

Research Article

Antibacterial Activities Test of Methanol, N-hexane Fraction, and N-hexane Extract from *Filicium decipiens* Leaf on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol, Ekstrak Fraksi N-Heksan, dan Ekstrak N-Heksan Daun *Filicium decipiens* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan Bakteri *Bacillus subtilis*

Siti Mahyuni, Trirakhma Sofihidayati

Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Universitas Pakuan

JL Ciheuleut PO Box 452 Bogor 16143 Jawa Barat Indonesia

Email: siti.mahyuni@unpak.ac.id

Received: October 27, 2019

Accepted: February 13, 2020

Abstract

The previous study shows ethanol extract of *Filicium decipiens* leaf possesses a strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, but there have been no study of the antibacterial activity with different solvents. The purpose of this study was to determine the antibacterial activities of methanol, n-hexane fraction of methanol, and n-hexane extract of *F. decipiens* leaves against *S. aureus* and *Bacillus subtilis* bacteria. Extraction was carried out by soxletation method using methanol and n-hexane solvent. The antibacterial activity test was done by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) and zone of Inhibition. The results showed that methanol extract did not have activity either against *S. aureus* bacteria or against *B. subtilis*. N-hexane extract which was fractionated from methanol extract had no activity against *B. subtilis* but showed moderate activity against *S. aureus* with 9 mm inhibition diameter at an extract concentration of 40%. N-hexane extract has very strong antibacterial activity against *S. aureus* with inhibition diameter reaching 21 mm at extract concentration of 30% and showing strong activity against *B. subtilis* bacteria with inhibition diameter of 10 mm at extract concentration of 30%. It can be concluded that n-hexane extract from *F. decipiens* has a potent as natural antibiotic material.

Keywords: *Filicium decipiens*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis*; n-hexane extract; methanol extract

Abstrak

Ekstrak etanol tanaman *Filicium decipiens* diketahui memiliki aktivitas antibakteri kuat terhadap *Staphylococcus aureus*, namun belum ada penelitian aktivitas antibakteri ekstrak *F. decipiens* dengan pelarut berbeda. Tujuan penelitian ini mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol, fraksi n-heksan ekstrak metanol, dan ekstrak n-heksan daun *F. decipiens* terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *Bacillus subtilis*. Ekstraksi dilakukan dengan metode soxletasi menggunakan pelarut metanol dan n-heksan. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dan lebar daerah hambat (LDH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol tidak memiliki aktivitas baik terhadap bakteri *S. aureus* maupun terhadap *B. subtilis*. Ekstrak n-heksan yang difraksinasi dari ekstrak metanol tidak memiliki aktivitas terhadap *B. subtilis*, namun menunjukkan aktivitas sedang terhadap

Research Article

bakteri *S. aureus* dengan LDH tertinggi 9 mm pada konsentrasi ekstrak 40%. Ekstrak n-heksan memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap *S. aureus* dengan diameter hambat mencapai 21 mm pada konsentrasi 30% dan menunjukkan aktivitas kuat terhadap *B. subtilis* dengan diameter hambat 10 mm pada konsentrasi 30%. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak n-heksan *F. decipiens* memiliki aktivitas antibakteri paling kuat dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak fraksi n-heksan.

Kata kunci: *Filicium decipiens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, ekstrak n-hexan, ekstrak metanol

Pendahuluan

Penyakit infeksi hingga saat ini masih merupakan penyebab tertinggi angka kesakitan dan kematian di dunia terutama di negara-negara berkembang.¹ *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* adalah bakteri penyebab infeksi yang paling umum ditemukan pada kasus-kasus infeksi. Pemberian antibiotik merupakan penanganan yang digunakan untuk mengatasi penyakit-penyakit ini. Walaupun demikian pemberian antibiotik dalam jangka waktu lama dapat menimbulkan masalah resistensi bakteri terhadap antibiotik. Antibiotik dari tanaman dapat menjadi alternatif yang lebih aman untuk mengatasi penyakit akibat infeksi bakteri.

Penelitian untuk mendapatkan senyawa antibiotik baru dari tanaman telah menunjukkan hasil yang positif.^{2,3} Salah satu kendala penelitian antibiotik dari bahan alam adalah sulit mendapatkan bahan mentah dalam jumlah yang besar. Pohon *Filicium decipiens* yang dikenal dengan nama lokal kiara payung atau ki sabun adalah tanaman yang mudah didapat dan mampu menghasilkan bahan mentah dalam jumlah yang besar. Dari penelitian terdahulu diketahui bahwa ekstrak etanol daun *F. decipiens* memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri gram positif *S.aureus*, namun negatif terhadap gram negatif *Escherichia coli* dan terhadap jamur *Candida albicans*.⁴ Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri dari *F. decipiens* adalah senyawa golongan saponin karena *F. decipiens* memiliki kadar saponin tinggi mencapai 12,5%.⁴ Saponin secara umum adalah senyawa glikosida polar yang dapat ditarik dengan pelarut-pelarut golongan polar seperti metanol, etanol, dan air. Selain senyawa golongan saponin, diketahui juga bahwa pada tanaman *F. decipiens* terdapat senyawa-senyawa golongan terpenoid dan steroid⁵ yang termasuk ke dalam senyawa-senyawa golongan non polar. Senyawa-senyawa golongan non polar mudah diekstrak dengan pelarut-pelarut non polar seperti benzen dan n-heksan. Senyawa-senyawa dari golongan saponin, terpenoid, dan steroid dari beberapa jenis tanaman dikenal memiliki aktivitas antibakteri yang cukup kuat.^{6,7} Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri *S. aureus* dan bakteri *B. subtilis* dari ekstrak *F. decipiens* yang ditarik dengan dengan pelarut metanol, aktivitas antibakteri ekstrak *F. decipiens*

Research Article

dari fraksi n-heksan ekstrak metanol dan aktivitas antibakteri ekstrak *F. decipiens* yang ditarik dengan pelarut n-heksan.

Metode

Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan adalah timbangan digital, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, kertas saring, evaporator, alat sokhlet, inkubator, cawan petri *disposable*. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *F. decipiens* yang didapat dari daerah Ciheuleut, Kota Bogor dan telah dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, dengan nomor keterangan 1769/IPH.1.01/If.07/IX/2019, biakan bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis* dari Lab. Bioteknologi LIPI Bogor, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), n-heksan, metanol, kloroform, dimetil sulfoksida (DMSO), standar mc Farland 1×10^8 CFU, *aquadest*. Bahan-bahan yang digunakan berkualitas pro analisis produk dari Merck & Co., Inc. dan Sigma-Aldrich Inc.

Ekstraksi Sampel

Sebanyak masing-masing 100 gram serbuk kering *F. decipiens* diekstrak dengan 1 liter metanol dan 1 liter n-heksan menggunakan alat sokhlet pada suhu 70° C sampai pelarut jernih. Masing-masing filtrat kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum evaporator* sehingga didapat ekstrak metanol pekat dan ekstrak n-heksan pekat. Ekstraksi dilakukan tiga kali untuk mendapatkan jumlah ekstrak pekat yang cukup banyak. Ekstrak metanol pekat selanjutnya difraksinasi dengan n-heksan. Fraksinasi dilakukan dengan mengambil 20 gram ekstrak metanol pekat dan dilarutkan dalam 200 mL *aquadest*. Larutan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 200 mL n-heksan sehingga terbentuk dua fraksi. Fraksi n-heksan dipisahkan dari fraksi air dan dipekatkan sehingga didapatkan ekstrak fraksi n-heksan dan ekstrak metanol. Metoda ekstraksi dan jenis pelarut digunakan berdasarkan pada prinsip ekstraksi bahan alam Harbone.⁸

Uji Aktivitas Antibakteri *S. aureus*

Uji aktivitas ekstrak *F. decipiens* terhadap bakteri *S. aureus* dan *Bacillus subtilis* dilakukan menggunakan metode difusi agar Kirby-Bauer⁹ dengan sistem *pour plate*. Koloni bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis* dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL media NB, diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga

Research Article

mencapai kekeruhan sesuai dengan standar konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU per mL (standar McFarland 0,5). Suspensi bakteri digunakan selanjutnya untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan lebar daerah hambat (LDH).

Pemeriksaan KHM dilakukan dengan cara disiapkan satu seri media kemudian ditambahkan masing-masing ekstrak metanol, ekstrak fraksi n-heksan, dan ekstrak n-heksan sehingga masing-masing media memiliki konsentrasi 0% (kontrol), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan 40%. Satu mata ose bakteri diambil dari suspensi bakteri, dicelupkan pada masing-masing media NA (20 mL, 40°C), dihomogenkan, lalu dituang pada cawan petri steril sampai membeku. Cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya KHM diukur dengan membandingkan kekeruhan cawan berisi media ekstrak terhadap cawan kontrol.

Penentuan LDH dilakukan dengan cara mengambil satu mL suspensi bakteri, ditempatkan pada cawan petri steril dan ditambahkan dengan 20 mL media NA temperatur 40°C, dihomogenkan dan ditunggu sampai membeku. Kertas cakram yang telah dicelupkan ke dalam ekstrak metanol, ekstrak fraksi n-heksan, dan ekstrak n-heksan dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan 40% diletakkan di atas media NA berisi suspensi bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis* dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C. Kloramfenikol 30 mikrogram digunakan sebagai kontrol dan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Lebar Hambat yang terbentuk di sekitar piringan kertas pada biakan *S. Aureus* dan *B. subtilis* diukur dalam satuan mm dan data yang dihasilkan dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf signifikan 5%.

Hasil

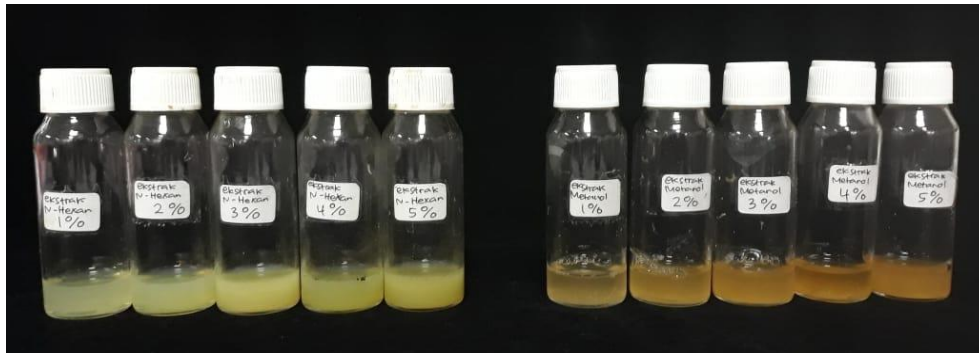
Karakteristik Ekstrak

Ekstrak yang dihasilkan dengan pelarut metanol dan n-heksan memiliki karakteristik berbeda seperti terlihat pada tabel 1 dan gambar 1.

Tabel 1 Rendemen dan Kadar Air Ekstrak *F. decipiens*

Jenis Ekstrak	Rendemen	Kadar Air
Ekstrak metanol	19,8%	6,2%
Ekstrak fraksi n-heksan	8,77%	5,4%
Ekstrak n-heksan	7,56%	5,1%

Research Article



Gambar 1 Ekstrak Metanol dan Ekstrak N-heksan Konsentrasi 1% sampai 5%

Aktivitas Antibakteri

Hasil uji KHM pada tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *F. decipiens* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *B. subtilis*, ekstrak n-heksan memiliki aktivitas baik terhadap *S. aureus* maupun *B. subtilis*, sementara ekstrak fraksi n-heksan hanya memiliki aktivitas sedang terhadap *S. aureus*.

Tabel 2 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Metanol, Ekstrak Fraksi n-heksan, dan Ekstrak n-Heksan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*

Jenis Ekstrak	Bakteri Uji	Konsentrasi ekstrak (%)											
		1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40
Ekstrak metanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ekstrak fraksi n-heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ekstrak n-heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: + Terlihat pertumbuhan bakteri
 - Tidak terlihat pertumbuhan bakteri

Daya antibakteri ditunjukkan oleh nilai LDH pada tabel 2 dan 3, dan gambar 2 dan 3. Ekstrak n-heksan menunjukkan aktivitas antibakteri dengan kategori kuat terhadap *B. subtilis* dan sangat kuat terhadap *S. aureus*, sedangkan ekstrak fraksi n-heksan hanya menunjukkan aktivitas sedang terhadap bakteri *S. aureus*.

Tabel 3 LDH Ekstrak N-heksan pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Research Article

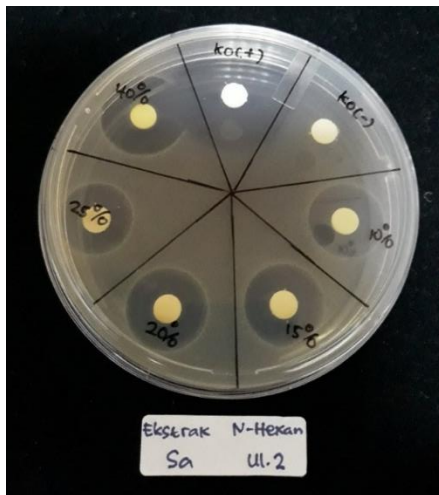
Ekstrak n-Heksan (%)	Lebar Daerah Hambat (LDH)/(mm) <i>S. aureus</i>
Kontrol (+)	28
Kontrol (-)	0
5%	0
10%	0
15%	0
20%	0
25%	0
30%	8 ^a
35%	9 ^a
40%	9 ^a

Tabel 4 LDH Ekstrak N-heksan pada Bakteri *Stapylococcus aureus* dan *B. subtilis*

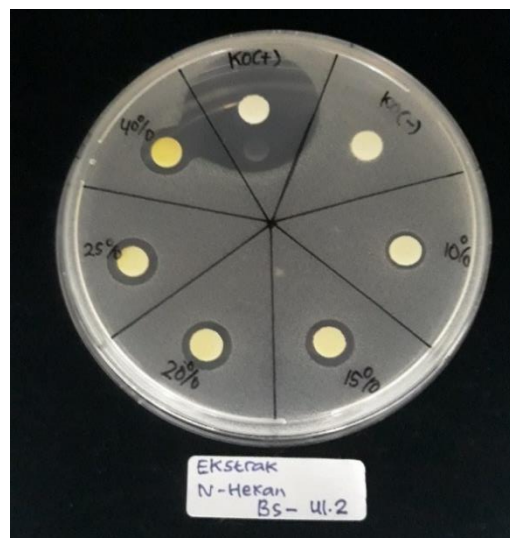
Ekstrak n-Heksan (%)	Lebar Daerah Hambat (LDH)/(mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Kontrol (+)	29	24
Kontrol (-)	0	0
1 %	0	0
2 %	11 ^a	0
3 %	11 ^a	0
4 %	13 ^{ab}	0
5 %	14 ^b	0
10%	17 ^c	7 ^a
15%	18,5 ^c	9 ^a
20%	19,5 ^c	9,5 ^a
25%	20,5 ^c	9,5 ^a
30%	21 ^c	10 ^a
35%	21 ^c	10 ^a
40%	21 ^c	10 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti superskrip yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$)





Gambar 2 Aktivitas Ekstrak N-heksan Daun *F. decipiens* Konsentrasi 1% sampai 40% terhadap *S. aureus*



Gambar 3 Aktivitas Ekstrak N-heksan Daun *F. decipiens* Konsentrasi 10% sampai 40% terhadap *S. aureus*

Diskusi

Karakteristik Ekstrak

Rendemen yang dihasilkan ekstrak metanol sebesar 19,8% jauh lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen ekstrak n-heksan sebesar 8,77%. Angka ini mengindikasikan bahwa daun *F. decipiens* mengandung lebih banyak senyawa-senyawa bersifat polar yang larut

Research Article

dalam metanol dibanding senyawa-senyawa bersifat non polar yang larut dalam pelarut n-heksan. Rendemen fraksi n-heksan sebesar 7,56% adalah sebagian dari senyawa-senyawa yang sebelumnya tertarik pelarut metanol sehingga kadar rendemennya dipastikan di bawah rendemen ekstrak metanol. Kadar air ketiga jenis ekstrak berada pada kisaran memenuhi syarat mutu ekstrak sesuai dengan parameter yang ditetapkan Depkes RI.¹⁰ Karakteristik fisik menunjukkan perbedaan warna antara ekstrak metanol, ekstrak fraksi n-heksan, dan ekstrak n-heksan. Ekstrak metanol dan ekstrak fraksi n-heksan berwarna kuning kehijauan sedangkan ekstrak n-heksan berwarna kecoklatan seperti terlihat pada gambar 1.

Aktivitas Antibakteri

Tidak adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol diduga berkaitan dengan senyawa-senyawa polar yang tertarik oleh pelarut metanol seperti senyawa-senyawa golongan fenolik dan golongan alkaloid. Senyawa-senyawa polar dari tanaman *F. decipiens* lebih memiliki aktivitas-aktivitas farmakologis seperti antidiabetes¹¹ dan anti-inflamasi¹², tapi tidak efektif sebagai antibakteri. Walaupun tidak memiliki sifat antibakteri, namun dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak metanol daun *F. decipiens* memiliki aktivitas fitotoksik yang menghambat terjadinya perkecambahannya.¹³ Ekstrak n-heksan yang difraksi dari ekstrak metanol tidak memiliki aktivitas terhadap *B. subtilis* namun menunjukkan aktivitas terhadap bakteri *S. aureus* dengan KHM dicapai pada konsentrasi ekstrak 40%. Nilai LDH ekstrak fraksi n-heksan menunjukkan hasil yang sejalan dengan nilai KHM. Nilai LDH tertinggi ekstrak fraksi n-heksan adalah 9 mm pada konsentrasi ekstrak 40%. Dari data ini dapat dinyatakan bahwa ekstrak fraksi n-heksan memiliki aktivitas sedang terhadap bakteri *S. aureus* berdasarkan parameter McDermott dan Hartley¹⁴ yaitu:

- Daerah hambat 20 mm atau lebih berarti ekstrak memiliki aktivitas sangat kuat.
- Daerah hambat 10 – 20 mm berarti ekstrak memiliki aktivitas kuat.
- Daerah hambat 5 – 10 mm berarti ekstrak memiliki aktivitas sedang.
- Daerah hambat 5 mm atau kurang berarti ekstrak memiliki aktivitas lemah.

Senyawa terduga larut pada ekstrak fraksi n-heksan adalah senyawa-senyawa golongan saponin, karena fraksinasi ekstrak metanol dengan pelarut semipolar atau polar adalah metode dasar untuk penarikan senyawa golongan saponin.¹⁵ Data dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa pada tanaman *F. decipiens* terdapat 4 senyawa saponin berbeda yaitu p-D-glucopyranosyl gypsogenic acid, p-D-glucopyranosyl medicagenic acid, *medicagenic acid*, *zanhic acid*.¹⁶ Aktivitas antibakteri *S. aureus* dari fraksi n-heksan *F. decipiens* kemungkinan ada

Research Article

kaitannya dengan kehadiran senyawa golongan saponin ini. Mengacu pada berbagai penelitian sebelumnya, diketahui bahwa saponin pada berbagai tanaman seperti *Abutilon indicum*, *Solanum trilobatum*, dan *Centella asiatica* memiliki sifat antibakteri.^{17,18,19} Aktivitas antibakteri fraksi n-heksan *F. decipien* tergolong tidak kuat walaupun kadar saponinnya cukup tinggi mungkin karena sebagian saponin pada *F. decipiens* memiliki fungsi lain yaitu sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.^{20,21}

Tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap bakteri *S. aureus* dengan diameter hambat mencapai 21 mm pada konsentrasi 30% dan menunjukkan aktivitas kuat terhadap bakteri *B. subtilis* dengan diameter hambat 10 mm pada konsentrasi 30%. Senyawa-senyawa yang diduga berkaitan dengan aktivitas antibakteri adalah senyawa-senyawa non polar golongan terpenoid terutama golongan sterol.²² Tanaman *F. decipiens* diketahui mengandung beberapa macam senyawa golongan steroid yaitu sitosterol β -D-glucoside, 3-O- β -D-glucopyranosyl kaempferol, 3-O- β -D-glucopyranosylquercetin, 3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosylkaempferol²³ dan stigmasta-7,22-dien-3-ol (spinasterol).²⁴ Beberapa penelitian telah menunjukkan kaitan yang kuat antara kehadiran senyawa-senyawa steroid pada tanaman dengan aktivitas antibakteri yang dimilikinya.²⁵ Senyawa stigmasterol bahkan diketahui memiliki daya inhibisi bakteri yang kuat pada konsentrasi rendah.²⁶ Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom.²⁷ Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis.^{28,29}

Simpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak n-heksan daun *F. decipiens* adalah ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri paling kuat terhadap bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis*, sehingga untuk penelitian selanjutnya dapat digunakan pelarut n-heksan untuk mengekstrak senyawa aktif antibakteri *S. aureus* dan *B. subtilis* dari tanaman *F. decipiens*. Senyawa aktif terduga memiliki aktivitas antibakteri adalah senyawa non polar dari golongan terpenoid atau golongan sterol.

Daftar Pustaka

Research Article

1. Mulholland EK, Adegbola. Bacterial infections - A major cause of death among children in Africa. *N.Engl.J.Med.* 2005; 352 (1):75-7.
2. Farjana A, Zerina N, Kabir Md. S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian.Pac.J.Trop.Dis.* 2014; 4(2):, Suppl. 2. P. S920-3.
3. Thiripurasundari N, Vinodkumar T, Ramanathan G. Antimicrobial potential of medicinal plant extracts against human pathogens. *Int. Res J Pharm. App Sci.* 2013; 3(4):107-9.
4. Mahyuni S, Sofihidayati S. Kadar saponin dan aktivitas antibakteri ekstrak daun *Filicium decipiens* (Wight & Arn.) Thwaites terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi.* 2018; 8(2):20-7.
5. Bahri A. Isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi aktif terhadap antioksidan ekstrak daun kerai payung (*Filicium decipiens*) (Tesis). Padang Sumatra Barat: Universitas Andalas; 2014
6. Porto TS, Rangel R, Furtado, de Carvalho TC, Martins CH, Veneziani RC, *et al.* Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules.* 2009; 14(1): 191-9.
7. Souza AB, Martins HGC, Souza GMM, Furtado AJCN, Furtado, Heleno CGV, *et al.* Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother. Res.* 2011; 25: 215-20.
8. Harborne JB. 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Technique of Plant Analysis.* 2nd edition. London (UK); Chapman and Hall: 1984.
9. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology.* 2016; 1-23.
10. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Indonesia Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan pertama. Jakarta; 2000.
11. Sasikala C, Yajaman Y. Effect of compounds isolated from *Filicium decipiens* and *Ventilagomadraspattan* against diabetic nephropathy in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian J.Pharm. Educ.* 2015; 49(2): 147-51.
12. Paramaguru R, Jagadeeshwar K, Mahendra CBK, Armstrong Vinod NAR. Evaluation of anti-inflammatory activity on the leaves of *Filicium decipiens* in experimental animal models. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011; 3(3): 243-7.
13. Bari IN, Hisashi Kato-Noguchi H. Phytotoxic effect of *Filicium decipiens* leaf extract. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2017; 17(4): 288-92.
14. McDermott SN, Hartley TF. *New datum handling methods for the quality control of antibiotic solutions and plates used in the antimicrobial susceptibility test.* 1988. *Journal of Clinical Microbiology.* 1988; 27(8): 1814-25.
15. Robinson T. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi (penerjemah: Padmawinata K). Edisi 4. Bandung Jawa Barat; Penerbit ITB: 1995.
16. Lavaud C, Voutchkine L, Massiot G, Men-oliver LL, Das BC, Laprevote O, *et al.* Saponins from the stem bark of *Filicium decipiens*. *Phytochemistry.* 1988; 47(3): 441-9.
17. Kannabiran K, Mohankumar T, Gunaseker V. Evaluation of antimicrobial activity of saponin isolated from *Solanum xanthocarpum* and *Centella asiatica*. *Int J Natl Eng Sci* 2009; 3(1): 25-8.
18. Ravi, L., Manasvi V, Praveena L. B. Antibacterial and antioxidant activity of saponin from *Abutilon indicum* leaves. *Asian J. of Pharm. and Clin. Res.* 2016; 9(9): 344-7.
19. Thanigaiarassu RR, Kannabiran K, Gopieshkanna V. Antibacterial activity of saponin isolated from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *J Appl Biol Sci.* 2008; 2(3):109-12.
20. Duganath N, Nagachandra KR, Nagasowjanya J, Sridhar S, Sushma S, Jayaveera KN. Evaluation of phytochemical and *in-vitro* antioxidant activity of *Filicium decipiens*. *Annals of Biological Research* 2010; 1(1): 134-40.
21. Mona SM, Osman-Wadah JA, Garelnabi EAE, Osman Z, Osman B, Khalid HS *et al.* Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *The Journal of Phytopharmacology* 2014; 3(4): 275-85.
22. Corrêa GM, Da Costa-Abreu VG, De Abreu-Martins DA, Aparecida J, Takahashi T, De Souza-Fontoura H, *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 6(6): 75-81.
23. Jayasinghe ULB, Balasooriya BAIS, Bandara AGD, Y. Fujimoto Y. Glycosides from *Grewia damine* and *Filicium decipiens*. *Natural Product Research* 2004; 18(6): 499-502.
24. Muthia A, Santoni A, Darwis D. Spinasterol: steroids from *Filicium decipiens* stem bark. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* 2015; 3(1): 1-5.
25. Dogan A, Otlu S, Celebi O, Aksu-Kilicle P, Gulmez-Saglam A, Nazmi A, *et al.* An investigation of antibacterial effects of steroids. *Turk J Vet Anim Sci.* 2017; 41: 302-5.
26. Yusuf AJ, Abdullahi MI, Godwin AA, Ibrahim IAA, Alebiosu CO, Yahaya M. Antimicrobial activity of stigmasteryl from the stem bark of *Neocarya macrophylla*. *Journal of Medicinal Plants for Economic Development.* 2018; 2(1): a38.
27. Madduluri, Suresh. Rao, K. Babu. Sitaram, B. *In Vitro* evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International J of PharM and Pharm Sci.* 2013; 5(4): 679-84.

Research Article

28. Ding B, Guan Q, Walsh JP, Boswell JS, Winter TW, Winter ES, *et al.* Correlation of the antibacterial activities of cationic peptide antibiotics and cationic steroid antibiotics. J. Med. Chem. 2002; 45(3): 663-9.
29. Polat ZA, Savage PB, Genberg C. *In vitro* amoebicidal activity of a ceragenin, cationic steroid antibiotic-13, against *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential. J Ocul. Pharmacol. 2011; 27(1): 1-5.