

PENGARUH LAMA DAN SUHU PENYIMPANAN EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle linn*) DENGAN AQUADES TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Streptococcus agalactiae* PENYEBAB MASTITIS PADA SAPI PERAH

Muhammad Sanjaya Kusuma¹⁾, Tri Eko Susilorini²⁾ dan Puguh Surjowardojo²⁾

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

²⁾ Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

Email: sanjayakhu95@gmail.com

ABSTRACT

Green betle leaf (*Piper betle L.*) is one of the plants used by the people of Indonesia for tradisional medicine. Green betle leaf contains antibacterial compounds consisting of phenol and its derivatives. This study aims to determine the antibacterial activity of green betle leaf (*Piper betle L.*) againt the bacteria *Streptococcus agalactiae* caused mastitis in dairy cows. Bacterial inhibition test by paper disc method. Data analysis using ANOVA by Nested design with 6 treatment and 6 repetitions. The results of this study green betle leaf (*Piper betle L.*) extract inhibiting the growth of bacteria *Streptococcus agalactiae* was significantly different ($P < 0,01$). The conclusion were the extract of green betel leaf (*Piper betle L.*) can inhibit the growth of *Streptococcus agalactiae* and storage temperature has no effect, but storage periode gives effect the quality of green betel leaf extract (*Piper betle L.*), so that the leaf extract storage green betel with distilled solvent recommended on 2nd days at refrigerator.

Keywords : Storage periode, Extract, Green betle leaf, Inhibition zone and *Streptococcus agalactiae*.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan tanaman herbal, Salah satu tanaman herbal yang banyak dikenal oleh masyarakat sebagai tanaman herbal adalah daun sirih hijau (*Piper betle L.*). Daun sirih hijau merupakan salah satu dari 13 jenis tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi. Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) mengandung minyak atsiri yang di dalamnya terdapat kandungan fenol yang merupakan salah satu zat antibakteri. Kandungan fenol yang terdapat pada daun sirih hijau (*Piper betle L.*) lebih banyak dibandingkan fenol pada umumnya, kandungan fenol tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri diantaranya adalah bakteri penyebab mastitis.

Mastitis merupakan infeksi radang ambing oleh bakteri yang dapat

menyebabkan penurunan kualitas dan produksi susu pada ternak perah. Kejadian mastitis salah satunya disebabkan oleh infeksi bakteri *Streptococcus agalctiae*. *Streptococcus agalactiae* memiliki *hemagglutinin* yang menjadi salah satu faktor virulen yang dimiliki bakteri patogen dan berperan dalam mekanisme infeksi, sehingga dapat menempel pada sel epitel ambing sehingga dapat menyebabkan terjadinya mastitis (Sugiri dan Anri, 2010).

Pencegahan mastitis dilakukan dengan teat dipping menggunakan antiseptik yaitu dengan mencelupkan puting pada larutan kimia iodips. Penggunaan antiseptik selain harganya yang mahal juga dapat menimbulkan residu pada susu. Oleh karena itu perlu dicari alternatif lain dalam upaya pencegahan mastitis sapi perah. kandungan zat aktif yang terdapat pada daun sirih diharapkan

dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan bakteri penyebab mastitis, selain itu penggunaan daun sirih hijau sebagai antiseptik herbal untuk mengganti pemakaian larutan kimia iodops adalah diharapkan agar lebih mudah didapat dan harganya lebih murah.

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mempunyai efektivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Semakin tinggi konsentrasi daun sirih hijau, kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* semakin kuat, hal tersebut dikarenakan jumlah zat antibakteri yang terkandung di dalam setiap peningkatan konsentrasi akan semakin besar. Poeloengan, Susan dan Andriani (2005) pengujian ekstrak daun sirih secara *in vitro* (metode cakram) dan *in vivo* (dipping) mempunyai efektivitas untuk menurunkan jumlah bakteri susu dari sapi penderita mastitis. Namun pembuatan ekstrak daun sirih hijau membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga penggunaan ekstrak daun sirih hijau kurang praktis. Berdasarkan uraian tersebut perlu diketahui lama dan suhu penyimpanan yang optimal dalam menjaga kualitas ekstrak daun sirih hijau sebagai antibakteri pencegah kejadian mastitis.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama satu bulan yaitu bulan Januari-Februari 2017 di Laboratorium Ternak Perah Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang dan Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Malang, Jawa Timur.

Materi

Materi Penelitian yang digunakan yaitu daun sirih hijau (*Piper betel*L.) yang dibuat menjadi ekstrakLaboratorium Ternak Perah Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri *Streptococcus agalactiae*

merupakan bakteri stock yang diperoleh dari Laboratorium HPT (Hama dan Penyakit Tanaman) Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah Timbangan analitik, Oven, *Grinder*, *Erlenmeyer* 1 liter, Gelas ukur, *Rotary evaporation*, Kertas saring, Cawan petri, Tabung reaksi, Lampu spertus/bunsen, *Autoclaf*, *Incubator*, Labu *erlenmeyer*, Gelas ukur 500 ml, Mikro pipet, Pinset, Jangka sorong, Pengaduk, *Magnetic stirer*, Kertas label, Tisu, Plastik wrap, Stik L *glass*, *Alumunium foil*.Bahan yang digunakan yaitu ekstrak daun sirih hijau, bakteri *Streptococcus agalactiae*, aquades, kertas cakram dan alkohol 70%.

Metode

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui potensi daya hambat ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.). Pada penelitian ini terdapat 2 faktor, faktor pertama adalah lama penyimpanan (P) dan kedua adalah suhu penyimpanan (R) dengan 6 kali ulangan.

- P₁R₁ : ekstrak daun sirih disimpan selama 1 hari pada suhu ruang.
- P₂R₁ : ekstrak daun sirih disimpan selama 2 hari pada suhu ruang.
- P₃R₁ : ekstrak daun sirih disimpan selama 3 hari pada suhu ruang.
- P₁R₂ : ekstrak daun sirih disimpan selama 1 hari pada refrigerator
- P₂R₂ : ekstrak daun sirih disimpan selama 2 hari pada refrigerator
- P₃R₂ : ekstrak daun sirih disimpan selama 3 hari pada refrigerator

Media ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang digunakan yaitu konsentrasi 20% ditambah 100 mL aquades untuk semua perlakuan.

Tahap Penelitian

Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia daun sirih hijau (*piper betle* L.) menurut Kursia dkk (2016) adalah sebagai berikut:

1. Daun sirih hijau disortasi.

2. Dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel lalu ditiriskan.
3. Dipotong kecil-kecil.
4. Dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 24 jam.
5. Dihasilkan daun sirih hijau kering kemudian dihaluskan menggunakan grinder, sehingga menjadi serbuk (*simplicia*) serbuk daun sirih hijau yang digunakan sebagai sample penelitian.

Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn)

Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut (Sholikhatin dkk., 2014):

1. Serbuk daun sirih ditimbang sebanyak 20 g. Daun sirih yang sudah halus dimasukan kedalam gelas *erlenmeyer* ukuran 1 liter.
2. Dituangkan aquades sampai 100 ml kedalam *erlenmeyer*, direbus pada suhu 60°C selama 60 menit. Filtrat daun sirih hijau disaring dengan kertas saring.
3. Dilakuakn proses *evaporasi* untuk memisahkan larutan dengan zat-zat aktif yang ada didalam ekstrak. Hasil penyaringan dimasukan kedalam *erlenmeyer*.
4. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 70°C selama 1 jam.
5. Hasil ekstrak dibagi menjadi dua dan dimasukkan kedalam pot film
6. Disimpan di suhu ruang 26-28°C dan refrigerator 4-6°C.

Pembiakan Bakteri

Prosedur pembiakan bakteri berdasarkan Ariyanti, darmayasa dan sudirga (2012) adalah sebagai berikut:

1. Dimasukkan 4 ml *nutrient broth* (NB) ke dalam tube.
2. Diambil 2-3 koloni bakteri stok menggunakan ose steril.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Daya Hambat Bakteri

Uji daya hambat bakteri berdasarkan Haque, Moon, Saravana, Tilahun and Chun (2016) adalah sebagai berikut:

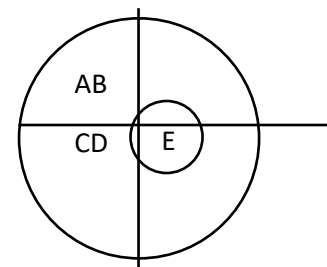
1. Direndam kertas cakram ke dalam dekok daun sirih hijau (*Piper betle* L.) selama 5 menit.
2. Dituang media *nutrient agar* (NA) yang sudah disterilisasi sebanyak 10 mL ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai membentuk gel.
3. Dituang bakteri 100 µL dengan jumlah bakteri 10⁶ ke dalam media NA yang sudah membentuk gel.
4. Diratakan bakteri menggunakan glass L.
5. Diletakkan cakram dipermukaan media *nutrient agar* (NA) yang sudah diberi bakteri.
6. Diinkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengukuran Diameter Daya Hambat Bakteri

Zona bening disekitar daerah cakram merupakan akibat dari antibakteri. Pengukuran diameter zona hambat sebagai berikut (Sholikhatin dkk., 2014):

1. Diukur diameter zona hambat vertikal.
2. Diukur zona hambat horizontal.
3. Masing-masing hasil pengukuran dikurangi diameter kertas cakram sebesar 6 mm.

Rumus untuk menghitung zona hambat adalah sebagai berikut :



Gambar 1. Pengukuran diameter zona hambat.

$$\text{Zona hambat} = \frac{AB + CD}{2} - E$$

AB = Diameter vertikal
 CD = Diameter horizontal
 E = Diameter kertas cakram

Tabell. Kategori Penghambatan Antimikroba Berdasarkan Diameter Zona Hambat.

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
0-3	Lemah
3-6	Sedang
>6	Kuat

Sumber : Pan, Chen, Wu, Tang and Zhao (2009)

Varibel Pengamatan

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu luas zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram.

Analisa Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis varian (ANOVA) pola RAL tersarang, apabila hasil menunjukkan adanya perbedaan nilai F_{hitung} maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan.

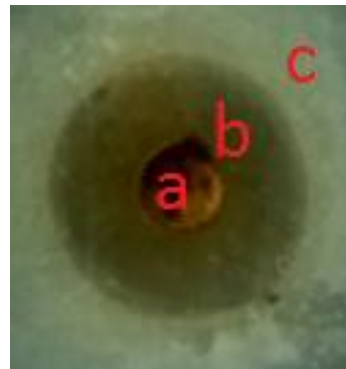
HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Ekstrak Daun Sirih Hijau terhadap Bakteri *Streptococcus agalactiae*

Diameter zona bening yang terbentuk dipengaruhi oleh lama dan suhu penyimpanan ekstrak daun sirih hijau, semakin lama disimpan maka diameter zona bening semakin kecil. Suspensi bakteri yang digunakan yaitu 10^8 CFU/ml, konsentrasi bakteri tersebut sudah memenuhi syarat dalam pengujian kepekaan bakteri.

Hasil dari pengujian didapatkan bahwa ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dapat menghambat *Streptococcus agalactiae*. Terbentuknya zona hambat ini

dikarenakan adanya zat antibakteri yang terekstrak. Chandrasari dkk. (2012) daun sirih hijau mengandung beberapa senyawa antibakteri seperti alkaloid, flavonoid, senyawa polifenolat, avonoid, tanin, saponin dan minyak atsiri. Senyawa yang berperan sebagai antimikroba dalam minyak atsiri daun sirih hijau adalah isoeugenol dan *p*-allifen. Senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai antimikroba karena gugus OH yang bersifat racun terhadap mikroba dan semakin banyak gugus OH yang ada pada senyawa tersebut maka senyawa tersebut semakin beracun bagi mikroba (Febriyati, Agusta dan Musdja, 2010)



Gambar 2. Zona hambat ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae*.

Keterangan : a. Kertas cakram
 b. Zona hambat ekstrak
 c. Aktivitas bakteri

Sudrajat dkk. (2012) senyawa saponin bekerja sebagai antimikroba dengan cara merusak membran sitoplasma dan membran sel, sedangkan senyawa flavonoid akan merusak dinding sel dari bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino kemudian akan bereaksi dengan gugus alkohol dari senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan menyebabkan senyawa tersebut dapat masuk kedalam inti sel bakteri. Selanjutnya senyawa ini akan bereaksi dengan DNA pada inti sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid akan terjadi reaksi sehingga inti sel bakteri akan mengalami lisis.

Tanin merupakan poliflafonoid yang biasanya digunakan sebagai bahan penyegar, mempunyai sifat antimikroba terhadap khamir, bakteri dan kapang. Kemampuan tanin sebagai bahan antimikroba diduga karena tannin akan berkaitan dengan dinding sel bakteri, sehingga akan menginaktifkan kemampuan menempel bakteri, menghambat pertumbuhan, aktivitas enzim protease dan dapat membentuk ikatan kompleks dengan polisakarida (Kursia dkk., 2016).

Lama dan Suhu Penyimpanan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) terhadap Bakteri *Streptococcus agalactiae*.

. Uji daya hambat ekstrak daun sirih hijau dengan lama penyimpanan memiliki perbedaan sangat signifikan ($P < 0,01$), namun suhu penyimpanan ekstrak daun sirih hijau tidak berpengaruh nyata ($P > 0,01$) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae*. kedua faktor yaitu lama dan suhu pada penyimpanan merupakan penyebab kerusakan pada bahan tersebut, tetapi hal ini dapat diketahui batas-batasnya yang dapat meminimalkan kerusakan terutama senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya (Safaryani, Haryanti dan Hastuti, 2007).

Tabel 2. Rataan Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) pada Bakteri *Streptococcus agalactiae*

Perlakuan	Rataan Zona Hambat(mm) ± SD	Keterangan
P1R1 (hari 1 suhu ruang)	4,32 ± 0,57 ^a	Sedang
P2R1 (hari 2 suhu ruang)	6,00 ± 1,46 ^a	Sedang
P3R1 (hari 3 suhu ruang)	4,80 ± 1,07 ^a	Sedang
P1R2 (hari 1 suhu refrigerator)	4,40 ± 0,92 ^a	Sedang
P2R2 (hari 2 suhu refrigerator)	7,08 ± 1,72 ^b	Kuat
P3R2 (hari 3 suhu refrigerator)	4,10 ± 1,10 ^a	Sedang

Keterangan :Notasi yang berbeda (a-b) pada kolom yang sama perlakuan lama simpan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

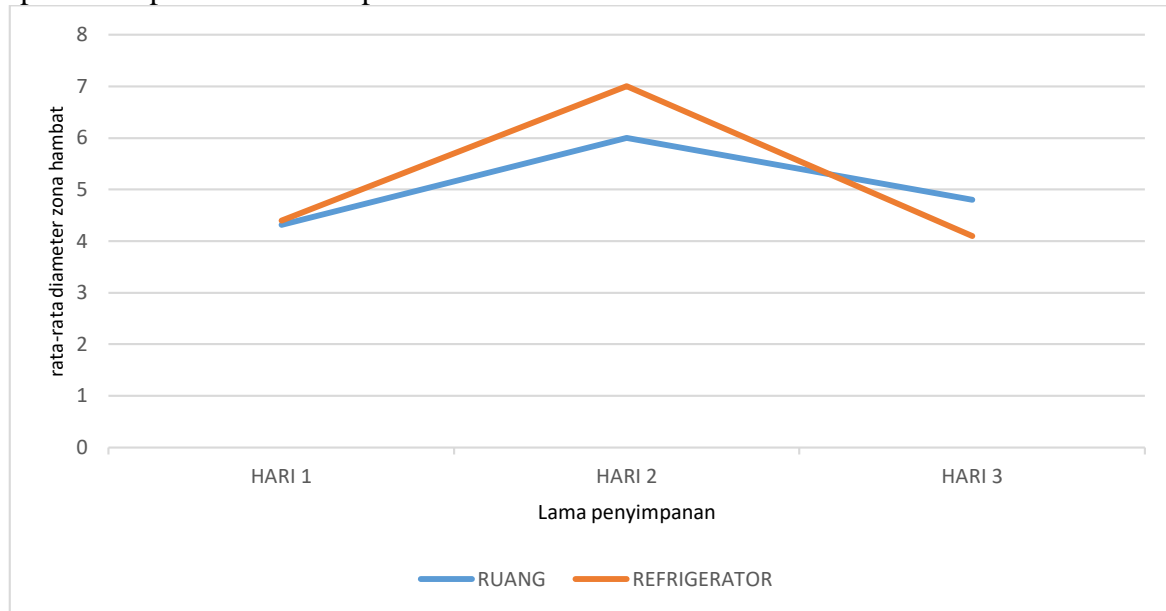
Hasil penelitian pada Tabel 2. menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae*. Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama penyimpanan pada ekstrak daun sirih hijau berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap daya hambat bakteri *Streptococcus agalactiae*. Penelitian ini bukan mencari perlakuan yang terbaik, tetapi mengetahui sampai kapan ekstrak daun sirih hijau dapat digunakan untuk pencegahan mastitis. Rata-rata zona hambat penyimpanan pada suhu ruang dan suhu *refrigerator* menunjukkan bahwa pada hari ke-3 sudah mengalami penurunan dalam menghambat bakteri *Streptococcus agalactiae*. Penurunan daya hambat ekstrak daun sirih hijau diduga ekstrak daun sirih

hijau juga mengalami penurunan kualitas yang disebabkan kerusakan dan berkurangnya senyawa antibakteri serta terkontaminasi mikroba seperti tumbuhnya khamir dan kapang. Penyimpanan ekstrak daun sirih hijau yang dilakukan selama 3 hari secara visual tidak terdapat adanya koloni bakteri atau jamur pada ekstrak yang disimpan pada suhu ruang maupun disuhu refrigerator. Penyimpanan pada suhu rendah dapat memperlambat pertumbuhan mikroba yang dapat menurunkan kualitas ekstrak atau kontaminasi terhadap mikroba seperti khamir, kapang dan bakteri (Suradi, 2012). Namun dari hasil analisis varian diketahui bahwa suhu tidak mempengaruhi ekstrak yaitu pada suhu ruang dan suhu refrigerator memiliki daya hambat yang tidak jauh berbeda.

Penyimpanan ekstrak pada penelitian ini dilakukan pada suhu ruang yaitu 26-28°C dan pada suhu refrigerator yaitu 3-5°C. Asgar dan Rahayu (2014) semakin rendah suhu penyimpanan, maka ada kecenderungan kadar air semakin besar yang disebabkan oleh pendinginan yang dapat memperlambat kecepatan reaksi-

reaksi metabolisme, dimana pada umumnya setiap penurunan suhu 8°C kecepatan reaksi akan berkurang menjadi setengahnya.

Grafik zona hambat ekstrak daun sirih hijau pelarut aquades dapat di lihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diameter zona hambat lama dan suhu penyimpanan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) Terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae*.

Hasil penelitian dilihat pada Gambar 3 daya hambat ekstrak daun sirih hijau yang disimpan pada suhu ruang maupun refrigerator bahwa pada hari ke-1 kehari ke-2 mengalami kenaikan daya hambat kemudian pada hari ke-3 mengalami penurunan. Hal ini diduga ekstrak daun sirih hijau masih mengalami proses ekstraksi zat yang belum aktif yang ada di dalam daun sehingga pada hari ke-2 meningkat dalam menghambat bakteri. Sedangkan penurunan pada hari ke-3 diduga ekstrak sudah mengalami penurunan kualitas yang disebabkan kerusakan dan kontaminan mikroba.

Penyimpanan ekstrak daun sirih hijau direkomendasikan hingga hari ke-2 karena kemampuan daya hambat sudah mengalami penurunan. Berdasarkan hasil analisis statistik bahwa lama penyimpanan berpengaruh sangat nyata terhadap ekstrak

daun sirih hijau ($P < 0,01$). Hal ini sesuai hipotesis, bahwa terdapat pengaruh lama simpan ekstrak daun sirih karena semakin menurunnya kemampuan daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae*. Lama penyimpanan dapat menurunkan efektifitas antibakteri dikarenakan penyimpanan ekstrak. Suradi (2012) semakin lama penyimpanan akan semakin banyak meningkatnya aktivitas mikroorganisme yang pada akhirnya mengakibatkan terjadinya pembusukan. Proses pembusukan akan diikuti dengan meningkatnya pH, keadaan ini akan diikuti pula dengan peningkatan pertumbuhan mikroorganisme. Pernyataan tersebut juga mendukung penelitian Dwiyanti dan Hati (2014) lama penyimpanan berpengaruh signifikan terhadap aktivitas antioksidan, semakin lama disimpan semakin menurunkan aktivitas antioksidannya

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Lama simpan ekstrak daun sirih hijau (*piper betle* L.) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *Streptococcus agalactiae*. Lama simpan 2 hari menghasilkan daya hambat lebih kuat.
2. Suhu penyimpanan ekstrak daun sirih hijau (*piper betle* L.) tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *Streptococcus agalactiae*.

SARAN

Saran dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dapat digunakan sebagai teat dipping untuk mencegah kejadian mastitis pada sapi perah dengan penyimpanan lebih dari 2 hari pada suhu refrigerator.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai penambahan lama penyimpanan untuk mengetahui batas penyimpanan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.).

DAFTAR PUSTAKA

- Asgar, A. dan ST. Rahayu. 2014. Pengaruh Suhu Penyimpanan dan Waktu Pengkondisian untuk Mempertahankan Kualitas Kentang Kultivar Margahayu. *Berita Biologi*. 13 (3) : 283-293.
- Ariyanti, N.K., I.B.G. Darmayasa dan S.K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis miller*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. XVI(1) : 1-4.
- Chandrasari, A, M. A. Romas, M. Hasbi, dan O. R. Astuti. 2012. Uji Daya Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum Ruiz & Pav.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia Coli* ATCC 11229 Dan *Candida Albicans* ATCC 10231

Secara In Vitro. *Biomedika*. 4 (1) : 9-15.

- Dwiyanti, G. dan H. Nurani. 2014. Aktivitas Antioksidan Teh Rosela (*Hibiscus sabdariffa*). *Pros. Sem. Nas. Sains dan Pen Sains*. 5(1): 536-541.
- Febriyati, A. Agusta dan M.Y. Musdja. 2010. Analisis Komponen Kimia Fraksi Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L.) dan Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Beberapa Jenis Bakteri Gram Positif. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Haque, A. S. M. T., J. M. Moon, P. S. Saravana, A. Tilahun and B. S. Chun. 2016. Composition Of as asarum heterotropoides var. Mandshuricum Radix Oil From Different Extraction Method and Activities Agains Human Body Odor-Producing Bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*. 813-821.
- Kursia, S., J. S. Lebang, B. Taebe, A. Burhan, W. O. R. Rahim dan Nursamsiar. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (*Paper betle* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermis*. *IJPST* 3(2): 72-77.
- Pan X., C. Fenqin, W. Tianxing, T. Honggang and Z. Zhanyu. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20 : 589-602.
- Poeloengan M., M.N. Susan dan Andriani. 2005. Efektivitas Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Mastitis Subklinis. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 2005.
- Prawira, M.Y., Sarwiyono dan P. Surjowardojo. 2013. Daya Hambat Dekok Daun Kersen (*Muntiga calabura* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Penyebab Penyakit Mastitis Pada

- Sapi Perah. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Safaryani, N., S. haryanti dan E. D. Hastuti.2007. Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Penurunan Kadar Vitami C Brokoli (*Brassica oleracea L*). Buletin Anatomi Dan Fisiologi 15(2):39-45
- Scadd, Jones and Chun. 2000. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. American Phytopathological Society Press. USA.
- Sholikhatin, E. Surwiyono dan P. Surjowardojo 2014. Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Streptococcus agalactiae* Pada Sapi Perah di Daerah Ngantang, Malang. Respository. Fakultas Peternakan. Universitas
- Sugiri, Y.D dan A. Anri. 2010. Prevalensi Patogen Penyebab Mastitis Subklinis (*Staphylococcus Aureus* dan *Streptococcus agalactiae*) dan Patogen Penyebab Mastitis Subklinis Lainnya pada Peternak Skala Kecil dan Menengah di Beberapa Sentra Peternakan Sapi Perah di Pulau Jawa. Balai Pengujian dan Penyidikan Penyakit Hewan dan Kesmavet (BP3HK) Cikole Lembang Kab. Bandung Barat, Jawa Barat, Indonesia.
- Suradi, K.2012. Pengaruh Lama Penyimpanan pada Suhu Ruang terhadap Perubahan Nilai Ph, TVB dan Total Bakteri Daging Kerbau. Jurnal Ilmu Ternak. 12(2):9 -12.