi adalah sedini 4 jam setelah pembersihan gigi, sehingga komponen bioaktif dalam ekstrak daun sirih merah tidak mampu menghambat bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam pembentukan biofilm.

Kadar senyawa kimia yang terkandung dalam daun sirih merah dapat beragam, tergantung lingkungan tumbuh, usia saat panen, bagian tanaman yang digunakan, dan waktu panen. Daun sirih merah yang didapatkan oleh peneliti tidak dapat diketahui secara pasti apakah perawatan sebelumnya pada tanaman tersebut sudah sesuai atau tidak. Kemungkinan yang terjadi adalah perawatan dan perlakuan tanaman belum sesuai, sehingga kadar senyawa kimia atau zat aktif menjadi turun dan membuat daun sirih merah yang dihasilkan menjadi turun efektifitasnya.

Terdapat beberapa hal yang mungkin menjadi faktor kerusakan senyawa kimia daun sirih merah yang diujikan. Manoi tahun 2008 menjelaskan bahwa tanaman sirih merah siap dipanen minimal setelah umur 4 bulan. Daun yang dipetik sebaiknya berumur sudah cukup tua (minimal 1 bulan) karena kadar zat aktifnya tinggi. Penyimpanan ekstrak yang buruk seperti terkena cahaya matahari, terlalu lama diluar kulkas, terlalu lama disimpan, dapat merusak senyawa kimia dalam ekstrak.<sup>15</sup> Hal-hal diatas dapat secara langsung merusak senyawa kimia daun sirih merah dan menurunkan kemampuannya sebagai antibakteri. Bila kadar senyawa kimia dalam daun turun ditambah dengan proses pengekstrakan yang kurang baik seperti: jarak waktu antara panen hingga dilakukan pengekstrakan terlalu lama, pencucian bahan basah yang tidak bersih, pengeringan daun sirih merah dalam oven dengan suhu yang terlalu tinggi dalam waktu yang lama, dan sortasi kering yang kurang baik; dapat semakin menurunkan kadar senyawa kimia dalam ekstrak daun sirih merah yang pada akhirnya mempengaruhi kemampuan ekstrak untuk menembus biofilm.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini tidak didapatkan nilai KHM dan KBM ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan RI. Riskesdas Indonesia Tahun 2007. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar. Jakarta. 2008
2. Torabinejad M & Walton RE. Endodontics Principles and Practice. 4<sup>th</sup> Ed. China: Saunders Elsevier. 2009.pp. 38-9.
3. Hajishengallis G, et, al. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. J Com. 2011; vol. 10(6): 1
4. Nair PNR. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 ; vol. 15(6): 348-81
5. Ingle JI, Bakland LK, & Baumgartner JC. Ingle's Endodontics. 6<sup>th</sup> Ed. Hamilton: BC Decker Inc. 2008. pp. 997-1002.
6. Trubus. Herbal Indonesia Berkhasiat: Bukti Ilmiah & Cara Racik. Vol. 08. Depok: PT Trubus Swadaya. 2010
7. Werdhany WI, Marton SSA, & Setyorin IW. Sirih Merah. Yogyakarta: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta. 2008. Retrieved May 12, 2013, from [yogya.litbang.deptan.go.id](http://yogya.litbang.deptan.go.id).
8. Juliantina FR, Dewa ACM, Nirwani B, Nurmasitoh T, & Bowo ET. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. JKKI. 2009 ; vol.1(1) : 1-10.
9. Mohammed MMA, Nerland AH, Al-Haroni M, & Bakken V. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. J Oral Microbiol. 2013; vol. 5
10. Wolcott RD and Ehrlich GD. Biofilms and Chronic Infections. JAMA. 2008 ; 299(22) : 2682-4.
11. Richards JJ and Melander C. Small Molecule Approaches Toward the Non-Microbicidal Modulation of Bacterial Biofilm Growth and Maintenance. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry. 2009 ; 8(4) : 295-314.
12. Haryadi RBE. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In Vitro sebagai Materi Praktikum Mikrobiologi. Tesis: Universitas Negri Malang. 2010

13. Ratminto CD. Pengaruh Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* (Kajian in vitro). 2012. Retrieved May 31, 2013, from Fakultas Kedokteran UMY Digital Library.
14. Gunawan, A. Antibakteri pada Herba Meniren (*Phyllanthus niruri* Linn). *J Kimi*. 2008 ; vol. 2 :3.
15. Manoi F. Sirih Merah Sebagai Tanaman Obat Multifungsi. *Warta Puslitbangbun*. 2007 ; vol 1 (2)