

## Antibacterial Activity of Ethanol Extracts of N-hexane and Ethyl Acetate Fractions from Nutmeg Leaves (*Myristica fragrans*) on *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus pyogenes*

**Della Sunita\*,  
D Elysa Putri Mambang,  
Ainil Fithri Pulungan,  
Rafita Yuniarti**

Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan, Sumatera Utara, Indonesia

\*email: [dellasuntia@gmail.com](mailto:dellasuntia@gmail.com)

**Keywords:**

Myristica fragrans  
Fractions  
Antibacterial Activity

Received: August 2024

Accepted: August 2024

Published: August 2024

### Abstract

Nutmeg leaves (*Myristica fragrans*) have been known as a traditional medicinal plant with properties as a pain reliever, anti-inflammatory, digestive and respiratory smoothener, and antibacterial. This study aims to determine the antibacterial activity of ethanol extract, n-hexane fraction, and ethyl acetate fraction of nutmeg leaves against *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus pyogenes*. Ethanol extract of nutmeg leaves was made by maceration method with 96% ethanol solvent and fractionated using n-hexane and ethyl acetate solvents. Antibacterial activity test against *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus pyogenes* was carried out using the agar diffusion method. The results showed that the ethyl acetate fraction of nutmeg leaf extract produced a larger inhibition zone diameter compared to the n-hexane fraction of nutmeg leaf extract, which was 16.6 mm at a concentration of 50% for *Shigella dysenteriae* bacteria and 18.1 mm at a concentration of 50% for *Streptococcus pyogenes* bacteria, which was classified as moderate. Based on this study, the ethyl acetate fraction of nutmeg leaf extract had the best antibacterial activity against *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus pyogenes*.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

### Pendahuluan

Tumbuhan secara turun temurun telah digunakan sebagai pengobatan beberapa penyakit dan terbukti khasiatnya. Obat herbal yang berasal dari semua jenis tumbuhan telah berhasil mengobati bermacam-macam penyakit. Tanaman pala (*Myristica fragrans*) adalah salah satu tanaman pengobatan alami yang sering digunakan masyarakat (1). Tanaman pala dikenal sangat berguna karena setiap bagian darinya dapat dimanfaatkan. Bagian daunnya biasa dimanfaatkan sebagai obat-obatan dan kosmetik (2). Daun pala mengandung senyawa minyak atsiri dan senyawa lainnya seperti alkaloida, terpenoid, tanin, flavonoid, dan juga saponin (3). Senyawa minyak atsiri dalam daun pala diketahui

memiliki sifat antibakteri dalam menghambat beberapa bakteri penyebab infeksi (4).

Sebagian besar penyakit infeksi disebabkan oleh bakteri dan terus menjadi masalah besar dalam bidang kesehatan. Salah satu bakteri yang menyebabkan penyakit infeksi saluran pencernaan adalah *Shigella dysentri*. *Shigella dysentri* merupakan bakteri penyebab diare yang berkembang biak di dalam usus manusia. Bakteri ini menghasilkan toksin shiga di dalam jejunum yang menyebabkan aktivasi proses sekresi sehingga terjadi diare akut yang diikuti dengan tinja cair bercampur darah dan berlendir yang tampak pada awal penyakit (5). Penyakit infeksi lainnya yang disebabkan oleh bakteri yaitu *Streptococcus pyogenes* yang

merupakan bakteri paling sering menyebabkan infeksi saluran pernafasan yaitu faringitis (6).

Sifat antibakteri yang dimiliki oleh ekstrak daun pala, dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif karena adanya senyawa metabolit sekunder yang terbukti dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (7), *Metichillin resistant staphylococcus* (8), *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus epidermidis* (9).

Uji daya hambat ekstrak daun pala terhadap bakteri *Shigella dysentri* dan *Streptococcus pyogenes* yang juga merupakan bakteri patogen, perlu dilakukan untuk mendukung informasi tentang aktivitas daya hambat pertumbuhan bakterinya. Uji ini dilakukan dengan membedakan metode ekstraksi untuk memperoleh senyawa kimia dari daun pala.

## Metode

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas, blender, autoklaf, inkubator, timbangan analitik, hot plate, vacuum rotary, oven, lemari pendingin, kertas cakram dan jangka sorong.

Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol 96%, n-heksana, etil asetat, kloramfenikol, DMSO, nutrient agar, Mueller Hinton Agar (MHA) *Shigella dysentri* ATCC® 13313TM dan *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615TM.

### Prosedur Penelitian

#### Preparasi Sampel dan Simplisia

Sampel daun pala (*Myristica fragrans*) diperoleh dari Kecamatan Kutablang, Kabupaten Bireuen, Aceh, yang diambil secara purposive random sampling. Daun pala dikumpulkan, disortir basah, dicuci, dan dikeringkan. Setelah kering daun disortasi kering, dihaluskan, dan diayak sampai menghasilkan serbuk (10).

### Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia seperti pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total dan penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan menurut prosedur (10).

### Pembuatan Ekstrak Etanol

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan bagian etanol 96% sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari 48 terlindungi dari cahaya sambil sesekali diaduk, kemudian diserkai, diperas, dan disaring (maserat I). Dicuci ampas dengan 25 bagian etanol 96% sebanyak 1250 ml, dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, lalu disaring menggunakan kain flanel (maserat II). Setelah itu maserat I dan maserat II dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (10).

### Pembuatan Fraksi Etil Asetat

Sebanyak 40 g ekstrak kental dilarutkan dalam 80 ml etanol 96% sampai larut. Kemudian ditambahkan 80 ml aquadest, dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 200 ml n-heksana, dikocok, kemudian didiamkan sampai terdapat 2 lapisan yang terpisah, Lapisan n-heksana (lapisan atas) yang mengandung sari diambil, fraksinasi dilakukan sampai lapisan n-heksana memberikan hasil negatif yaitu sampai tidak berwarna (bening). Lapisan n-heksana dikumpulkan sehingga diperoleh fraksi n-heksana. Kemudian lapisan bawah (residu) ditambahkan 200 ml etil asetat, dikocok, lalu didiamkan sampai terdapat 2 lapisan yang terpisah. Lapisan etilasetat (lapisan atas) yang mengandung sari diambil, fraksinasi dilakukan sampai, memberikan hasil negatif yaitu sampai tidak berwarna. Lapisan n-heksana dan etil asetat yang dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator

pada suhu 50°C dan diuapkan diatas waterbath sehingga diperoleh fraksi kental (11).

### **Skrining Fitokimia**

Pemeriksaan skrining fitokimia meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, tanin, dan steroida/triterpenoid sesuai standar Farmakope Indonesia (12).

### **Peremajaan Bakteri**

Biakan bakteri murni yang digunakan adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615TM dan bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC® 13313TM yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara. Hal pertama yang dilakukan yaitu membuat media Nutrient Agar (NA). Media Nutrient Agar (NA) dituangkan kedalam tabung reaksi sekiranya sebanyak 10 ml, diletakkan miring dan didiamkan hingga agar memadat. Selanjutnya diambil satu ose bakteri dan diinokulasikan dengan cara menggoreskan secara merata pada media yang sudah memadat dengan jarum ose yang sudah disterilkan dengan membakar pada lampu bunsen dari pangkal hingga ujungnya. Setelah masing-masing tabung reaksi telah dioleskan bakteri yang akan diremajakan, ditutup dengan cara menggulung tabung reaksi menggunakan plastik wrap, dan diinkubasi dalam incubator selama 24 jam (13).

### **Pembuatan Inokulum**

Larutan inokulum dibuat dengan tujuan untuk memperpendek fase adaptasi (14). Tujuan lain dari larutan inokulum adalah untuk mendapatkan biakan bakteri yang cepat tumbuh dan berkembang biak. Dari stok kultur bakteri pada media NA yang diambil bakteri dengan menggunakan jarum ose steril, kemudian disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9 %, kemudian kekeruhan suspensi bakteri diperoleh dibandingkan dengan kekeruhan Mc Farland 0.5 (12)

### **Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Sebelum melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat daun pala terhadap *Shigella*

*dysentri* dan *Streptococcus pyogenes*, perlu dilakukan proses pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang digunakan sebagai media pengaplikasian. Proses ini dilakukan dengan memasukkan 7,6 gram serbuk MHA kedalam 200 ml aquadest pada tabung erlenmeyer dan diaduk hingga larut. Pembuatan dilanjutkan dengan memanaskan diatas hotplate agar larutan homogen, kemudian di sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C, lalu diambil suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Shigella dysentri* menggunakan cotton swab steril yang dicelupkan kedalam suspensi bakteri dan digoreskan diatas permukaan media MHA yang sudah keras. Kertas cakram yang telah direndam ke dalam larutan uji ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat daun pala, kontrol positif (+) kloramfenikol dan kontrol negatif (-) DMSO ditunggu hingga berdifusi sempurna, kemudian di letakkan di atas permukaan media padat yang telah di inokulasi bakteri, kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 36-37°C selama 18-24 jam, selanjutnya diameter daerah hambat (zona jernih) di sekitar kertas cakram diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan (12).

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Karakterisasi Simplisia Daun Pala**

Pemeriksaan penetapan kadar air pada serbuk daun pala didapat sebesar 8%, kadar sari larut air pada serbuk daun pala yang dimaserasi selama 24 jam menggunakan pelarut campuran air dan kloroform didapatkan hasil 25%. Pemeriksaan kadar sari larut etanol pada serbuk daun pala dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut etanol untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada daun pala dan didapatkan hasil 36,3%. Pemeriksaan kadar abu total pada serbuk daun pala didapatkan hasil 5,25%. Pada pemeriksaan kadar abu tidak larut asam menggunakan abu yang sebelumnya digunakan

pada penetapan kadar abu total dengan menggunakan asam klorida 2N didapatkan hasil 0,41 %. Dari hasil pemeriksaan karakterisasi simplisia daun pala menyatakan sudah sesuai dan memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia.

**Tabel 1.** Hasil pengujian karakterisasi simplisia daun pala

| No. | Parameter                  | Hasil Pengujian | Syarat FHI |
|-----|----------------------------|-----------------|------------|
| 1.  | Kadar Air                  | 8,00%           | ≤ 10,0%    |
| 2.  | Kadar Sari Larut Air       | 25,00 %         | ≥ 7,0%     |
| 3.  | Kadar Sari Larut Etanol    | 36,30 %         | ≥ 10,3%    |
| 4.  | Kadar Abu Total            | 5,25 %          | ≤ 6,0%     |
| 5.  | Kadar Abu Tidak Larut Asam | 0,41 %          | ≤ 0,5%     |

### Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia serbuk simplisia, ekstrak etanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat daun pala bertujuan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan daun pala. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil skrining fitokimia serbuk, ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan n-heksana

| No. | Golongan Senyawa      | Serbuk | Ekstrak Etanol | Ethyl asetat | n-heksana |
|-----|-----------------------|--------|----------------|--------------|-----------|
| 1.  | Alkaloid              | +      | +              | +            | -         |
| 2.  | Flavonoid             | +      | +              | +            | -         |
| 3.  | Tanin                 | +      | +              | +            | -         |
| 4.  | Saponin               | +      | +              | +            | -         |
| 5.  | Steroida/Triterpenoid | +      | +              | +            | +         |
| 6.  | Glikosida             | +      | +              | +            | -         |

### Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari sampel ekstrak etanol, dan berbagai fraksi yaitu n-heksana dan etil asetat menggunakan metode difusi agar kertas cakram, dikarenakan metode ini

memberikan hasil pengujian berupa zona bening yang dapat diamati dan diukur dengan mudah.

Ekstrak etanol dan juga fraksi n heksan serta etil asetat daun pala pada konsentrasi 10,20,30,40, dan 50% masing masing berhasil memberikan zona hambat terhadap bakteri *Shigella dysentri*. Zona hambat ekstrak etanol yang terbentuk pada konsentrasi 10% (7.6mm), 20% (8.6mm), 30% (10.1mm), 40% (11.4mm), 50% (12.3mm). Konsentrasi 40 dan 50% tergolong kategori kuat, namun pada konsentrasi 10,20 dan 30% dikategorikan sedang. Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat pada konsentrasi 10% (11.3mm), 20% (13.2mm), 30% (14.8mm), 40% (15.8mm), 50% (16.5mm) dimana pada semua konsentrasi mulai dari 10,20,30,40,50% berkategori kuat. Selanjutnya rata-rata zona hambat fraksi n-heksana pada konsentrasi konsentrasi 10% (5.0mm), 20% (5.1mm), 30% (5.2mm), 40% (5.4mm), 50% (6.0mm) hasil yang didapatkan pada semua konsentrasi termasuk kategori sedang. Kloramfenikol yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki zona hambat sebesar 32mm dimana kategorinya sangat kuat, dan DMSO sebagai kontrol negatif tidak terbentuk daya hambat.

Ekstrak etanol dan juga fraksi n heksan serta etil asetat daun pala pada konsentrasi 10,20,30,40, dan 50% masing masing berhasil memberikan zona hambat terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*. Zona hambat ekstrak etanol yang terbentuk pada konsentrasi 10% (9.2mm), 20% (11.0mm), 30% (11.3mm), 40% (11.5mm), 50% (13.4mm). Menurut Davis dan Stout (1971) dimana kategori kekuatan daya hambat antibakteri dengan mengukur diameter zona bening bakterinya, konsentrasi 20,30,40 dan 50% tergolong kategori kuat, namun konsentrasi 10% kategorinya sedang. Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat pada konsentrasi 10% (10.0mm), 20% (11.2mm), 30% (13.3mm), 40% (15.7mm), 50% (18.1mm) hasil yang didapatkan pada semua konsentrasi kategorinya kuat. Selanjutnya rata-rata zona hambat fraksi n-heksana pada konsentrasi konsentrasi 10% (5.0mm), 20%

(5.2mm), 30% (5.3mm), 40% (5.6mm), 50% (6.3mm) dimana hasil yang didapatkan pada semua konsentrasi yaitu masih termasuk kategori sedang. Kloramfenikol yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki zona hambat sebesar 33,6mm dimana kategorinya sangat kuat, dan DMSO sebagai kontrol negatif tidak terbentuk daya hambat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang ditarik oleh fraksi etil asetat yang lebih besar sehingga fraksi etil asetat memiliki daya hambat yang lebih bear dibandingkan fraksi n-heksan maupun ekstrak etanol daun pala. Polaritas senyawa yang diekstraksi oleh masing-masing pelarut bersama dengan kemampuan zat untuk menyebar pada media yang digunakan mempengaruhi aktivitas antibakteri fraksi tersebut. Fraksi n-heksan memiliki zona hambat karena diduga memiliki senyawa steroid yang berhasil ditarik selama proses fraksinasi. Sebaliknya, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol memiliki zona hambat diduga karena senyawa alkaloid flavonoid, saponin tanin, dan glikosida yang ditarik selama proses ekstraksi dan fraksinasi (15). Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak dan fraksi daun pala yang mengandung senyawa antibakteri seperti saponin, flavonoid, tanin, dan steroid menyebabkan terbentuknya zona hambat. Perbedaan besar kecilnya zona hambat pada berbagai konsentrasi dapat disebabkan oleh sejumlah faktor, yaitu perbedaan kandungan zat aktif antimikroba dalam ekstrak dan fraksi, atau kecepatan difusi bahan antimikroba ke dalam media. Temperatur inkubasi, waktu inkubasi, dan aktivitas metabolik mikroorganisme itu sendiri yang dapat memengaruhi kepekaan bakteri terhadap pertumbuhan.

## Kesimpulan

Ekstrak etanol daun pala (*Myristica fragrans*) memiliki aktivitas antibakteri kategori kuat dengan rerata zona hambat yang terbentuk paling besar yaitu 12,3 mm pada *Shigella dysentri*

dan 13,4 mm terhadap *Streptococcus pyogenes*. Fraksi etil asetat daun pala (*Myristica fragrans*) mempunyai aktivitas antibakteri lebih besar dibandingkan fraksi n-heksana terhadap *Shigella dysentri* dan *Streptococcus pyogenes* dengan rerata diameter zona hambat fraksi etil asetat yaitu sebesar 16,6 mm terhadap *Shigella dysentri* dan 18,1 mm terhadap *Streptococcus pyogenes*. Sedangkan fraksi n-heksana memiliki rerata zona hambat yaitu 6,3 mm terhadap *Shigella dysentri* dan 6,0 mm terhadap *Streptococcus pyogenes*.

## Daftar Pustaka

1. Putri DMP, Rachmawati N. Antropologi kesehatan: Konsep dan aplikasi antropologi dalam kesehatan. Pustaka Baru Press. 2018. 107-108.
2. Undri R, Widyaningsih S, Dwi K, Ningsihdian R. Aktivitas Antibakteri Daun Pala dari Bayumas Terhadap bakteri Serta Identifikasi Senyawa Penyusunnya. Univ Jendral Sudirman. 2020;1(1):197-203.
3. Fawwaz M, Nurdiansyah S, Baits M. Potensi Daun Pala (*Myristica frgrans* Houtt) Sebagai Sumber Fenolik. Fitofarmaka Indones. 2020;4(1):102-6.
4. Kindangen GD, Lolo WA, Yamlean PVY. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Kulit Buah Jeruk Kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. Pharmacon J Ilmiah Farm. 2018;7(4):62-8.
5. Kartika AM, Arsito PN. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol Ekstrak Etanolik Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Bakteri *Shigella dysentri*ae. Skripsi. 2019;9-12.
6. Ardiyanti S. Perbandingan Viabilitas Bakteri *Streptococcus Pyogenes* Yang Diinokulasi Pada Media. Skripsi. 2020;8-16.
7. Rizal F yamami. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Pala (*Myristica fragrans*) Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. Skripsi. 2016;

8. Nurjannati. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pala (*Myristica folium*) terhadap Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Skripsi. 2018;
9. Halimathussadiah, Rahmawati D, Indriyanti N. Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) Sebagai Antibakteri. *Proceeding Mulawarman Pharm Conf.* 2021;4(1):135-8.
10. DepKes RI. *Farmakope Indonesia Edisi III.* Jakarta: Jakarta; 1979. 378, 535, 612 p.
11. Bassett J. *Kimia Analisis kuantitatif Anorganik.* Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 1994.
12. DepKes RI. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Jakarta: Jakarta; 1995. 551, 713 p.
13. Aviany HB, Pujiyanto S. Analisis Efektivitas Probiotik di dalam Produk Kecantikan sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *J Berk Bioteknologi.* 2020;3(2):24-31.
14. Saropah DA, Jannah A, Maunatin A. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul. *Alchemy.* 2012;2(1):34-45.
15. Rupiniasih NN, Indriani, Syamsyudin, Razak AR. Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, Kloroform, Etil Asetat Bunga Kamboja (*Plumeria alba*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Salmonella typhi*. *KOVAIEN J Ris* 2019;5(2):173-81.