

Keberkesanan Ekstrak Daun Sirih sebagai Ejen Antikulat

(The Effectiveness of Betel Leaves Extract as Antifungal Agent)

Emi Norzehan Mohamad Mahbob, Nurul Huda Musa, Zaidatul Shakila Mohamad Ashari, Fathiah Abdullah dan Siti Hajar Noor Alshuridin
Fakulti Sains Gunaan, Universiti Teknologi MARA, Cawangan Perak, Kampus Tapah, Tapah Road, 35400 Perak, MALAYSIA.

E-mel: emino593@uitm.edu.my

Tarikh terima: 15 Februari 2019

Tarikh diluluskan: 25 Jun 2019

ABSTRAK

*Sirih atau nama saintifiknya, Piper betle, adalah pokok berubat, yang telah dilaporkan mempunyai pelbagai aktiviti farmakologi seperti nyah kulat, nyah bakteria, antioksidan, anti karsinogenik, dan anti keradangan. Kajian ini dijalankan untuk melihat aktiviti nyah kulat ekstrak etanol daun sirih. Daun sirih yang matang dikumpulkan dan diproses menjadi serbuk halus sebelum diekstrak menggunakan etanol. Bahagian pertama kajian berkenaan pengujian aktiviti antikulat ekstrak etanol sirih menggunakan kaedah resapan cakera pada empat kepekatan yang berbeza (5, 25, 50, 100 mg/mL) terhadap tiga jenis kulat yang telah dipencilkan dari permukaan makmal. Sensitiviti kulat terhadap ekstrak etanol telah ditentukan dengan mengukur saiz zon perencatan. Keputusan menunjukkan ekstrak dengan kepekatan tertinggi (100 mg/mL) merencat pertumbuhan ketiga-tiga jenis kulat yang dipencilkan dengan nilai zon perencatan 0.97 cm (*Yis*), 0.83 cm (*Aspergillus sp.*) dan 0.77 cm untuk *Penicillium sp.* Ekstrak dengan kepekatan yang lebih rendah (5, 25 and 50 mg/mL) tidak menunjukkan sebarang perencatan ke atas ketiga-tiga jenis kulat kecuali *Penicillium sp.* yang menunjukkan nilai zon perencatan 0.53 cm pada kepekatan 50 mg/mL. Bahagian kedua kajian melibatkan penilaian kiraan kulat menggunakan dos efektif ekstrak etanol sirih yang diperolehi daripada bahagian pertama iaitu 100 mg/mL. Hasil kajian mendapati tiada sebarang pertumbuhan kulat ke atas wayar mikroskop yang telah disembur dengan ekstrak etanol sirih berkepekatan 100 mg/mL pada hari pertama, keempat dan ketujuh. Bagi*

wayar yang disembur dengan etanol 70%, nilai purata kiraan kulat adalah sama pada hari pertama dan ketiga iaitu 5.6×10^2 cfu/mL dan meningkat pada hari ketujuh kepada 9.2×10^2 cfu/mL. Kesimpulannya, ekstrak daun sirih menunjukkan keupayaan perencat kulat, yang seterusnya menyokong fungsinya sebagai ejen antikulat yang selamat, senang diperolehi dan tiada tindak balas berbalik.

Kata Kunci: *Piper betle*, ekstrak etanol, anti kulat, resapan cakera

ABSTRACT

Piper betle (sirih) is a medicinal plant that has been reported for various pharmacological activities such as antifungal, antibacterial, antioxidant, anticarcinogenic and, anti-inflammatory. The research was carried out to study the antifungal activity of ethanolic extract from *P. betle* leaves. Matured leaves of *P. betle* were collected and processed to a fine powder before being extracted using ethanol. The first part of the research involved evaluation of antifungal activity of the ethanolic extracts using disk diffusion method at four different concentrations (5, 25, 50, 100 mg/mL) against 3 types of fungi isolated from laboratory surfaces. The sensitivities of the fungal towards the ethanolic extracts were determined by measuring the size of inhibitory zones. Results showed that highest concentration of the extract (100 mg/mL) inhibited fungal growth for all three types of isolated fungi with 0.97, 0.83, and 0.77 cm zone of inhibition for yeast, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.*, respectively. Low concentrations (5, 25 and 50 mg/mL) did not inhibit the fungal growth except for *Penicillium sp.* that showed zone of inhibition, 0.53 cm at concentration of 50 mg/mL. The second part of the research involved evaluation of fungal count utilizing effective dose of betel leaves ethanolic extract obtained from the first part of this research which is 100 mg/mL. This study found that no fungal growth on the microscope wire that has been sprayed with betel leaves ethanolic extract on Day 1, Day 4 and Day 7. For wire that been sprayed with ethanol 70%, the average of fungal count was same on Day 1 and Day 4 (5.6×10^2 cfu/mL) but increased to 9.2×10^2 cfu/mL on Day 7. In conclusion, betel leaves extract exhibit fungicidal properties that support their use as antifungal agents from natural products which are safe, easily available with no adverse effects.

Keywords: *Piper betle*, ethanolic extract, antifungal, disc diffusion

PENGENALAN

Persekitaran dalaman memainkan peranan yang penting dalam kesihatan manusia. Ruang dalaman tercemar menyumbang kesan bahaya kepada kesihatan yang boleh menyebabkan alahan, jangkitan serta toksik. Kebanyakan pencemaran ruang dalaman berpunca daripada kesan bahaya yang tersebar oleh ejen bukan biologi dan ejen biologi termasuk kulat (Khan & Karuppaiyil, 2012). Kulat biasa dijumpai di persekitaran dalaman dan luaran termasuk di hospital, bilik bersih, dan kemudahan-kemudahan farmaseutikal seperti makmal dan peralatan. Hampir 10% manusia daripada populasi dunia mempunyai alahan terhadap kulat (Yassin & Almoqattee, 2010).

Kulat adalah kumpulan organisma yang mempunyai kepelbagaian biologi yang tinggi. Ia memainkan pelbagai peranan dalam hidupan semula jadi, ekonomi, sains persekitaran dan makanan, serta kesihatan. Selain daripada itu, ia juga berperanan dalam penguraian bahan organik dan elemen kitar semula (Falandysz & Treu, 2017).

Kebelakangan ini, terdapat peningkatan dalam pencarian ejen nyah kulat yang baru. Walau bagaimanapun, disebabkan kebanyakan antikulat yang sedia ada di pasaran mendatangkan kesan sampingan yang negatif, sangat toksik, serta tidak berkesan, telah menyebabkan strategi terapeutik menjadi kurang berjaya (Pawar *et al.*, 2017). Oleh itu, adalah amat perlu untuk mencari ejen nyah kulat yang lebih efektif dan kurang toksik, yang mampu untuk mengatasi kekurangan-kekurangan yang dinyatakan (Ali *et al.*, 2010). Banyak tumbuh-tumbuhan kini telah dikaji kerana potensi nilai ubatannya. Tambahan, beberapa kajian mencadangkan terdapat spesis tumbuh-tumbuhan yang mempunyai sebatian berpotensi nyah mikrob (Pawar *et al.*, 2017).

Piper betle Linn. (*Piperaceae*) atau lebih dikenali sebagai sirih adalah merupakan pokok berubat yang telah dilaporkan mempunyai pelbagai aktiviti farmakologi termasuklah antikulat, antibakteria, antioksidan, antikarsinogenik, dan juga anti keradangan (Ali *et al.*, 2010). Minyak pati daripada daun sirih mempunyai sebatian yang dipanggil sebagai Eugenol, yang telah dikenal pasti mempunyai sifat antikulat (Prakash *et al.*, 2010).

Oleh itu, kajian ini telah dijalankan dengan tujuan untuk menentukan keberkesanan ekstrak etanol daun sirih secara *in vitro* sebagai ejen antikulat ke atas pertumbuhan kulat yang telah diisolasi.

METODOLOGI

Penyediaan Media dan Larutan

Kesemua media dan larutan telah diautoklafkan pada suhu 121°C selama 15 minit. Media dan larutan yang telah diautoklafkan diletakkan dalam keadaan aseptik iaitu di dalam kabinet aliran udara laminar.

Penyediaan Agar Kentang Dekstrosa (PDA) untuk Pertumbuhan Kulat

Agar kentang dekstrosa merupakan medium yang kebiasaannya digunakan bagi tujuan identifikasi, pertumbuhan dan kiraan yis dan kulapuk daripada spesimen klinikal, makanan dan produk tenusu. Dalam kajian ini, sebanyak 39 g serbuk PDA telah dilarutkan ke dalam 1000 mL air suling dan dimasak sehingga didih. Larutan disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Media kemudiannya dituang ke dalam piring petri secara aseptik dan dibiarkan mengeras (Chua & Aminah, 2011).

Bahagian 1

Sampel Herba

Daun sirih yang matang dikumpulkan, dibersihkan dan dikeringkan dalam ketuhar selama dua hari pada suhu 42°C, dan kemudiannya dikisar menggunakan pengisar kering menjadi serbuk halus mengikut Syahidah *et al.*, (2017) dengan beberapa pengubahsuaian.

Pengekstrakan Daun Sirih

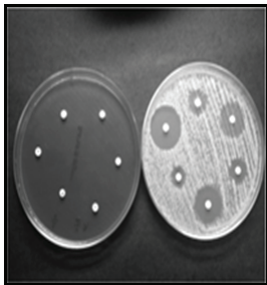
10 g serbuk daun sirih direndamkan ke dalam 50 mL etanol (1:5) dan dikacau larut menggunakan penggoyang auto selama 72 jam. Larutan kemudiannya disimpan pada suhu bilik selama 24 jam dan ditapis menggunakan kertas penapis Whatman (Rajah 1). Hasil tapisan dipekatkan menggunakan rotavap.



Daun sirih dikumpul, dibersihkan dan dikeringkan.



Daun sirih diekstrak menggunakan pelarut etanol.



Piring petri diinkubasikan selama tiga hari sebelum zon perencatan diukur.



Tiga jenis kulat yang berbeza dikulturkan pada agar kentang dekstrosa (PDA).

Rajah 1: Carta aliran kaedah penentuan dos efektif ekstrak etanol daun sirih

Pengujian Mikroorganisma

Tiga jenis kulat yang tumbuh di permukaan meja makmal telah dikultur pada agar kentang dekstrosa (PDA) dan dikenal pasti sebagai Jenis A, B dan C berdasarkan pemerhatian makroskopik.

Ujian Penyaringan Antikulat

Ujian penyaringan antikulat ini diadaptasi daripada kaedah Gakuubi, Wagacha, Dossaji, dan Wanzala (2016) dengan beberapa pengubahsuaian. Larutan spora (1×10^6 spora/mL) disebar ke atas agar. Dengan menggunakan kaedah peresapan cakera, ekstrak daun sirih ditambahkan ke atas cakera pada empat kepekatan yang berbeza (5, 25, 50, 100 mg/mL). Piring diinkubasikan pada 28°C selama tiga hari dan zon perencatan diukur. Zon perencatan yang diukur telah dibandingkan dengan zon kawalan negatif (NC).

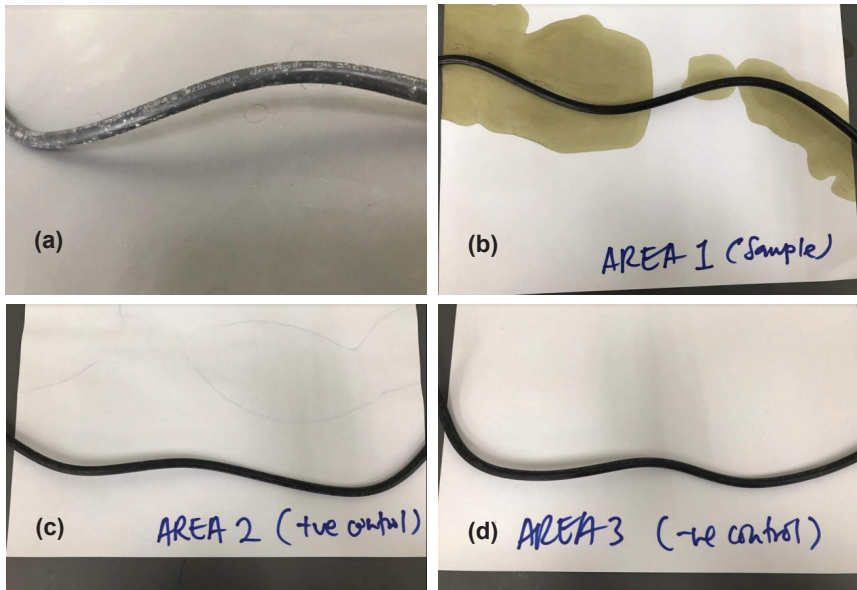
NC - Kawalan negatif di mana cakera adalah tanpa ekstrak daun sirih dan hanya mengandungi pelarut etanol sahaja

Ujian ini juga dijalankan bagi tujuan penentuan dos optima untuk ujikaji yang seterusnya.

Bahagian 2

Persampelan

Putik kapas yang steril telah digunakan untuk mengesat spesimen di permukaan wayar mikroskop di salah sebuah Makmal Biologi, Fakulti Sains Gunaan, UiTM Cawangan Perak Kampus Tapah (Rajah 2). Wayar tersebut telah dibahagikan kepada tiga bahagian dengan setiap bahagian berukuran 29.7 cm panjang. Terdapat 3 perlakuan: 1. Ekstrak sirih berkepekatan 100 mg/mL, 2. Kawalan positif (larutan etanol 70%), dan 3. Kawalan negatif (tidak mempunyai sebarang penambahan ekstrak/etanol). Spesimen kemudiannya disebar ke atas medium PDA. Peralatan yang digunakan untuk persampelan telah terlebih dahulu diautoklaf.



Rajah 2: Perlakuan ke atas wayar mikroskop (a) Sebelum perlakuan, (b) Semburan ekstrak etanol sirih berkepekatan 100 mg/mL, (c) Kawalan positif (larutan etanol 70%), dan (d) Kawalan negatif (tidak mempunyai sebarang penambahan ekstrak/etanol)

Analisis Mikrobiologi

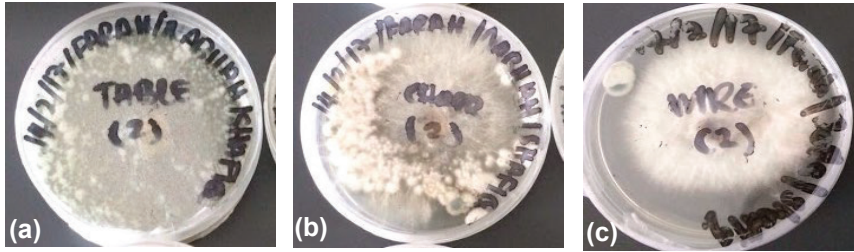
Pencairan bersiri daripada larutan stok telah disediakan dengan melarutkan 1 mL sampel dengan 9 mL larutan garam steril. Sebanyak 100 mL daripada pencairan terakhir diplatkan ke atas piring PDA secara triplikat melalui kaedah piring sebaran. Kultur disebar dengan seragam pada permukaan agar tersebut dengan menggunakan rod kaca bentuk L yang steril. Piring agar telah dieram untuk tempoh masa tiga hari pada suhu malar, 28°C.

Kiraan Koloni Kulat

Selepas tempoh eraman, koloni kulat dicairkan menggunakan 10 mL larutan Tween 80 dan spora kulat dikira menggunakan hemasitometer. Julat kiraan koloni yang bersesuaian adalah antara 25-250. Kiraan akan menjadi terlalu banyak untuk dikira sekiranya bilangan koloni melebihi 250 (Wendy *et.al*, 2014).

KEBERHASILAN PROJEK

Berdasarkan pemerhatian secara makroskopik terhadap bentuk dan warna koloni, tiga jenis kulat yang tumbuh di permukaan PDA telah dikenalpasti sebagai yis, *Aspergillus sp.* dan *Penicillium sp.* (Rajah 3, Jadual 1).



Rajah 3: Kulat yang dipencilkan melalui ujian pengesanan kehadiran mikroorganisma (a) Yis, (b) *Aspergillus sp.*, dan (c) *Penicillium sp.*

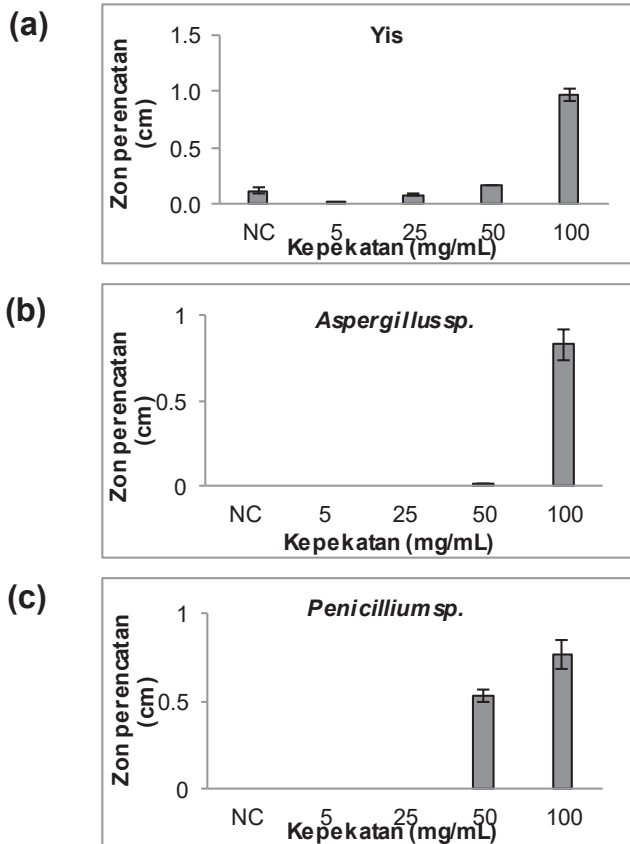
Jadual 1: Morfologi koloni kultur kulat

Kultur kulat	Pemerhatian makroskopik koloni				Genus kulat
	Tekstur	Warna permukaan	Warna tapak	Zon	
Jenis A	Berkrim	Putih berkrim	Putih berkrim	Radius berkeringat	Yis
Jenis B	Baldu	Putih berspora hitam	Kekuningan	Radius berkeringat berterabur	<i>Aspergillus sp.</i>
Jenis C	Baldu dan berserbuk	Putih	Putih	Radius berkeringat	<i>Penicillium sp.</i>

Kesan ekstrak etanol daun sirih (*P. betle*) terhadap pertumbuhan kulat dilihat dengan mengukur zon perencatan yang terbentuk daripada setiap ekstrak daun sirih. Daya perencatan yang dihasilkan bergantung kepada ekstrak yang diberikan dan juga kekekatannya. Diameter zon rencatan yang melebihi 7 mm menandakan ekstrak adalah aktif (Chua & Aminah, 2010). Dalam kajian ini, aktiviti nyah kulat oleh ekstrak etanol daun sirih ke atas yis, *Aspergillus sp.* dan *Penicillium sp.* pada empat kepekatan yang berbeza (5, 25, 50, 100 mg/mL) telah dijalankan menggunakan kaedah resapan cakera.

Hasil pemerhatian (Rajah 4) menunjukkan ekstrak etanol daun sirih dengan kepekatan 100 mg/mL mempamerkan aktiviti antikulat yang paling

efektif ke atas semua kultur kulat yang diuji. Aktiviti antikulat yang tertinggi bagi kepekatan 100 mg/mL adalah ke atas yis dengan zon perencatan sebanyak 0.97 cm, diikuti *Aspergillus sp.* (0.83 cm) dan kemudian, *Penicillium sp.* (0.77 cm).



Rajah 4: Zon perencatan oleh ekstrak daun pada empat kepekatan yang berbeza (5, 25, 50, 100 mg/mL) ke atas (a) yis, (b) *Aspergillus sp.* dan (c) *Penicillium sp.* Data diwakili sebagai min \pm sisihan piawai ($n=3$). Perbezaan yang signifikan ($p<0.05$) ditunjukkan apabila dibandingkan dengan kawalan negatif (NC)

Aktiviti antikulat bagi ekstrak etanol daun sirih pada kepekatan 50 mg/mL adalah signifikan ke atas *Penicillium sp.* dengan zon perencatan 0.53 cm. Walau bagaimanapun, tiada kesan perencatan ditunjukkan oleh kawalan negatif, ekstrak dengan kepekatan lima dan juga 25 mg/mL ke

atas *Aspergillus sp.* mahupun *Penicillium sp.* Secara umumnya, diameter zon perencatan semakin luas dengan meningkatnya kepekatan ekstrak yang digunakan.

Di atas kesedaran dalam meningkatkan kualiti udara di ruangan tempat kerja seperti ruang pejabat, bilik kuliah dan makmal serta meminimumkan potensi dedahan terhadap bahan pencemar bioaerosol, pemulihan terhadap pencemaran bakteria dan kulat adalah perlu. Salah satu cara proses pemulihan adalah dengan menggunakan produk antikulat terhadap kawasan yang tercemar (Rogawansamy *et.al*, 2015; Sytty *et.al*, 2015). Melalui ujian penyaringan antikulat, kepekatan ekstrak etanol sirih 100 mg/mL telah diangkat sebagai dos optima dalam merencat pertumbuhan kulat. Dos tersebut telah diaplikasikan ke atas wayar mikroskop (sepanjang 29.7 cm) (Rajah 2) di salah sebuah Makmal Biologi, Fakulti Sains Gunaan, UiTM Cawangan Perak Kampus Tapah. Pola pertumbuhan kulat yang tumbuh di atas wayar tersebut telah diperhatikan pada hari pertama, keempat dan ketujuh dengan cara mengira jumlah koloni (N). Jumlah kiraan koloni (N) adalah dalam unit pembentukan koloni (cfu) per mL sampel. Purata unit pembentukan koloni (cfu/mL) spesis kulat bagi tiga perlakuan yang berbeza adalah seperti dalam Jadual 2.

Jadual 2: Kiraan kulat bagi tiga perlakuan berbeza ke atas wayar mikroskop pada hari pertama, keempat dan ketujuh

Perlakuan	Bilangan koloni (cfu/mL)		
	Hari Pertama	Hari Keempat	Hari Ketujuh
Ekstrak etanol sirih berkepekatan 100 mg/mL	Tiada pertumbuhan	Tiada pertumbuhan	Tiada pertumbuhan
Etanol 70%	5.6×10^2	5.6×10^2	9.2×10^2
Tanpa ekstrak/ etanol	18.5×10^2	Terlalu banyak untuk dikira	Terlalu banyak untuk dikira

Pemerhatian menunjukkan tiada sebarang pertumbuhan kulat ke atas wayar mikroskop yang telah disembur dengan ekstrak etanol sirih berkepekatan 100 mg/mL pada hari pertama, keempat dan ketujuh (Rajah 2, Jadual 2). Ini menunjukkan ekstrak etanol sirih berkepekatan dalam merencat atau menanggukuhkan pertumbuhan kulat pada permukaan yang diuji. Menurut Wendy *et al.* (2014) (seperti yang dipetik daripada

Arambewela *et al.*, 2005), ekstrak etanol daun sirih dilaporkan mempunyai sekurang-kurangnya satu sebatian pemusnah kulat yang mempunyai aktiviti antikulat terhadap *Cladosporium* sp. Ekstrak sirih juga mempunyai aktiviti antikulat terhadap *Candida* species, *Aspergillus* species, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Colletotrichum capsici*, dan *Pyricularia oryzae* (Singburaudom, 2015; Rabiatul Adawiyah *et.al*, 2018).

Nilai purata kiraan kulat pada wayar yang disembur dengan etanol 70% didapati sama pada hari pertama dan keempat iaitu 5.6×10^2 cfu/mL dan meningkat pada hari ketujuh kepada 9.2×10^2 cfu/mL. Seperti yang dijangka, pertumbuhan kulat adalah sangat banyak pada wayar yang tidak diperlakukan dengan sebarang ekstrak atau etanol. Etanol telah digunakan sebagai kawalan positif kerana keupayaannya yang menyahjangkit dan telah dilaporkan berkesan dalam memusnahkan atau merencat pertumbuhan atau aktiviti virus, bakteria dan kulat pada julat kepekatan 50%-90% (Rogawansamy *et al.*, 2015). Etanol bertindak sebagai ejen yang memberikan tekanan pada membran sel kulat dengan cara menyahhaslikan protein, dan merencat pengambilan pelbagai nutrisi seperti glukosa dan ion ammonium oleh kulat (Dao & Dantigny, 2011). Walau bagaimanapun, dalam kajian ini, pertumbuhan kulat masih lagi berlaku pada wayar yang disembur dengan larutan etanol 70% (Jadual 2). Ini adalah kerana terdapat kajian yang menunjukkan etanol pada kepekatan 70% adalah tidak efektif sebagai ejen antikulat dalam menentang kebanyakan genera kulat bawaan udara (Rogawansamy *et al.*, 2015).

RUMUSAN

Kajian ini berkeupayaan untuk dikomersialkan berikutan hasil positif yang telah ditunjukkan oleh ekstrak etanol daun sirih terutamanya pada kepekatan optimum 100 mg/ml dalam merencatkan pertumbuhan beberapa jenis kulat. Hasil dapatan menyokong kegunaan daun sirih sebagai ejen antikulat dari sumber hasilan semula jadi yang selamat, senang diperolehi serta tidak mempunyai kesan sampingan yang buruk. Sehubungan itu, idea untuk menggunakan ekstrak etanol daun sirih sebagai ejen antikulat boleh dikembangkan lagi dengan mewujudkan pelbagai barangan berasaskan ekstrak sirih kerana umum mengetahui sirih memiliki banyak manfaat terutamanya kesihatan.

PENGHARGAAN

Pengarang ingin melahirkan ucapan jutaan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI), Universiti Teknologi MARA dan Institut Pengurusan Penyelidikan dan Inovasi (IRMI) atas geran penyelidikan iRAGS (600-RMI/DANA 5/3/IRAGS (12/2015).

PRA SYARAT

An International Innovation, Invention & Design Competition & Conference (ICON) 2017. Pingat Gangsa.

RUJUKAN

- Ali, I., Khan, F. G., Suri, K. A., Gupta, B. D., Satti, N. K., Dutt, P. & Khan, I. A. (2010). In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 9(1), 7.
- Pin, C. H. & Abdullah, A. (2011). Determination of antimicrobial activities of Kacangma Herb *Leonurus sibiricus*. *Sains Malaysiana*, 40(8), 879-885.
- Dao, T. & Dantigny, P. (2011). Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control*, 22(3-4), 360-368.
- Falandysz, J. & Treu, R. (2017). Fungi and environmental pollution. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 52(3).
- Gakuubi, M. M., Wagacha, J. M., Dossaji, S. F. & Wanzala, W. (2016). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected phytopathogenic fungi. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(3), 16-26.
- Khan, A. H. & Karuppayil, S. M. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi journal of biological*

- sciences*, 19(4), 405-426.
- Pawar, S., Kalyankar, V., Dhamangaonkar, B., Dagade, S. & Waghmode, S. (2017). Biochemical profiling of antifungal activity of betel leaf (*Piper betle* L.) extract and its significance in traditional medicine. *J Adv Res Biotechnol*, 2, 1-4.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P. K. & Dubey, N. K. (2010). Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 114-119.
- Umar, R. A., Zahary, M. N., Rohin, M. A. K. & Ismail, S. (2018). Chemical composition and the potential biological activities of *Piper betle*—A Review. *Malaysian Journal of Applied Sciences*, 3(1), 1-8.
- Rogawansamy, S., Gaskin, S., Taylor, M. & Pisaniello, D. (2015). An evaluation of antifungal agents for the treatment of fungal contamination in indoor air environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(6), 6319-6332.
- Singburaudom, N. (2015). Hydroxychavicol from *Piper betel* leave is an antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Biopesticides*, 8(2), 82.
- Syahidah, A., Saad, C. R., Hassan, M. D., Rukayadi, Y., Norazian, M. H. & Kamarudin, M. S. (2017). Phytochemical analysis, identification and quantification of antibacterial active compounds in betel leaves, *Piper betle* methanolic extract. *Pak J Biol Sci*, 20, 70-81.
- Mazlan, S. M., Hamzah, A. & Mahmud, M. (2017). Kualiti udara dalam bangunan di bangunan Sains Biologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (Indoor air quality: The case of the Biology Sciences Building, Faculty of Science and Technology, National University of Malaysia). *Geografia-Malaysian Journal of Society and Space*, 11(1).

Wendy Voon, W. Y., Ghali, N. A., Rukayadi, Y. & Meor Hussin, A. S. (2014). Application of betel leaves (*Piper betle* L.) extract for preservation of homemade chili bo. *International Food Research Journal*, 21(6).

Yassin, M. F. & Almouqatea, S. (2010). Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(3), 535-544.