

Phytochemical Analysis of Forest Betel Leaves (*Piper aduncum* L.) Using GC-MS and Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus*

Yoseph Putra Albertino Mawo*, Muntasir, Cahyani Purnasari, Muhajirin Dean

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Indonesia;

Article History

Received : July 05th, 2026

Revised : July 16th, 2026

Accepted : July 25th, 2026

*Corresponding Author:

Yoseph Putra Albertino Mawo, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Indonesia; Email: mawoyoseph7@gmail.com

Abstract: Skin infections due to *Staphylococcus aureus* continue to be a major health issue, particularly with the increase in antibiotic resistance. Traditionally, forest betel leaves (*Piper aduncum* L.) have been utilized for treating wounds and skin ailments. The goal of this research is to explore the chemical components of a 95% ethanol extract of *Piper aduncum* L. leaves through GC-MS and to evaluate its effectiveness against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. This research was carried out experimentally using a design featuring a control group. The extract was prepared via maceration with 95% ethanol. Chemical analysis was conducted using GC-MS, while the antibacterial properties were examined through the disk diffusion technique at concentrations of 0.5% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 5% w/v, and 10% w/v. Data analysis was performed using one-way ANOVA along with Tukey's post hoc test. The yield from the extract was 6.42%. The GC-MS analysis identified compounds including hexadecanoic acid, phytol, and piperlonguminine. The extract demonstrated inhibition of *Staphylococcus aureus* growth at all concentrations tested, with inhibition zones measuring from 6.65 to 12.72 mm. The statistical analysis indicated significant differences between the treatment groups ($p < 0.001$). In conclusion, the 95% ethanol extract of wild betel leaf (*Piper aduncum* L.) contains bioactive compounds and shows antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Antibacterial; GC-MS; *Staphylococcus aureus*; *Piper aduncum* L.

Pendahuluan

Infeksi luka kulit merupakan masalah kesehatan yang signifikan. Bakteri umum yang bertanggung jawab atas infeksi ini adalah *Staphylococcus aureus*, bakteri jenis Gram-positif yang biasanya berada di permukaan kulit dan di dalam rongga hidung manusia (Fitriana & Mukhlisah, 2024). Di negara berkembang, termasuk Indonesia, penduduk paling sering mengalami penyakit infeksi akibat *S. aureus*, yang dapat diperoleh baik dari komunitas maupun dari lingkungan nosokomial (Khairunnisa *et al.*, 2023). Infeksi oleh bakteri ini umumnya ditandai dengan peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses (Hanina *et al.*, 2022) serta dapat menimbulkan berbagai penyakit

seperti bisul, jerawat, infeksi luka, dan impetigo (Salim *et al.*, 2023)

Selain menyebabkan infeksi di kulit, masalah lain yang dihadapi adalah munculnya resistensi pada pengobatan akibat infeksi *S. aureus*. Resistensi ini terjadi karena penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak rasional sehingga muncul strain resisten yang mempersulit pengobatan. Sekitar 40% bakteri *S. aureus* yang ditemukan di rumah sakit diketahui kebal terhadap berbagai bentuk antibiotik β -laktam, termasuk penisilin, metisilin, sefazolin, seftarolin, dan seftobiprol (Suyasa, 2020; Lade & Kim, 2023). Kondisi ini semakin mengkhawatirkan saat *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa pengembangan antibiotik baru saat ini tidak sebanding dengan peningkatan kasus resistensi,

sehingga pilihan terapi yang efektif semakin terbatas (World Health Organization, 2021).

Berdasarkan data oleh WHO *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) di tahun 2022 untuk Asia Tenggara, prevalensi infeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) di 11 negara berkisar antara 20 hingga 30% (Farook *et al.*, 2022). Untuk Indonesia data dari Perhimpunan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik Indonesia (PAMKI), prevalensi MRSA mencapai 33% dari total 3411 kasus (Perhimpunan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik Indonesia (PAMKI), 2024).

Kasus resistensi yang tinggi tersebut menunjukkan urgensi penggunaan bahan alami sebagai agen antibakteri, menjadi alternatif untuk dikembangkan sebagai bahan obat, yang didukung oleh keberagaman potensi bahan alam di Indonesia (Amir & Abna, 2022). Salah satu komponen alami yang dapat bertindak sebagai agen antibakteri adalah daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) (Made *et al.*, 2024). Secara etnobotani sirih hutan, khususnya di Kecamatan Soa, Kabupaten Ngada, NTT, digunakan untuk pengobatan peradangan, luka, dan infeksi kulit, dengan cara menghancurkan daunnya lalu ditempelkan langsung pada area kulit yang terluka. Efek antibakteri ini diduga berasal dari senyawa fenilpropanoid yang merupakan komponen senyawa terbanyak dalam daun sirih hutan. Senyawa tersebut terbukti berperan dalam aktivitas antibakteri terhadap penyebab infeksi kulit, termasuk bakteri nosokomial seperti *S. aureus* (Duro *et al.*, 2021).

Mengingat potensi efektivitas antibakteri dari zat-zat ini, pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi sangat penting karena dapat memengaruhi jenis dan kuantitas senyawa aktif yang secara efektif terkumpul, yang pada akhirnya berdampak pada kekuatan penghambatan terhadap bakteri *S. aureus*. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wulandari dan Padang (2023), ekstrak etanol 70% dari daun *Piper aduncum* terbukti menunjukkan sifat antibakteri terhadap *S. aureus*, dengan radius penghambatan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, yaitu 10,2 mm (25%), 12,3 mm (50%), 14,6 mm (75%), dan mencapai 16,8 mm (100%) (Sartika *et al.*, 2025). Kemudian berdasarkan penelitian Abreu *et al.* (2015), ekstrak yang terbuat dari

etanol 90% dari daun *Piper aduncum*. Ossonum pada konsentrasi rendah 1 mg/mL (0,1%) menunjukkan efek antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923, dengan mengukur zona inhibisi berdiameter 10 mm (Abreu, 2015).

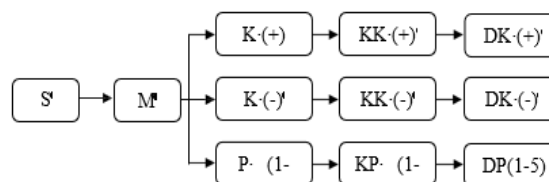
Peningkatan konsentrasi etanol dalam proses ekstraksi dapat meningkatkan kemampuan pelarut dalam melarutkan senyawa aktif yang bersifat kurang polar, sehingga kandungan metabolit antibakteri dalam ekstrak berpotensi lebih tinggi dan menghasilkan daya hambat yang lebih optimal terhadap bakteri uji. Atas dasar pertimbangan tersebut, peneliti memilih pelarut etanol 95% sebagai pelarut ekstraksi dengan harapan dapat mengekstraksi senyawa aktif yang lebih maksimal serta meningkatkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.

Selain itu, hingga saat ini belum tersedia data mengenai profil senyawa volatil dan semi-volatil daun sirih hutan asal Nusa Tenggara Timur (NTT) yang dianalisis menggunakan GC-MS. Oleh sebab itu, eksplorasi antibakteri alami dari ekstrak etanol 95% daun sirih hutan menjadi penting, sehingga penulis tertarik untuk menganalisis profil fitokimia ekstrak daun sirih hutan dan aktivitas antibakterinya terhadap pertumbuhan *S. aureus*.

Bahan dan Metode

Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian *true experimental control group design*. Jenis penelitian ini dipilih karena mampu memastikan hubungan sebab-akibat secara valid antara pemberian ekstrak dan respon pertumbuhan *S. aureus*, sekaligus meningkatkan validitas internal dan meminimalkan bias, untuk memastikan perbedaan zona hambat terjadi akibat perlakuan, bukan faktor lain (Selvira & Albina, 2025; Balouri *et al.*, 2016).



Gambar 1. Rancangan Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian bertempat di UPT Laboratorium Herbal Media Medica Batu, Laboratorium FMIPA Universitas Widya Mandira, Lembaga Ilmu Hayati, Teknik, dan Rekayasa (LIHTR) Universitas Airlangga, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana. Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Januari 2026 sampai Mei 2026.

Variabel penelitian

Variabel bebas adalah ekstrak etanol 95% daun sirih hutan (*P. aduncum* L.). Variabel terikat adalah analisis fitokimia senyawa dalam daun sirih hutan (*P. aduncum* L.) dan pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Variabel kontrol adalah suhu, sterilisasi, waktu inkubasi, nutrisi dalam media, dan strain bakteri.

Sampel penelitian

Strain bakteri yang diterapkan dalam studi ini adalah *S. aureus* ATCC 25923 yang diambil dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Surabaya. Sampel daun sirih hutan yang digunakan adalah daun yang masih segar dan berwarna hijau. Daun sirih hutan segar diambil dari Desa Piga, Kecamatan Soa, Kabupaten Ngada. Untuk kontrol positif dalam penelitian ini digunakan antibiotik clindamicyn dalam bentuk disk standar. Kontrol negatif yang diterapkan dalam penelitian ini adalah larutan dimetil sulfoksida 5% (DMSO) yang steril.

Jumlah sampel yang dipakai dalam penelitian ini mencakup ekstrak etanol 95% daun sirih hutan (*P. aduncum* L.) dengan konsentrasi 0,5% b/v, 1% b/v, 2% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v, serta satu kelompok kontrol positif dan satu kelompok kontrol negatif. Banyaknya pengulangan di setiap bagian sampel ditetapkan menggunakan rumus Federer, dengan perlakuan $(t) = 7$. Setelah dilakukan perhitungan dengan rumus Federer, dari hasil perhitungan didapatkan jumlah pengulangan (r) yang dipakai adalah 4, artinya pada setiap kelompok dilakukan sebanyak 4 kali percobaan (Fauziyah, SKM, 2019).

Analisis data

Data dianalisis menggunakan uji normalitas Shapiro- Wilk untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya,

sebelum dilakukan uji *Anova*, terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas (*Levene test*) untuk menentukan kesamaan varians antar kelompok. Selanjutnya Jika data terdistribusi normal dan bersifat parametrik dilakukan uji *One Way Anova*. Apabila data tidak terdistribusi normal, data tersebut bersifat non-parametrik sehingga uji yang digunakan adalah *Kruskal Wallis*. Kemudian, untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang mempunyai perbedaan rerata yang signifikan dilakukan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Tukey* jika data bersifat homogen, tetapi jika data bersifat non-homogen maka menggunakan uji *Dunnet T3*.

Hasil dan Pembahasan

Determinasi Tanaman

Determinasi sampel dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Jawa Timur. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan merupakan Piper aduncum L. yang termasuk dalam famili Piperaceae, sebagaimana tercantum pada Surat Keterangan Determinasi Nomor 000.9.3/4235/102.20/2025. Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun.

Karakteristik Ekstrak Daun *Piper aduncum* L.

Ekstrak etanol 95% daun *P. aduncum* L. memiliki karakteristik organoleptik berupa ekstrak kental berwarna cokelat kemerahan dengan aroma aromatik khas. Rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 6,42%.

Hasil Uji Bebas Etanol

Hasil uji bebas etanol menunjukkan ekstrak etanol daun *P. aduncum* L. memberikan hasil negatif, yang mengindikasikan tidak terdapat residu etanol pada ekstrak yang digunakan untuk pengujian antibakteri (Tabel 1).

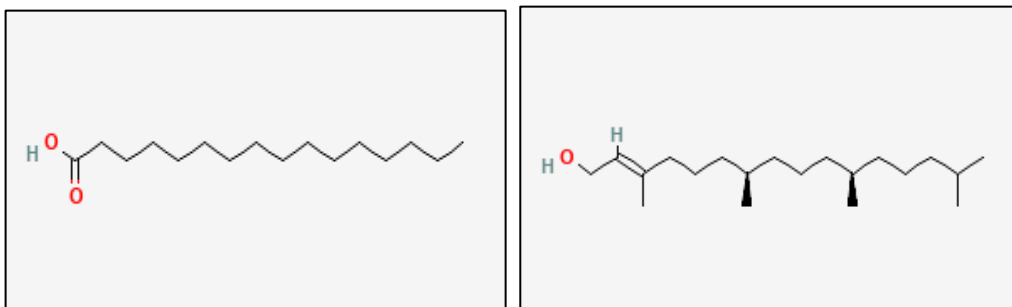
Tabel 1. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun *P. aduncum* L.

Identifikasi	Hasil	Interpretasi
Uji bebas etanol	Negatif (-)	Tidak terdapat residu etanol

Hasil Analisis GC–MS

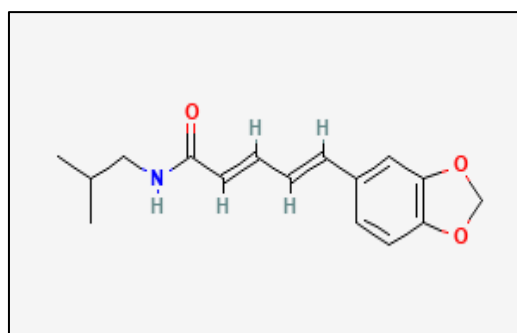
Profil senyawa kimia ekstrak etanol 95% daun *P. aduncum* L. dianalisis menggunakan instrumen Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). Kromatogram Total Ion Chromatogram (TIC) disajikan pada Gambar 1, sedangkan identifikasi senyawa berdasarkan pencocokan spektrum massa dengan pustaka Wiley ditampilkan pada Tabel 2. Sebanyak 43 puncak kromatogram berhasil terdeteksi.

Senyawa yang teridentifikasi meliputi berbagai golongan hidrokarbon, alkohol, asam lemak, diterpenoid, dan alkaloid amida. Di antara senyawa yang teridentifikasi, phytol, hexadecanoic acid ethyl ester, dan (E)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-isobutylpent-2-enamide (piperlongumine) merupakan senyawa yang memiliki aktivitas biologis dan selanjutnya digunakan sebagai dasar pembahasan aktivitas antibakteri.



Hexadecanoic acid(National Center fot Biotechnology Information, 2026)

Phytol(National Center for Biotechnology Information, 2026b)



Piperlongumine(National Center for Biotechnology Information, 2026d)

Gambar 1. Struktur Senyawa Utama Hasil Analisis *Gas Chromatography-Mass* Ekstrak etanol 95% Daun Sirih Hutan (*P. aduncum* L.)

Tabel 2. Hasil identifikasi senyawa menggunakan GC–MS

No	Waktu Retensi (menit)	Senyawa	Luas Area	Keterangan
1	1,611	Nitrogen	3,18E+06	Gas/instrumen
2	1,665	Methyl alcohol	1,49E+07	Diduga residu pelarut/artefak
3	1,706	1,2-Ethenediol	4,98E+06	Diduga artefak
4	1,733	Methyl alcohol	3,38E+07	Diduga residu pelarut
5	1,883	Isopropyl alcohol	9,58E+06	Diduga residu preparasi
6	2,083	Hydroxylamine, O-(2-methylpropyl)-	3,37E+06	Minor compound
7	2,114	2-Butanone, 3-methoxy-3-methyl-	7,19E+06	Minor compound
8	2,240	n-Hexane	1,43E+08	Diduga kontaminan pelarut
9	2,396	Hexane, 2,2,3,3-tetramethyl-	1,25E+07	Hidrokarbon
10	2,434	Pentane, 2,4-dimethyl-	2,44E+07	Hidrokarbon
11	2,458	Cyclopentane, methyl-	5,55E+07	Hidrokarbon
12	2,607	Carbon monoxide	4,02E+05	Artefak instrumen

No	Waktu Retensi (menit)	Senyawa	Luas Area	Keterangan
13	2,651	Pentane, 3,3-dimethyl-	1,03E+07	Hidrokarbon
14	2,685	Carbon monoxide	1,44E+05	Artefak instrumen
15	2,736	Cyclohexane	1,02E+08	Hidrokarbon
16	2,757	Cyclohexane	7,86E+07	Hidrokarbon
17	2,781	Pentane, 2,3-dimethyl-	5,00E+07	Hidrokarbon
18	2,835	Hexane, 3-methyl-	1,34E+08	Hidrokarbon
19	2,937	Cyclopentane, 1,3-dimethyl-, cis-	5,35E+07	Hidrokarbon
20	2,968	Cyclopentane, 1,3-dimethyl-, cis-	2,87E+07	Hidrokarbon
21	2,995	Cyclopentane, 1,2-dimethyl-, cis-	6,32E+07	Hidrokarbon
22	3,083	Heptane	1,64E+08	Hidrokarbon
23	3,400	Cyclohexane, methyl-	1,57E+08	Hidrokarbon
24	3,454	Decane, 2,6,7-trimethyl-	5,02E+06	Hidrokarbon
25	3,485	Hexane, 2,2,3,3-tetramethyl-	9,05E+06	Hidrokarbon
26	3,536	Cyclopentane, ethyl-	1,63E+07	Hidrokarbon
27	3,600	6-Methyl-cyclohex-2-en-1-ol	5,79E+06	Minor compound
28	3,706	Cyclopropane, pentyl-	5,45E+06	Hidrokarbon
29	3,930	Decane, 2,5,6-trimethyl-	4,97E+06	Hidrokarbon
30	3,988	Toluene	1,78E+08	Diduga kontaminan
31	4,151	Toluene	1,61E+07	Diduga kontaminan
32	4,209	Cyclohexane, 1,3-dimethyl-	9,14E+06	Hidrokarbon
33	4,253	Bicyclo[4.1.0]heptane, 3-methyl-	3,41E+06	Hidrokarbon
34	4,325	Cyclopropane, 1,1,2-trimethyl-3-(2-methylpropyl)-	6,48E+06	Hidrokarbon
35	4,383	cis-1-Butyl-2-methylcyclopropane	7,21E+06	Hidrokarbon
36	4,437	Carbon monoxide	5,55E+05	Artefak instrumen
37	4,478	Cyclopropane, 1-butyl-1-methyl-2-propyl-	1,79E+07	Hidrokarbon
38	4,593	Cyclohexane, 1-ethyl-2-methyl-, cis-	1,19E+07	Hidrokarbon
39	4,692	(S)-3-Ethyl-4-methylpentanol	3,49E+06	Minor compound
40	5,056	Cyclohexane, ethyl-	6,66E+06	Hidrokarbon
41	20,538	Hexadecanoic acid, ethyl ester	3,79E+05	Metabolit bioaktif
42	21,704	Phytol	2,28E+06	Metabolit bioaktif (major compound biologis)
43	24,340	(E)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-isobutylpent-2-enamide (Piperlonguminine)	2,72E+05	Metabolit bioaktif

Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

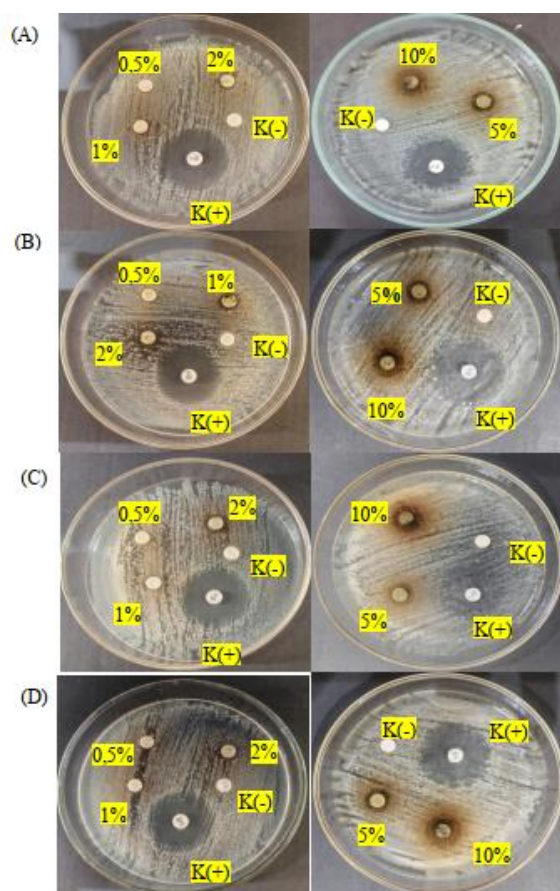
Aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 95% daun *P. aduncum* L. terhadap *Staphylococcus aureus* diuji dengan cara difusi

cakram pada media *Mueller–Hinton Agar* (MHA). Ukuran zona inhibisi bertambah sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak (Tabel 4 dan Gambar 3).

Tabel 4. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Sirih Hutan (*P. aduncum* L.) terhadap Pertumbuhan *S. aureus*

Konsentrasi Ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)					Klasifikasi
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 4	Mean ± SD	
0,5%	6,67	7,24	6,23	6,49	6,65 ± 0,74	Sedang
1%	7,25	8,73	6,85	7,15	7,49 ± 0,84	Sedang
2%	7,8	10,02	8,57	8,9	8,82 ± 0,92	Sedang
5%	10,07	10,45	10,16	10,23	10,22 ± 0,16	Kuat
10%	13,27	12,55	13,08	12	12,72 ± 0,57	Kuat
Kontrol (+)	22,43	22,50	21,12	21,24	21,82 ± 0,74	Sangat Kuat
Kontrol (-)	0	0	0	0	0 ± 0,00	Tidak Ada

Diameter zona hambat rata-rata pada konsentrasi 0,5%; 1%; 2%; 5%; dan 10% masing-masing adalah $6,65 \pm 0,74$ mm; $7,49 \pm 0,84$ mm; $8,82 \pm 0,92$ mm; $10,22 \pm 0,16$ mm; dan $12,72 \pm 0,57$ mm. Kontrol positif (klindamisin) menunjukkan diameter zona hambat sebesar $21,82 \pm 0,74$ mm, sementara kontrol negatif (DMSO 5%) tidak menunjukkan adanya zona hambat. Menurut klasifikasi efek hambatan, konsentrasi 5% dan 10% tergolong dalam kategori kuat, sedangkan konsentrasi 0,5–2% termasuk dalam kategori sedang.



Gambar 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 95% Daun Sirih Hutan (*P. aduncum* L.) Terhadap *S. aureus*. Keterangan: (A) Replikasi 1; (B) Replikasi 2; (C) Replikasi 3; (D) Replikasi 4

Hasil analisis statistik

Hasil uji **Shapiro–Wilk** menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan memiliki

nilai $p > 0,05$, sehingga data berdistribusi normal (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil uji Normalitas

Kelompok Perlakuan	Nilai p	Distribusi Data
10 %	0,362	Normal
5%	0,234	Normal
2%	0,797	Normal
1%	0,319	Normal
0,5%	0,485	Normal
Kontrol (+)	0,104	Normal
Kontrol (-)	Diabaikan	-

Keterangan :

$p > 0,05$: data terdistribusi normal

$p < 0,05$: data tidak terdistribusi normal

Hasil uji homogenitas menunjukkan nilai $p = 0,140$, yang mengindikasikan bahwa varians antar kelompok homogen (Tabel 6).

Tabel 6. Hasil uji Homogenitas

Diameter Zona Hambat	Nilai p	Keterangan
	0,140	Homogen

Keterangan :

$p > 0,05$: data homogen

$p < 0,05$: data tidak homogen

Analisis menggunakan One-Way ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p = 0,001$) (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil uji *One Way Anova*

Diameter Zona Hambat	Nilai p	Keterangan
	0,001	Terdapat perbedaan rerata yang signifikan antar kelompok konsentrasi

Keterangan :

$p < 0,05$: terdapat perbedaan rerata yang signifikan

$p > 0,05$: tidak terdapat perbedaan rerata yang signifikan

Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa konsentrasi 0,5% dan 1% tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), demikian pula konsentrasi 2% dan 5% ($p > 0,05$). Sebaliknya, pasangan perlakuan lainnya menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil uji *Post Hoc Tukey*

Kelompok Uji	Kelompok Uji					
	0,5%	1%	2%	5%	10%	K (+)
0,5%		0,828 ^b	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a
1%	0,828 ^b		0,011 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a
2%	0,001 ^a	0,011 ^a		0,063 ^b	0,001 ^a	0,001 ^a
5%	0,001 ^a	0,001 ^a	0,063 ^b		0,001 ^a	0,001 ^a
10%	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a		0,001 ^a
K (+)	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	0,001 ^a	

Keterangan:

^a: Ada perbedaan signifikan (Sig < 0,05)

^b: Tidak Ada perbedaan signifikan (Sig > 0,05)

Pembahasan

Hasil Ekstraksi dan Uji Bebas Etanol

Ekstraksi etanol dari daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) dilakukan dengan menggunakan cara maserasi menggunakan etanol 95%. Metode ini dipilih karena dilakukan tanpa proses pemanasan, sehingga dapat menjaga stabilitas metabolit sekunder yang peka terhadap panas, termasuk senyawa yang mudah menguap dan semi-menguap yang memiliki potensi sebagai antibakteri. Handoyo (2020) melaporkan bahwa maserasi efektif mengekstraksi senyawa volatil pada daun *Piper betle*, seperti eugenol dan chavicol, tanpa menyebabkan degradasi akibat suhu tinggi.

Penelitian ini menggunakan rasio simplisia terhadap pelarut 1:5, berbeda dengan rasio 1:10 yang direkomendasikan Farmakope Herbal Indonesia. Pemilihan rasio tersebut mengacu pada penelitian Ramdhani *et al.*, (2025) dan Habibullah *et al.*, (2021) memperoleh rasio 1:5 telah menghasilkan ekstraksi yang efisien dengan kandungan metabolit sekunder yang optimal tanpa penggunaan pelarut berlebihan.

Rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 6,42%, sedikit lebih rendah dibandingkan penelitian Correa *et al.* (2025) yang melaporkan rendemen 7,55% menggunakan etanol absolut dengan rasio pelarut 1:12,5. Perbedaan tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh rasio pelarut dan jenis pelarut yang digunakan. Meskipun demikian, selisih rendemen yang relatif kecil menunjukkan bahwa rasio 1:5 tetap mampu menghasilkan ekstrak dengan kandungan metabolit yang memadai.

Sebelum pengujian aktivitas antibakteri, ekstrak diuji bebas residu etanol menggunakan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇) dalam suasana asam.

Tahap ini penting untuk memastikan bahwa aktivitas antibakteri yang diamati berasal dari metabolit sekunder, bukan dari residu etanol yang juga memiliki efek antibakteri (Sukadiasa *et al.*, 2023; Park & Sim, 2024). Hasil pengujian menunjukkan tidak terjadi perubahan warna maupun pembentukan gelembung, sehingga ekstrak dinyatakan bebas residu etanol (Sultan *et al.*, 2025).

Selanjutnya, ekstrak dianalisis menggunakan *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) untuk mengidentifikasi komponen kimia penyusunnya. Teknik GC-MS dipilih karena mampu memisahkan dan mengidentifikasi senyawa volatil maupun semi-volatil berdasarkan waktu retensi dan pola fragmentasi spektrum massa (Madhumita *et al.*, 2019). Penggunaan metode maserasi tanpa pemanasan juga mendukung analisis GC-MS karena meminimalkan degradasi senyawa volatil, sehingga profil metabolit yang diperoleh lebih representatif terhadap kandungan kimia alami daun *P. aduncum*.

Hasil Analisis *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

Analisis GC-MS dilakukan pada ekstrak etanol 95% dari daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) untuk mendeteksi zat volatil dan semi-volatil yang diyakini berkontribusi terhadap efektivitas antibakteri. Analisis dilakukan menggunakan instrumen GC TRACE 1610 yang dipadukan dengan detektor MS ISQ 7610, sehingga senyawa dapat dipisahkan berdasarkan waktu retensi dan diidentifikasi melalui spektrum massa.

Hasil analisis menunjukkan bahwa beberapa puncak kromatogram didominasi oleh senyawa hidrokarbon sederhana, yaitu toluene

(12,00%), heptane (11,19%), cyclohexane (10,72%), dan hexane (9,79%). Senyawa-senyawa tersebut bukan merupakan metabolit sekunder khas genus *Piper*, melainkan lebih sering dilaporkan sebagai artefak analisis atau kontaminan yang berasal dari residu pelarut, sistem instrumen, maupun deposisi polutan lingkungan pada permukaan daun. Oleh karena itu, senyawa tersebut tidak diinterpretasikan sebagai komponen utama ekstrak *P. aduncum* (Maltese *et al.*, 2009; Pálincás *et al.*, 2022). Metanol juga terdeteksi, tetapi karena muncul pula pada blanko analisis dengan waktu retensi yang serupa, senyawa ini diperkirakan merupakan artefak analisis dan tidak dianggap berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri (Martínez-Sena *et al.*, 2019).

Berbeda dengan beberapa laporan sebelumnya, penelitian ini tidak mendeteksi keberadaan dillapiole yang umumnya dilaporkan sebagai senyawa dominan *P. aduncum*. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh variasi *chemotype* berdasarkan asal geografis tanaman. Menurut de Almeida *et al.* (2009), *chemotype* Amazon umumnya kaya dillapiole (35–97%), sedangkan *chemotype* dari wilayah lain lebih banyak menghasilkan senyawa terpenoid dengan kandungan dillapiole yang rendah atau tidak terdeteksi. Dengan demikian, tidak ditemukannya dillapiole pada sampel dari Desa Piga, Kecamatan So'a, Kabupaten Ngada, lebih mungkin mencerminkan variasi kimia tanaman daripada semata-mata akibat proses analisis. Meskipun demikian, pengaruh kondisi analisis GC-MS, seperti suhu inlet dan oven yang tinggi serta rasio split yang digunakan, juga tidak dapat sepenuhnya dikesampingkan sehingga diperlukan konfirmasi menggunakan kondisi analisis yang berbeda atau teknik seperti LC-MS/MS.

Walaupun dillapiole tidak teridentifikasi, GC-MS berhasil mendeteksi beberapa senyawa bioaktif, yaitu phytol, hexadecanoic acid (asam palmitat), dan (E)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-isobutylpent-2-enamide (piperlonguminine). Kehadiran phytol menunjukkan bahwa profil kimia ekstrak cenderung menyerupai *chemotype* non-Amazon yang lebih kaya senyawa terpenoid, sejalan dengan laporan Hartini *et al.* (2024). Piperlonguminine merupakan salah satu amida alkaloid khas genus *Piper* yang sering ditemukan bersama piperine dan kelompok piperamida

lainnya (Gou *et al.*, 2024). Senyawa ini memiliki gugus *methylenedioxyphenyl* (*benzodioxole*) yang juga terdapat pada dillapiole, sehingga tetap mengindikasikan keberadaan metabolit khas genus *Piper* yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri. Temuan ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak *P. aduncum* kemungkinan merupakan hasil sinergisme beberapa metabolit bioaktif, bukan hanya bergantung pada keberadaan dillapiole sebagai senyawa mayor.

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hutan

Penggunaan cakram klindamisin 2,24 µg sebagai kontrol positif bertujuan memverifikasi bahwa metode difusi cakram mampu mendeteksi aktivitas antibakteri secara akurat. Dimetil sulfoksida (DMSO) 5% digunakan sebagai kontrol negatif sekaligus pelarut ekstrak karena mampu melarutkan senyawa dengan berbagai tingkat kepolaran tanpa menunjukkan aktivitas antibakteri pada konsentrasi tersebut. Tidak adanya zona inhibisi pada kontrol negatif mengkonfirmasi bahwa sifat antibakteri berasal dari ekstrak daun sirih liar dan bukan dari pelarut yang digunakan (Wanigasekara *et al.*, 2020).

Ekstrak etanol 95% dari daun sirih liar (*Piper aduncum* L.) menunjukkan sifat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada semua konsentrasi yang diuji. Ukuran zona inhibisi meningkat dari 6,65 mm (0,5% b/v) menjadi 12,72 mm (10% b/v), mencerminkan efek respons dosis: seiring peningkatan konsentrasi ekstrak, kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri juga meningkat. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ridzuan *et al.*, (2021), yang juga menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri *P. aduncum* seiring peningkatan konsentrasi ekstrak.

Berkaitan dengan penelitian oleh Hallianah *et al.*, (2019), ekstrak etanol 95% yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan efek antibakteri yang jauh lebih kuat pada konsentrasi yang sama. Variasi ini diyakini terkait dengan penggunaan etanol 95%, yang lebih efisien dalam mengekstrak senyawa semi-polar hingga non-polar seperti terpenoid dan amida alkaloid dibandingkan etanol 70%. Hal ini menyiratkan bahwa efektivitas aksi antibakteri

dipengaruhi tidak hanya oleh konsentrasi ekstrak tetapi juga oleh kemampuan pelarut untuk mengekstrak metabolit yang bermanfaat.

Aktivitas antibakteri ekstrak diduga merupakan hasil sinergisme beberapa metabolit yang teridentifikasi melalui analisis GC-MS, yaitu phytol, hexadecanoic acid (asam palmitat), dan piperlonguminine. Fitol dikenal dapat meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS), mengganggu sistem transpor elektron, dan merusak struktur membran bakteri, sehingga bermanfaat melawan bakteri Gram-positif seperti *S. aureus* (Lee *et al.*, 2016; Almeida-Bezerra *et al.*, 2024; Inoue *et al.*, 2005). Hexadecanoic acid berkontribusi melalui peningkatan permeabilitas membran dan penghambatan fosforilasi oksidatif yang menyebabkan gangguan metabolisme bakteri (Obukhova *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2024). Sementara itu, piperlonguminine merupakan amida alkaloid khas genus *Piper* yang memiliki aktivitas antibiofilm dan diduga bekerja melalui peningkatan permeabilitas membran serta induksi stres oksidatif, serupa dengan piperamida lainnya (Kadosh *et al.*, 2024; Das *et al.*, 2022; Silva, 2026).

Meskipun dillapiole tidak terdeteksi pada analisis GC-MS, ekstrak tetap menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat. Hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas antibakteri *P. aduncum* tidak hanya bergantung pada dillapiole sebagai senyawa mayor, tetapi juga dipengaruhi oleh metabolit bioaktif lain. Piperlonguminine yang memiliki gugus *methylenedioxyphenyl* (benzodioxole) serupa dengan dillapiole diduga memberikan kontribusi terhadap aktivitas biologis tersebut. Dengan demikian, aktivitas antibakteri ekstrak pada penelitian ini mengindikasikan pola dosis-respons dan kemungkinan merupakan hasil sinergisme phytol, hexadecanoic acid, piperlonguminine, serta metabolit sekunder lainnya yang belum teridentifikasi.

Analisis Statistik

Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data diameter zona inhibisi di seluruh kategori perlakuan mengikuti distribusi normal (seluruh nilai $> 0,05$). Selain itu, uji homogenitas mendapatkan $p\text{-value} = 0,192$, artinya varians antar kelompok homogen. Karena kedua asumsi tersebut terpenuhi, data tersebut sesuai untuk

analisis melalui uji ANOVA. Untuk mengidentifikasi pasangan kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan, dilakukan analisis *Post Hoc Tukey HSD* yang sesuai. Temuan menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara konsentrasi 0,5% b/v dan 1% b/v ($p > 0,05$); namun, kedua konsentrasi ini berbeda secara signifikan dari kelompok 2%, 5%, dan 10% b/v ($p < 0,05$). Lebih lanjut, kontrol positif, klindamisin, menunjukkan diameter zona inhibisi yang jauh lebih besar dibandingkan dengan semua kelompok ekstrak. Hasil uji Tukey juga harus disertakan dalam tabel yang menyajikan perbedaan rata-rata, interval kepercayaan 95%, dan nilai p , sehingga pembaca dapat mengevaluasi tingkat perbedaan antar perlakuan secara efektif.

Peningkatan diameter zona inhibisi yang sesuai dengan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi menunjukkan tren respons dosis, yang menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi menghasilkan peningkatan inhibisi pertumbuhan *S. aureus*. Meskipun demikian, penelitian ini hanya melakukan analisis ANOVA satu arah dan karenanya tidak dapat secara definitif menetapkan hubungan respons dosis statistik pada tahap ini. Oleh karena itu, lebih akurat untuk mengatakan bahwa hal itu "menunjukkan pola respons dosis" daripada mengklaim hubungan respons dosis yang terkonfirmasi. Penelitian selanjutnya dapat mempertimbangkan penggunaan analisis regresi linier atau korelasi Pearson/Spearman untuk memverifikasi hubungan ini.

Temuan investigasi ini konsisten dengan penelitian sebelumnya tentang sifat antibakteri genus *Piper*. Sebuah studi oleh Gou *et al.*, (2024) menemukan bahwa spesies *Piper* yang berbeda memiliki amida dan komponen fenolik yang berperan dalam efektivitas antibakterinya terhadap bakteri Gram-positif. Demikian pula, penelitian yang dilakukan oleh Rahman dkk. (2023) menunjukkan bahwa ekstrak *Piper aduncum* mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, dengan peningkatan diameter zona inhibisi yang terlihat seiring peningkatan konsentrasi ekstrak. Efek ini dikaitkan dengan keberadaan flavonoid, tanin, alkaloid, dan minyak esensial, yang berkontribusi pada denaturasi protein bakteri, penurunan permeabilitas membran, dan kerusakan membran sel.

Namun, klindamisin, kontrol positif, menghasilkan peningkatan diameter zona inhibisi yang cukup besar dibandingkan dengan semua konsentrasi ekstrak, termasuk konsentrasi 10% b/v. Hasil tersebut merupakan temuan yang wajar karena klindamisin merupakan antibiotik murni dengan mekanisme kerja yang spesifik terhadap sintesis protein bakteri, sedangkan ekstrak tanaman masih berupa campuran kompleks metabolit sekunder dengan kadar senyawa aktif yang relatif lebih rendah dan bervariasi.

Walaupun demikian, ekstrak etanol 95% daun sirih hutan tetap mampu menghasilkan zona hambat berkategori kuat pada konsentrasi 5% dan 10% b/v, sehingga menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang nyata terhadap *S. aureus*. Potensi tersebut mendukung pemanfaatan *Piper aduncum* sebagai sumber kandidat antibakteri alami, terutama di tengah meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik sintetis. Namun demikian, penelitian lanjutan masih diperlukan untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), toksisitas, identifikasi senyawa aktif, serta efektivitas *in vivo* sebelum ekstrak ini dapat dipertimbangkan untuk aplikasi terapeutik.

Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu dipertimbangkan dalam menginterpretasikan hasil. Pertama, analisis GC-MS dilakukan di laboratorium eksternal sehingga peneliti tidak dapat mengawasi secara langsung proses penanganan sampel maupun melakukan verifikasi hasil secara segera apabila diperlukan. Kedua, analisis GC-MS yang digunakan bersifat kualitatif sehingga hanya mengidentifikasi jenis senyawa penyusun ekstrak tanpa menentukan kadar masing-masing senyawa. Oleh karena itu, hubungan antara kelimpahan senyawa tertentu dengan aktivitas antibakteri belum dapat dijelaskan secara kuantitatif.

Ketiga, proses ekstraksi menggunakan metode maserasi bertujuan memperoleh ekstrak etanol secara umum, sehingga senyawa volatil, khususnya komponen minyak atsiri, kemungkinan belum terekstraksi secara optimal. Akibatnya, profil kimia hasil analisis GC-MS belum sepenuhnya merepresentasikan seluruh komponen bioaktif daun sirih hutan. Keempat,

penelitian ini belum mencakup pemeriksaan skrining fitokimia, sehingga tidak memungkinkan untuk memverifikasi secara kualitatif keberadaan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid atau triterpenoid. Kondisi ini membatasi interpretasi mengenai kontribusi masing-masing golongan senyawa terhadap aktivitas antibakteri yang diamati.

Berdasarkan keterbatasan tersebut, penelitian selanjutnya disarankan menggunakan analisis kimia kuantitatif, seperti GC-MS kuantitatif atau HPLC/LC-MS, disertai skrining fitokimia, penentuan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal concentration* (MBC), serta uji toksisitas dan efektivitas *in vivo* untuk memberikan bukti ilmiah yang lebih komprehensif mengenai potensi daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) sebagai kandidat antibakteri alami.

Kesimpulan

Analisis Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) terhadap ekstrak etanol 95% daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) tidak mengidentifikasi keberadaan senyawa dillapiole, yang selama ini sering dilaporkan sebagai komponen utama pada beberapa chemotype *P. aduncum*. Sebaliknya, analisis berhasil mengidentifikasi beberapa senyawa yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri, yaitu phytol, hexadecanoic acid ethyl ester, dan (E)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-isobutylpent-2-enamide (piperlonguminine). Temuan ini mengindikasikan bahwa profil metabolit ekstrak daun sirih hutan asal Desa Piga, Kabupaten Ngada, berbeda dengan chemotype yang didominasi oleh dillapiole.

Ekstrak etanol daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) pada konsentrasi 95% menunjukkan efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi yang diuji (0,5–10% b/v). Diameter rata-rata zona inhibisi yang tercatat adalah $6,65 \pm 0,42$ mm (0,5%; kategori sedang), $7,49 \pm 0,84$ mm (1%; kategori sedang), $8,82 \pm 0,92$ mm (2%; kategori sedang), $10,22 \pm 0,16$ mm (5%; kategori kuat), dan $12,27 \pm 0,57$ mm (10%; kategori kuat). Analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi menyebabkan peningkatan yang signifikan pada

ukuran zona inhibisi, yang menandakan korelasi yang bergantung pada dosis antara konsentrasi ekstrak dan efek antibakterinya. Meskipun efek penghambatan ekstrak tersebut masih lebih rendah daripada kontrol positif (klindamisin), temuan penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 95% dari daun sirih hutan dapat berfungsi sebagai sumber berharga agen antibakteri alami, yang layak untuk dieksplorasi lebih lanjut, khususnya dalam mengisolasi bahan aktif, menentukan konsentrasi *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), dan menilai mekanisme kerjanya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

Referensi

- Abreu, O. (2015). Antimicrobial Activity of *Piper aduncum* sub sp *ossanum* essential oil. *International Journal of Phytomedicine*, 7, 205–208. <https://doi.org/https://ijp.arjournals.org/index.php/ijp/article/view/406>
- Almeida-Bezerra, W. J., Menezes, S. A., Silva, C., Sousa, S. G., Alves, D. S., et al. (2024). Analysis of the antibiotic-potentiating activity, absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME), and molecular docking properties of phytol against multidrug-resistant (MDR) strains. *Antibiotics*, 13(12), 1171. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121171>
- Amir, M., & Abna, I. M. (2022). Tanaman Herbal Menjadi Pilihan Sebagai Obat Tradisional, Pangan Fungsional Dan Nutrasetikal. *Jurnal Abdimas*, 9(1), 79–83.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity : A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Brazão, M. A. B., Brazão, F. V., Maia, J. G. S., & Monteiro, M. C. (2014). Antibacterial activity of *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), 517–526.
- Das, S., Paul, P., Dastidar, D. G., Chakraborty, P., Chatterjee, S., Sarkar, S., et al. (2023). Piperine exhibits potential antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* by accumulating reactive oxygen species, affecting cell surface hydrophobicity and quorum sensing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195, 3229–3256. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04267-4>
- de Almeida, R. R. P., Souto, R. N. P., Bastos, C. N., & Silva, M. H. L. (2009). Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chemistry & Biodiversity*, 6(9), 1427–1434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800212>
- Fauziyah, R. N (2019). *Sampling dan Besar Sampel Bidang Kesehatan Masyarakat dan Klinis* (S. M. S. Gurid Pramintarto Eko Mulyono (ed.); Pertama). Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung.
- Duro, A., Radice, M., Blanco-salas, J., & Ruiz-téllez, T. (2021). *Piper aduncum* Essential Oil : a Promising Insecticide , Acaricide and Antiparasitic . 42, 19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/parasite/2021040>
- Farook, N. A. M., Argimón, I., Samat, M. N. A., Salleh, S. A., Sulaiman, S., Tan, T. L., Periyasamy, P., Lau, C. L., Ismail, Z., Azami, N. A. M., Ang, M. Y., & Hui-Min Neoh. (2022). Diversity and Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Genotypes in Southeast Asia. *Microorganisms*, 10(12), 2399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122399>
- Fitriana, N. F., & Mukhlisah, N. R. I. (2024). Review: Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* Linn.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *MEDFARM: Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*, 13(1), 32–46. <https://doi.org/10.48191/medfarm.v13i1.1313>

- Gou, G., Bao, W., & Li, J. (2025). Structural diversity, biological activities and biosynthetic pathways of [2 + 2] and [4 + 2] amide alkaloid dimers from Piperaceae: An updated review. *Fitoterapia*, 180, 106305.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.106305>
- Habibullah, J., Agustina, R., & Prasetya, F. (2021). Optimasi metode ekstraksi daun sirih hitam (*Piper* sp.) terhadap kandungan metabolit sekunder. *Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 13, 99–105.
<https://doi.org/10.25026/mpc.v13i1.450>
- Hallianah, I. P., Lambui, O., & Ramadanil, R. (2019). Uji daya hambat ekstrak daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Biocelebes*, 13(1).
<https://bestjournal.untad.ac.id/index.php/Biocelebes/article/view/12870>
- Handoyo, D. L. Y. (2020). The influence of maceration time (immersion) on the viscosity of betel leaf (*Piper betle* L.) extract. *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1), 34–41.
<https://doi.org/10.35316/tinctura.v2i1.1546>
- Hanina, H., Humaryanto, H., Gading, P. W., Aurora, W. I. D., & Harahap, H. (2022). Peningkatan Pengetahuan Siswa Pondok Pesantren Nurul Iman Tentang Infeksi *Staphylococcus aureus* Di Kulit Dengan Metode Penyuluhan. *Medical Dedication (Medic): Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat FKIK UNJA*, 5(2), 426–430.
<https://doi.org/10.22437/medicaldedication.v5i2.21000>
- Hartini, Y. S., Julianus, J., Patramurti, C., & Nugroho, L. H. (2024). Group secondary metabolite profile in mature and old leaves of four *Piper* species: Forest betel (*Piper aduncum* L.), red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), Javanese chili betel (*Piper retrofractum* Vahl.), and green betel (*Piper betle* L.). *Pharmacognosy Journal*, 11(2), 546–552.
<https://doi.org/10.14719/pst.3070>
- Inoue, Y., Hada, T., Shiraishi, A., Hirose, K., Hamashima, H., & Kobayashi, S. (2005). Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1770–1774.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1770-1774.2005>
- Kadosh, Y. S., Muthuraman, S., Nisaa, K., Ben-Zvi, A., Byron, D. L. K., Shagan, M., et al. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm attenuation by a dihydroxy derivative of piperlongumine (PL-18). *Biofilm*, 8, 100215.
<https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2024.100215>
- Lade, H., & Kim, J.-S. (2023). *Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Metchillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An Updated Review*. 12(9), 1362.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics12091362>
- Lee, W., Woo, E. R., & Lee, D. G. (2016). Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radical Research*, 50(12), 1309–1318.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1241395>
- Made, I., Sanjaya, D., Purba, R., & Saleh, C. (2024). Skrining Fitokimia dan Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hutan (*Piper aduncum* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*: A Mini Review. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, 3(1), 78–82.
- Madhumita, M., Guha, P., & Nag, A. (2019). Extraction of betel leaves (*Piper betle* L.) essential oil and its bio-actives identification: Process optimization, GC-MS analysis and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 138, 111578.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111578>
- Maltese, F., Van der Kooy, F., & Verpoorte, R. (2009). Solvent-derived artifacts in natural products chemistry. *Natural Product Communications*, 4(3), 447–454.
<https://doi.org/10.1177/1934578X0900400326>

- Martínez-Sena, T., Luongo, G., Sanjuan-Herráez, D., Castell, J. V., Vento, M., Quintás, G., et al. (2019). Monitoring of system conditioning after blank injections in untargeted UPLC-MS metabolomic analysis. *Scientific Reports*, 9, 9822. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46371-w>
- National Center for Biotechnology Information. (2026a). *Dillapiole*. PubChem.
- National Center for Biotechnology Information. (2026b). *Phytol*. PubChem. <https://doi.org/https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phytol>
- National Center for Biotechnology Information. (2026c). *Piperine*. PubChem.
- National Center for Biotechnology Information. (2026d). *Piperlongumine*. PubChem. <https://doi.org/https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperlonguminine>
- National Center for Biotechnology Information. (2026). *Hexadecanoic Acid*. PubChem. <https://doi.org/https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hexadecanoic%20acid#section=3D-Conformer>
- Nur Khairunnisa, Lisa Yuniati, Arsal, A. S. F., Hermiaty, & Syamsu, R. F. (2023). Efektifitas Ekstrak Daun Kemangi & Ekstrak Daun Sirih Merah sebagai Anti Mikroba *Staphylococcus aureus* Penyebab Furunkle. *Fakumi Medical Journal: Jurnal Mahasiswa Kedokteran*, 3(2), 106–111. <https://doi.org/10.33096/fmj.v3i2.185>
- Obukhova, E. S., & Murzina, S. A. (2024). Mechanisms of the antimicrobial action of fatty acids. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 60(6), 580–588. <https://doi.org/10.31857/S0555109924060029>
- Pálinkás, A., Kálvin, G., Vancsó, P., Kandrai, K., Szendrő, M., Németh, G., et al. (2022). *The composition and structure of the ubiquitous hydrocarbon contamination on van der Waals materials*. arXiv. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2207.01057>
- Park, Y. C., & Sim, J. H. (2024). A study for kinetics and oxidation reaction of alcohols by $C_9H_7NHCrO_3Cl$ [Cr(VI)-quinoline complex]. *Journal of Convergence for Culture Technology*, 10(6), 781–788. <https://doi.org/10.17703/JCCT.2024.10.6.781>
- Perhimpunan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik Indonesia (PAMKI). (2024). *Pola Patogen dan Antibiogram di Indonesia Tahun 2023*.
- Ridzuan, P. M., Aisyah, B., Kausar, A., Nazifi, Y., & Misbah, O. (2021). *In vitro* antimicrobial inhibitory effect of *Piper aduncum* leaves extracts on bacteria and fungi. *Asian Journal of Medical and Health Sciences Research and Clinical Management*, 4(2), 47–53.
- Salim, M., Gestiwana, O., & Kamilla, L. (2023). Efektivitas Sediaan Sabun Wajah Cair Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Metode Difusi. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.30602/jlk.v7i1.1255>
- Sartika, D., Wardi, E. S., Putri, D. K., & Rahmi, M. (2025). *Antimicrobial Activity Test of Ethanol Extract of Forest Betel Leaves (Piper aduncum L.)*. 3(2), 1–7. <https://doi.org/https://ijp.arjournals.org/index.php/ijp/article/view/406>
- Selvira, & Albina, M. (2025). Model Penelitian Eksperimental Dalam Pendidikan : Model Penelitian Eksperimental Dalam Pendidikan : Jenis, Tujuan, dan Aplikasinya. *Jurnal Media Akademik*, 3(6). <https://doi.org/DOI: 10.62281>
- Silva, H. B. de. (2026). Antimicrobial effect of spices and their phytochemicals: A novel approach to overcoming antibiotic resistance. *MedComm*, 7(4). <https://doi.org/10.1002/mco2.70688>
- Sukadiasa, P. I. K., Wintariani, N. P., Ngurah, I. G., Windra, A., & Putra, W. (2023). Uji efektivitas antibakteri ekstrak etanol 96% tanaman gonda (*Sphenoclea zeylanica* Gaertn.) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Medicamento*, 9(1). <https://doi.org/10.36733/medicamento.v9i1.4644>
- Sultan, S. F., Susanti, H., Mohamed, F., & Salamah, N. (2025). Development and validation of analytical method for ethanol content in medicinal cough syrup. *Journal of Halal Science Research*, 6(1), 94–103. <https://doi.org/10.12928/jhsr.v6i1.12217>
- Suyasa, I. B. O. (2020). Gambaran Methicillin

- Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Pada Petugas Kesehatan RSUD Wangaya Kota Denpasar. *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 8(1), 46–52. <https://doi.org/10.33992/m.v8i1.1074>
- Tan, S. W., Yoon, B. K., & Jackman, J. A. (2024). Membrane-disruptive effects of fatty acid and monoglyceride mitigants on *Escherichia coli* bacteria-derived tethered lipid bilayers. *Molecules*, 29(1), 237. <https://doi.org/10.3390/molecules29010237>
- Wanigasekara, W., Madhushanthi, M., Liyanaarachchi, D., Wijayaratne, W., & Napagoda, M. (2020). Determination of tolerance limits of dimethyl sulfoxide (DMSO) on selected bacterial strains for the antimicrobial assays of natural products. *International Forestry and Environment Symposium*, 25, 104. <https://journals.sjp.ac.lk/index.php/fesymposium/article/view/5107>
- World Health Organization. (2021). *Global Shortage of Innovative Antibiotics Fuels Emergence and Spread of Drug Resistance*. WHO