

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK BIJI BUAH PALA
(*Myristica fragrans* Houtt) TERHADAP PERTUMBUHAN
BAKTERI *Escherichia coli***

**TEST OF INHIBITORY POWER OF NUTMEG SEEDS (*Myristica
fragrans* Houtt) EXTRACT ON GROWTH OF BACTERIA
*Escherichia coli***

Raysa Syarifah¹, Fakhurrrazi, Abdul Harris³, Amalia Sutriana, Erina⁵, Winaruddin⁶

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

²Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: raysasyarifah1996@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Biji pala yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pasar tradisional Darussalam, Banda Aceh. Proses ekstraksi biji buah pala menggunakan pelarut Etanol 96% dengan tingkat konsentrasi yang berbeda yaitu 1%, 10%, 20%. Menggunakan kertas cakram kosong (*Blank disk*) yang telah dicelupkan ke dalam ekstrak biji buah pala masing-masing pengulangan dan antibiotik ampisilin yang diletakkan pada media MHA. Pengujian daya hambat dilakukan dengan metode difusi *Kirby-Bauer* menggunakan kertas cakram pada media *Mueller hinton agar* (MHA) dengan 5 perlakuan dan 3 pengulangan. Media agar diinkubasi pada suhu 36-37°C selama 24 jam. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bahwa ekstrak biji buah pala memiliki daya hambat yang lemah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Ekstrak biji buah pala pada konsentrasi 1% memiliki daya hambat sebesar 9,73 mm, konsentrasi 10% sebesar 8,5 mm, konsentrasi 20% sebesar 8 mm dan kontrol positif sebesar 20,83 mm.

Kata kunci : antibakteri, ekstrak biji buah pala, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

This study aims to determine the inhibitory power of nutmeg extract (*Myristica fragrans* Houtt) on the growth of *Escherichia coli* bacteria. The nutmeg seed used in this study was obtained from the traditional market of Darussalam, Banda Aceh. Extraction process of nutmeg seed using 96% ethanol solvent with different concentration level that is 1%, 10%, 20%. Using blank disc paper (*Blank disk*) which has been dipped into nutmeg extract of each repeating and ampicillin antibiotic placed on MHA media. Inhibitory testing was performed by the *Kirby-Bauer* diffusion method using paper discs on *Mueller hinton agar* medium (MHA) with 5 treatments and 3 repetitions. Media to be incubated at 36-37°C for 24 hours. The results of this study indicate that the nutmeg nut extraction has a weak inhibitory effect on the growth of *Escherichia coli* bacteria. The extract of nutmeg seed at concentration of 1% has inhibitory power of 9.73 mm, 10% concentration of 8.5 mm, 20% concentration of 8 mm and positive control of 20.83 mm.

Keywords : antibacterial, nutmeg extract, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Pada umumnya kebanyakan masyarakat dalam mengobati suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri sering menggunakan obat-obatan antibiotik yang mudah diperoleh. Pemakaian antibiotik secara berlebihan dan kurang terarah dapat mengakibatkan terjadinya resistensi. Timbulnya resistensi tertentu akan menyebabkan kegagalan dalam pengobatan berbagai jenis penyakit infeksi, sehingga untuk mengatasinya diperlukan bahan alami lain sebagai pengobatan alternatif (Josodiwondo dkk., 1996).

Hasil penelitian *World Health Organization* (WHO) menunjukkan bahwa terdapat beberapa tanaman obat yang berkhasiat sebagai antibakteri, salah satu tanaman tersebut yaitu tanaman pala (Gren, 2005). Pala memiliki beberapa bagian yang mana Setiap bagian dari buah pala memiliki zat aktif sebagai antimikroba (Shan dkk., 2007).

Buah pala terdiri dari 83,3% daging buah, 3,22% fuli, 3,94% tempurung biji, dan 9,54% daging biji (Permentan, 2012). Daging buah biasanya diolah menjadi manisan pala sedangkan biji dan fuli digunakan sebagai rempah-rempah dan minyak pala. Minyak pala digunakan sebagai bahan penyedap makanan, menetralkan bau yang tidak sedap, bahan pencampur minyak wangi serta juga digunakan dalam industri obat-obatan. (Nurdjannah dan Mulyono, 2007).

Ekstrak merupakan salah satu produk metabolisme sekunder, yang dihasilkan dari berbagai jaringan tanaman. Ekstrak biji pala terhadap pertumbuhan bakteri pada konsentrasi rendah mempunyai efektivitas rendah (Indrasti dkk., 2012). Biji buah pala yang telah diekstraksi memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri Gram Negatif, *Escherichia coli* ialah salah satu bakteri yang dapat dihambat pertumbuhannya (Linda dkk., 2014).

Struktur sel bakteri gram negative memiliki membran lapisan luar yang menyelimuti lapisan tipis peptidoglikan, struktur luar peptidoglikan ini adalah lapisan ganda yang mengandung fosfolipid, protein dan lipopolisakarida. Lipopolisakarida terletak pada lapisan luar dan merupakan karakteristik bakteri gram negatif (Peclzar dan Chan, 1998).

Escherichia coli merupakan bakteri patogen intestinal dan patogen ekstraintestinal yang dapat menyebabkan infeksi traktus urinarius, meningitis, dan septikemia. Sebagian besar dari bakteri ini berada dalam saluran pencernaan hewan maupun manusia selain itu bakteri ini merupakan flora normal, namun ada yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan diare (Bettelheim, 2000).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian tentang uji daya hambat ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans houut*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Rumusan Masalah

Apakah ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houutt*) memiliki daya antibakterial terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui daya hambat ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houutt*) sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Hipotesis

Ekstrak biji buah pala (*Mysistica fragrans Houtt*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang manfaat ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) sebagai antibakteri *Escherichia coli*.

MATERIAL DAN METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) dilakukan di laboratorium Herbarium jurusan KIMIA FMIPA sedangkan untuk uji daya hambat bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Kegiatan penelitian sudah dilaksanakan pada bulan Februari sampai Maret 2018.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, blender, pengaduk, *rotary evaporator*, tabung steril, inkubator, autoklaf, lemari pendingin, tabung reaksi, gelas erlemeyer, kawat osse, pipet tetes, tabung steril, cawang petri, pingset, lampu spritus, gelas ukur, kertas label, dan jangka sorong,

Bahan yang digunakan adalah biji buah pala, bakteri *Escherichia coli*, Etanol 96%, akuades, Mualer Hinton Agar (MHA), Nutrient Broth (NB), Natrium Agar (NA), *carboxy methyl cellulose* (CMC) 1%, kertas saring, kertas cakram, aluminium foil, antibiotik ampicillin, dan MC Farland 0,5.

Metode Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji daya hambat antibakteri menggunakan metode *disc diffusion* atau *Kirby-Bauer* dengan 5 perlakuan dan 3 pengulangan. Prinsip kerja metode *Kirby-Bauer* adalah mendifusikan sejumlah senyawa antibakteri pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri (Parija, 2009). Proses pemberian antibiotik dilakukan dengan cara meletakkan lempeng kertas yang mengandung antibakteri pada permukaan media yang berisi kultur bakteri (Pratiwi, 2008).

Prosedur Penelitian

Pembuatan ekstrak biji buah pala

Biji Pala yang telah diperoleh dibukak cangkangnya lalu dihaluskan, setelah dihaluskan Biji pala dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 2x24 jam sambil sesekali diaduk dan sesekali di ganti pelarutnya. Selanjutnya biji pala yang telah dimaserasi disaring sedikit demi sedikit ke dalam gelas kimia dengan menggunakan corong dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil guna mencegah penguapan. Larutan yang diperoleh tersebut dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* untuk dipisahkan antara larutan dan ekstrak, sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental

yang diperoleh kemudian disimpan dalam botol dan ditutup dengan alumunium foil, ekstrak disimpan didalam lemari es sehingga tidak terjadi pengumpalan pada ekstrak

tersebut (Zulkaidah dkk., 2014). Selanjutnya dibuat dengan serial pengenceran pada konsentrasi 1%, 10% dan 20%.

Persiapan isolate bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi diambil satu koloni menggunakan osse dari media NA miring dan dimasukkan dalam media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C selanjutnya bakteri uji siap di gunakan.

Persiapan Control

Untuk kontrol positif terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan disk cakram yang berisi antibiotik Ampicilin. Dan untuk kontrol negatif menggunakan disk cakram yang berisi aquades.

Pembuatan larutan pengencer

Pengenceran dilakukan untuk menghasilkan beberapa konsentrasi ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) yang akan digunakan untuk melihat daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan larutan *carboxymethyl cellulose* (CMC) 1% kedalam ekstrak biji buah pala 100% sebanyak jumlah perbandingan yang sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Dalam penelitian ini dibuat pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak biji buah pala 1%, 10%, dan 20%.

Uji daya hambat ekstrak biji buah pala terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Larutan uji ekstrak biji buah pala dengan berbagai konsentrasi (1%, 10%, dan 20%), larutan aquades sebagai kontrol negative dan disk cakram yang berisi antibiotik ampisilin sebagai kontrol positif, masing-masing disk berbagai konsentrasi dan disk kontrol diletakkan pada permukaan media MHA yang telah diswab isolat bakteri dengan standar Mc Farland 0,5 sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam selanjutnya dihitung zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Nuria, 2010).

Parameter penelitian

Parameter yang diukur dari penelitian ini adalah luasnya zona hambat diameter daerah bening.

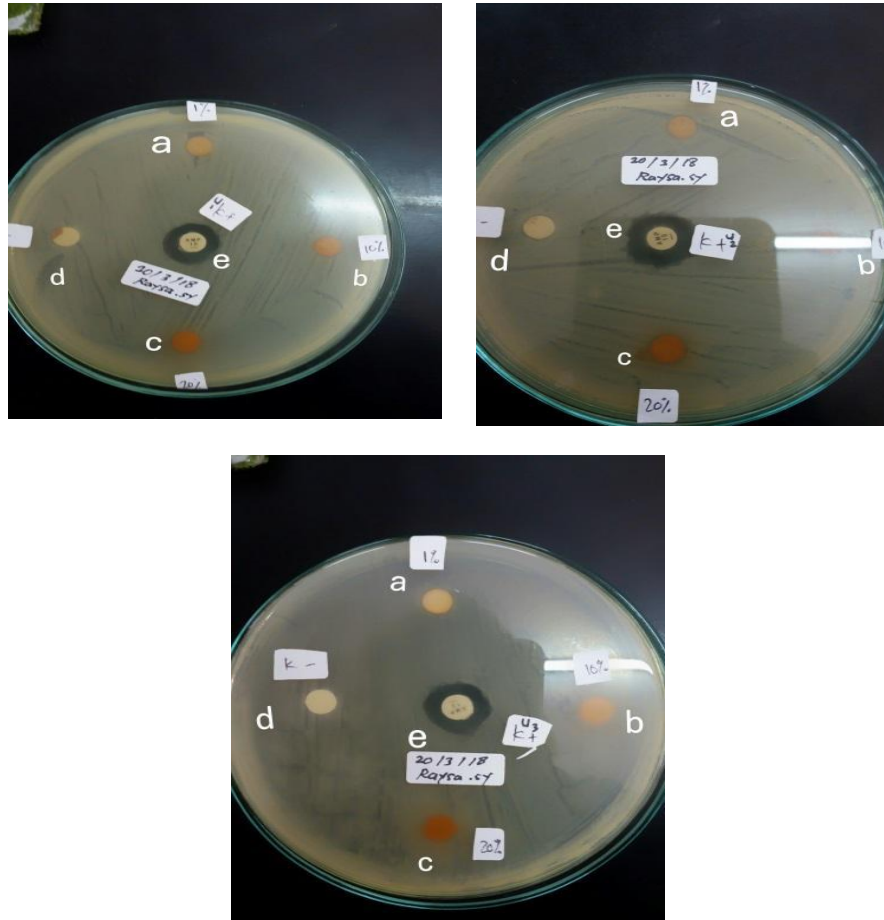
Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan melihat diameter zona hambat antar pelakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Daya Hambat Bakteri

Hasil uji daya hambat antibakteri ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) dengan metode *disc diffusion* (*Kirby-bauer*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3: Zona hambat ekstrak biji buah pala terhadap bakteri *Escherichia coli*. a) 1%, b) 10%, c) 20%, d) kontrol negatif: aquades, e) kontrol positif ampisil.

Tabel 1. Rata-Rata diameter Zona Hambat (mm) Yang Terbentuk.

Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
K-	-	-	-	-
K+	21	18,9	22,6	10,8
1%	10	9,4	9,8	9,7
10%	7,8	8,8	8,9	8,5
20%	7,4	8,3	8,4	8

Berdasarkan data pada tabel 1 didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol 96% biji buah pala dengan konsentrasi 1%, 10%, maupun 20% tidak dapat memberikan daya hambat yang besar pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Uji daya hambat antibakteri ekstrak biji buah pala menggunakan metode Kirby-bauer. Untuk konsentrasi 1% zona hambat yang dihasilkan terhadap bakteri *Escherichia coli* rata-rata sebesar 9,73 mm, konsentrasi 10% zona hambat yang dihasilkan rata-rata sebesar 8,5 mm, dan untuk 20% zona hambat yang dihasilkan rata-rata sebesar 8 mm. Hasil yang didapatkan

dalam penelitian ini bahwa ekstrak biji buah pala memiliki daya hambat yang lemah pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang tidak melebihi angka 10 mm. Hal ini

didasarkan standar kriteria CLSI (*Clinikal Laboratory Institue*) yang menyatakan adanya zona hambat dapat dilihat dari terbentuknya zona bening. Dimana 0 mm dinyatakan tidak ada aktifitas, 6-10 mm dinyatakan lemah, 11-20 mm dinyatakan sedang dan 21-30 mm dinyatakan kuat (Morales dkk., 2003).

Pada umumnya, diameter zona hambat cenderung meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Tetapi pada penelitian ini terjadi hal yang sebaliknya yaitu diketahui bahwa diameter zona hambat yang terbentuk menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) yang terkandung pada *paper disc*. Menurut Nurainy dkk. (2008), semakin kental larutan ekstrak yang digunakan maka larutan ekstrak semakin tidak dapat berdifusi secara baik dalam media agar. Konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi akan mempengaruhi kekentalan larutan ekstrak. Faktor lain yang berpengaruh terhadap akitvitas antibakteri seperti pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi komponen-komponen bioaktif dari tanaman untuk mencapai tujuan dari sasaran ekstraksi komponen juga sangat berpengaruh terhadap daya hambat antibakteri (Moyler, 1995).

CMC merupakan zat dengan warna putih atau sedikit kekuningan, tidak berbau dan tidak berasa, dan berbentuk granula yang halus atau bubuk yang bersifat hidroskopis. Fungsi dari CMC adalah sebagai pengental, penstabil emulsi atau suspensi dan bahan pengikat (Tranggono, 1990). Selain itu dapat juga di sebabkan oleh faktor suhu inkubasi, waktu inkubasi, ketebalan media agar, komposisi media, ukuran lempeng dan jarak cakram antimikroba (Mickel dkk., 2003).

Hasil uji fitokimia yang dilakukan oleh Thomas dan Krishnakumari (2015), bahwa analisis kualitatif dari ekstrak biji pala (*Myristica fragrans Houtt*) mengkonfirmasi adanya metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol dan tripenoid. Sesuai dengan pernyataan Sari (2006), bahwa suatu bahan alam dapat bersifat sebagai antibakteri disebabkan oleh zat aktif yang terdapat di dalamnya. Hal ini juga diperkuat Rohyani dkk. (2015), kandungan metabolisme sekunder tumbuhan yang memiliki senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, tanin, saponin, antrakuinon dan terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat antibakteri, serta sebagai antimikroba dan antivirus.

Menurut Radji (2011), perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri. Bakteri Gram negatif hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat, maka dinding bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* lebih rentan terhadap gangguan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Terdapat faktor lain yang dapat mempengaruhi kemampuan difusi senyawa aktif terhadap medium seperti toksisitas bahan uji, interaksi antar komponen medium dan kondisi lingkungan mikro *in vitro*. Mekanisme kerja dari ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel bakteri (Kaawoan dkk., 2016).

Pada penelitian ini digunakan aquades sebagai kontrol negatif dan hasil yang didapatkan yaitu tidak terbentuknya zona hambat di sekitar disk yang berisi aquades. Hal ini dikarenakan aquades merupakan larutan yang netral sehingga tidak terdapat zat antibakteri (kaawoan dkk., 2016). Untuk kontrol positif digunakan antibiotik ampisillin, dimana pada data diatas dinyatakan bahwa antibiotik ampisillin memiliki

daya hambat yang tinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan rata-rata 20,83 mm.

Menurut Tizard (2004), struktur sel *Escherichia coli* dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. *Escherichia coli* mempunyai dinding sel yang kaku, berpori dan memberikan bentuk serta proteksi. Permukaan luar terdiri dari lipopolisakarida (Quinn dkk., 2002). Antibiotik merupakan senyawa alami maupun sintetik yang mempunyai efek menekan atau menghentikan proses biokimiawi didalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh mikroba (Sholeha, 2005). Ampisilin mempunyai keaktifan melawan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif dan merupakan antibiotika spektrum luas yang bekerja dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel oleh bakteri (Brander dkk., 1991).

Mekanisme antibiotik ampisilin sebagai antibakteri dilakukan dengan cara penghancuran terhadap dinding peptidoglikan pada sel bakteri. Hal ini disebabkan karena gugus amino pada ampisilin mampu menembus membran terluar (*outer membrane*) pada bakteri gram negatif seperti bakteri *Escherichia coli* (Milanda dkk, 2014),

PENUTUP

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil, bahwa ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) memiliki daya hambat yang lemah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu pengujian uji daya hambat ekstrak biji buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) terhadap jenis pelarut dan pengencer lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Bettelheim.K.A. 2000. Role of non O157 VTEC. *J. Appl. Symp. Microbiol. Suppl.*
- Brander, G.C., D.M. Pugh, R.J. Bywater, R.J, dan W.L. Jenkins. 1991. *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. 5th Ed. ELBS, Bailliere Tindall.
- Green, J. 2005. *Terapi Herbal Pengobatan Alami Mengatasi Bakteri*. Jakarta: Prestasi Pusaka Raya.
- Indrasti, N. S., Suprihatin dan Setiawan, W. K. 2012. Kombinasi kitosan ekstrak pala sebagai bahan anti bakteri dan pengawet alami pada filet kakap merah (*Lutjanus Sp*). Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 22 (2).
- Josodiwondo. S. U.C., Warsa, Soebiandrio, dan Soedarmono.1996. Perkembangan kuman terhadap antimikroba saat Ini. *Majalah Kedokteran Indonesia. Ikatan Dokter Indonesia*. Jakarta. 46(9): 467.
- Kaawoan. P. T., Jemmy dan V.S. Krista . 2016. Uji daya hambat ekstrak buah pala (*Myristica fragrans Houtt*) terhadap bakteri penyebab *Periodontitis porphyromonas gingivalis* secara *in vitro*. *Jurnal e-GiGi (eG)*, 2(4).
- Linda., Achmad. R, dan Dewi.T. 2014. Pengaruh ekstrak biji pala (*Myristica fragrans*) terhadap jumlah eritrosit dan leukosit pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). *e-Jipbiol* Vol. 3: 1-8. ISSN : 2338-1795.

Mickel. A. K. P., S. Sharma dan Chogle. 2003. Effectiveness of stan- nous fluoride and Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *J. Endod* 29 (4):259–60.

- Milanda.T., C.S. Bonar, A.F.K. Sri. 2014. Deteksi gen resistensi ampisilin (Bla) pada *Escherichia coli* isolat klinik dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*. 3(3).
- Morales, G., S. Patricia, M. Arlett, P. Adrian, A. Luis, L. Oscar, dan B. Jorge. 2003. Secondary metabolisme from medical plant from northern cile: Antimicrobial Activity and Biototoxicity Against *Artemia salina*. *Journal of The Chilean Chemical Society*, 48: 13-18.
- Moyler, D.A. 1995. *Oleoresins, Tinctures and Extracts*. Dalam Asrurst. P. R. (ed). Food Flavorings. Blackie Academic & Profesional. New York.
- Nurdjannah dan MSulyono. 2007. *Teknologi Pengolahan Pala*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. IPB: Bogor.
- Parija, S. Chandra. 2009. *Textbook of Microbiology and Immunology*. Elsevier. Jakarta.
- Peraturan Menteri Pertanian. 20012. Nomor 53/Permentan/OT.140/9/2012. *Pedoman Penanganan Pascapanen Pala*. Peraturan Menteri Pertanian. Jakarta.
- Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Yogyakarta.
- Quinn P.J., B.K. Markey, M.E Carter, W.J. Donell, F.C. Leonard . 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Radji, M. 2011. *Mikrobiologi*. EGC. Jakarta.
- Rohyani, I. S., Aryanti, E. Suropto. 2015. Kandungan Fitokimia Beberapa Jenis Tumbuhan Lokal Yang Sering Dimanfaatkan sebagai Bahan Baku Obat Di Pulau Lombok. Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 2(1).
- Sari, L. O. R. K. 2006. Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3).
- Shan. B., Cai. Y. Z, Brooks J. D and Corke. H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medical herb extracts. *International journal of food microbiology*. 117 112-119.
- Sholeha, T.U. 2015. Uji kepekaan terhadap antibiotik. *Juke Unila* 9(5).
- Thomas, R. A dan Krisnakumar. 2015. Phytochemical profiling of *Myristica fragrans* seed extract with different organic solvents. *Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research*. 1(8).
- Tizard IR. 2004. *Veterinary Immunology an Introduction*. 7th Ed. USA: Saunders.
- Tranggono. 1990. Bahan Tambahan Pangan (*food additives*). Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Zulkaidah., R. Achmad, D. Fatma. 2014. Pengaruh pemberian ekstrak biji buah pala (*Myristica Fragrans Houtt*) terhadap albumin, globulin pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*). *e-Jipbiol* 27(3).