



Perbandingan efektivitas antibakteri *handwash* dengan bahan aktif ekstrak daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*

Nuri Ariba Khoirunnisa ¹, Dewi Ratnasari ^{*1}, Jenta Puspariki ¹

¹ Program Studi D3 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Holistik

*Korespondensi: Jl. Terusan Kapten Halim KM. 09, Salammulya Pondoksalam Purwakarta

Email : dewiratnasari@stikesholistic.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang. Menjaga kebersihan tangan merupakan salah satu bentuk pelaksanaan perilaku hidup sehat dan bersih (PHBS). *Handwash* mempunyai peran yang penting dalam menjaga kebersihan tangan. Selama ini *handwash* yang beredar masih menggunakan bahan aktif sintetis, dan yang berbahan aktif alami masih sangat terbatas. Indonesia memiliki banyak flora dan fauna yang bermanfaat untuk pengobatan. Tanaman yang dapat dimanfaatkan aktivitasnya sebagai antibakteri adalah tanaman Pala (*Myristica fragrans* Houtt).

Tujuan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas antibakteri dari *handwash* dengan bahan aktif ekstrak etanol daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap bakteri (*Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*)

Metode penelitian. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental, dengan konsentrasi *handwash* ekstrak etanol daun Pala dengan konsentrasi dosis 100%, 75%, 50%, basis sabun dan Dettol 60% menggunakan metode difusi sumuran. Setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali dengan parameter pengujian antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*. Diameter yang diperoleh kemudian dihitung rata-ratanya.

Hasil penelitian. Hasil uji efektivitas antibakteri *handwash* ekstrak daun Pala yang diperoleh dapat menghambat bakteri *Propionibacterium acnes* dengan kuat pada konsentrasi 100%, sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* memiliki daya hambat lemah yang relatif tidak berbeda dengan kontrol negatif (*basis sabun*). Adapun kontrol positif menggunakan Dettol dapat menghambat kuat pada kedua bakteri.

Simpulan. *Handwash* ekstrak etanol daun pala memiliki aktivitas antibakteri hanya pada *Propionibacterium acnes* pada konsentrasi 100% dengan daya hambat sebesar 13,6 mm.

Kata kunci: *Handwash*, Daun Pala, Antibakteri, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Background. Maintaining hand cleanliness is a form of implementation of healthy and clean living behavior (PHBS). Handwash has an important role in maintaining hand hygiene. During this time the handwash circulating still uses synthetic active ingredients, and those made from natural active are still very limited. Indonesia has many flora and fauna that are useful for treatment. Plants that can be used as antibacterial activities are nutmeg plants.

Objective. This study aims to determine the effectiveness of the antibacterial of the handwash with the active ingredient of nutmeg leaf ethanol extract (*myristica fragrans* houtt) on bacteria (*propionibacterium acnes* and *escherichia coli*)

Research methods. This study was conducted experimental, with the concentration of the Handwash of Nutmeg Leaf Ethanol Extract with a dose of 100%, 75%, 50%, soap base and 60% Dettol using a well diffusion method. Each treatment is repeated five times with antibacterial testing parameters on the bacterium *propionibacterium acnes* and *Escherichia coli*. The diameter obtained is then calculated average.



Research result. Antibacterial Effectiveness Test Results Handwash of nutmeg leaf extract obtained can inhibit the bacterium *Propionibacterium acnes* strongly at a concentration of 100%, whereas in *Escherichia coli* bacteria have a weak inhibition that is relatively no different from negative control (soap base). The positive control using Dettol can inhibit strong in both bacteria.

Conclusion. Handwash Ethanol extract of nutmeg leaf has antibacterial activity only in *Propionibacterium acnes* at a concentration of 100% with an inhibitory power of 13.6 mm.

Keywords: Handwash, Nutmeg leaves, Antibacterial, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Salah satu elemen terpenting dalam kehidupan sehari-hari adalah kebersihan; ini adalah kondisi bebas dari kotoran, penyakit, dan hal-hal yang dapat mengganggu kesehatan. Selama aktivitas sehari-hari, tangan sering kali terkontaminasi oleh mikroba, menjadikannya perantara yang memungkinkan mikroba masuk ke dalam tubuh. Penggunaan sabun merupakan salah satu cara untuk menjaga tangan bersih^[1]. Menjaga kebersihan tangan merupakan salah satu bentuk pelaksanaan perilaku hidup sehat dan bersih (PHBS).

Bakteri dapat berkembang biak pada suhu yang hangat dan lembab. Kita dapat menemukan banyak bakteri pada kulit dan saluran pencernaan manusia dan hewan. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) merupakan bakteri anaerob gram positif yang berbentuk batang yang merupakan flora alami kulit manusia. *P. acnes* berkembang biak di dalam folikel dan pori-pori kulit dan dapat menyebabkan jerawat pada kulit manusia^[2]. Adapun bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri anaerob fakultatif gram negatif yang berbentuk batang yang dapat ditemukan di saluran pencernaan manusia. *E. coli* termasuk dalam flora usus normal, tetapi juga dapat menyebabkan penyakit usus pada manusia^[3].

Handwash mempunyai peran yang penting, karena tangan merupakan salah satu jalan masuknya penyakit ke dalam tubuh manusia, oleh karena itu kebersihan tangan sebaiknya senantiasa dijaga. Selama ini handwash yang beredar masih menggunakan bahan aktif sintetis, dan yang berbahan aktif alami masih sangat terbatas.

Indonesia memiliki banyak flora dan fauna yang bermanfaat untuk pengobatan. Tanaman yang dapat dimanfaatkan aktivitasnya sebagai antibakteri adalah tanaman Pala (*Myristica fragrans* Houtt).

Pala adalah salah satu tanaman yang tumbuh subur di Purwakarta. Penduduk setempat mengolah Pala sebagai bahan olahan makanan, terutama bagian buah dan bijinya. Pala adalah tanaman yang menguntungkan dengan banyak manfaat, tiap bagian tanamannya berguna^[4]. Hasil penelitian selain buah dan bijinya menunjukkan bahwa metabolit sekunder tanaman pala daun pala mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, dan saponin^[4] yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antijamur, dan antioksidan^[4]. Penelitian yang dilakukan oleh Atika Pratiwi menunjukkan bahwa sediaan cair ekstrak daun pala memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* akan tetapi tidak pada *Propionibacterium acnes* sehingga dibutuhkan formula sediaan yang baru^[5]. Dengan demikian dibuatlah penelitian dengan formulasi sediaan yang baru untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak daun pala terhadap bakteri. Perbedaan antara penelitian yang dilakukan dengan penelitian sebelumnya yaitu dilakukannya uji antibakteri dengan formula sediaan Pala pada tiga konsentrasi yakni 100%, 75%, dan 50%. Selain konsentrasi, perbedaan lainnya adalah metode pengujian antibakteri yang digunakan, metode yang digunakan yaitu metode difusi sumuran. Metode sumuran dipilih, karena sampel sediaan yang dimasukkan kedalam sumuran menghasilkan proses osmosis lebih homogen dan efisien sehingga dapat diperoleh data uji antibakteri yang lebih

akurat^[6]. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efektivitas antibakteri dari *handwash* dengan bahan aktif ekstrak etanol daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap bakteri (*Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*).

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian "Perbandingan Efektivitas Antibakteri *Hand Wash* Dengan Bahan Aktif Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*" menggunakan metode penelitian eksperimental, dengan objek penelitian adalah *hand wash* ekstrak daun pala pada lima konsentrasi b/v yaitu 100%, 75%, 50%, *hand wash* tanpa ekstrak (basis sabun) dan sabun cair Dettol 60%.

Parameter pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli* digunakan lima kali untuk setiap perlakuan. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata.

1. Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, rak tabung, inkubator, autoklaf, mikropipet, tip mikropipet, timbangan digital, erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, bunsen, batang pengaduk, *cork borer*, *hot plate*, kertas coklat dan tali kasur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *handwash* ekstrak daun pala, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), bakteri *Propionibacterium acnes*, bakteri *Escherichia coli*, larutan McFarland, Aquadest steril

2. Pembuatan Ekstrak

60 gram daun pala yang sudah kering dimaserasi alkohol 70% selama 24 jam. Setelah itu disaring, pisahkan filtrat dengan simplisia daun pala, ambil bagian filtratnya (filtrat1). Simplisia daun pala kemudian direndam kembali selama 24 jam, dipisahkan dan disaring, ambil kembali bagian filtratnya (filtrat 2). Simplisia kembali direndam selama 24 jam, dipisahkan dan disaring, ambil kembali bagian filtratnya

(filtrat 3). Gabungkan filtrat 1, 2 dan 3 sebagai ekstrak daun pala yang akan digunakan, kemudian dilakukan pengentalan ekstrak, lalu identifikasi kandungan metabolit sekundernya melalui uji fitokimia.

3. Uji Skrining Fitokimia

Untuk menguji alkaloid digunakan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. 1mL ekstrak ditambahkan dengan 1 mL HCl dan 9 mL Aquadest, dipanaskan selama dua menit, dinginkan, dan saring. Fitrat dibagi menjadi tiga tabung reaksi, masing-masing tabung ditetes pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Untuk menguji flavonoid, ekstrak pekat diencerkan dengan metanol kemudian dipanaskan dengan api tidak langsung. Selanjutnya, 0,1 gram serbuk Mg ditambah 5 tetes HCl pekat ditambahkan. Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan mengencerkan 1 mL ekstrak pekat dengan 0,5 mL Kloroform, juga 0,5 mL asam asetat anhidrida, dan secara perlahan menambahkan 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi [18]. Mengencerkan 1 mL ekstrak pekat dengan 9 mL Aquadest panas digunakan untuk mengidentifikasi Saponin. Kemudian, dikocok dengan kuat untuk melihat perubahannya [18]. Untuk mengidentifikasi tanin, 1mL ekstrak pekat dicampur dengan 10 mL aquadest, lalu disaring, filtrat yang dihasilkan ditambah larutan $FeCl_3$ 1%.

4. Pembuatan Larutan McFarland 0,5

Langkah pembuatan larutan standar McFarland 0,5 adalah sebagai berikut:

- Pembuatan larutan $BaCl_2$ 1% dengan cara menimbang 1 gram $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades di dalam labu ukur sampai larutan homogen. Larutan kemudian disimpan dalam botol coklat kaca bertutup rapat.
- Pembuatan larutan H_2SO_4 1% dengan cara menimbang 1 ml H_2SO_4 pekat kemudian dilarutkan dalam aquades 100 ml di dalam labu ukur, lalu dihomogenkan.
- Pembuatan larutan McFarland 0,5 dengan cara menyiapkan 0,5 ml larutan $BaCl_2$ 1% kemudian



dimasukkan ke dalam beaker glass dan tambahkan 9,95 ml larutan H_2SO_4 1%. Campuran dikocok sampai homogen lalu pindahkan ke dalam botol coklat kaca dan tutup rapat. Selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. Pembuatan Larutan NaCl 0,9% (b/v)

Untuk membuat larutan NaCl 0,9%, 0,9 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquades di dalam labu ukur. Homogenkan dan pindahkan ke botol coklat kaca bertutup rapat. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

6. Pembuatan Media

Media yang disiapkan adalah media NA (Nutrient Agar) yang digunakan untuk meremajakan bakteri yang akan diuji dan media MHA (Mueller Hinton Agar) yang digunakan sebagai media tanam bakteri uji. Adapun pembuatan media, sebagai berikut:

- Media Nutrient Agar (NA) dibuat dengan menimbang 1,8 gram NA dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 90 ml dalam erlenmeyer. Larutkan diatas hot plate sampai larut. Setelah larut tutup erlenmeyer dengan sumbat kemudian disterilisasi menggunakan autoclaf. Setelah disterilkan, larutan NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml. Tutup tabung reaksi dengan sumbat dan dimiringkan sampai agar NA mengeras.
- Media Mueller Hinton Agar (MHA) dibuat dengan menimbang sebanyak 10,2 gram MHA kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 300 ml dalam erlenmeyer. Aduk hingga larut, dan tutup dengan sumbat dan disterilkan pada autoclaf.

7. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disterilisasi. Alat dan bahan dibungkus dengan kertas coklat dan diikat dengan benang kasur. Selanjutnya dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan autoclaf.

8. Peremajaan Bakteri

Bakteri yang diperoleh untuk penelitian ini harus diremajakan terlebih dahulu, agar bakteri tersebut tetap hidup ketika pengujian dilakukan. Jarum ose digunakan untuk mengambil biakan murni dan dimasukkan ke dalam media miring tabung reaksi secara zig-zag. Penggeraan dilakukan secara aseptik, berdekatan dengan api bunsen. Setelah itu, tutup tabung reaksi ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

9. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Setelah bakteri diremajakan, bakteri dibuat menjadi suspensi agar mudah dalam penanamannya pada media MHA. Untuk membuat suspensi bakteri, 1 ml NaCl 0,9% dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian 1 ose bakteri ditambahkan kedalamnya dan dikocok hingga homogen. Untuk memperoleh jumlah bakteri yang diharapkan, suspensi bakteri harus dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5. Untuk membandingkannya, 0,1 ml larutan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 9,9 ml NaCl 0,9%. Setelah terbentuk larutan, bandingkan kekeruhannya dengan larutan standar Mc. Farland.

10. Penyiapan Larutan Sampel Sabun Uji

Sampel yang digunakan untuk pengujian adalah sabun ekstrak pala dengan konsentrasi ekstrak daun pala 50% (F1), 75% (F2), dan 100% (F3), sampel hand wash tanpa ekstrak (K-) dan sabun antibakteri bermerk Dettol 60% (K+). Ekstrak daun pala dengan konsentrasi 75% dibuat dengan cara diambil ekstrak daun pala sebanyak 3,75 ml dan dilarutkan dengan aquadest steril 1,25 ml. Sedangkan ekstrak daun pala konsentrasi 50% dibuat dengan cara diambil ekstrak daun pala sebanyak 2,5 ml dan dilarutkan dengan aquadest steril 2,5 ml. Sediaan 100% dengan penambahan ekstrak 5 ml tanpa pengenceran. Sabun Dettol 60% dibuat dengan cara diambil sabun Dettol sebanyak 60 ml dan dilarutkan dengan aquadest steril 40 ml.



11. Uji Antibakteri

Bila kekeruhan suspensi telah sesuai dengan larutan Mc. Farland yang dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhan larutan Mc. Farland dengan suspensi bakteri dengan latar belakang kertas bergaris hitam putih, selanjutnya 0,1 ml suspensi bakteri (*Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*) ditambahkan pada 100 ml MHA, kocok homogen dan tuang ke petridis sebanyak 40 ml. Tunggu mendingin, buat lima lubang sumuran tiap petridis. Beri label dengan nama hand wash ekstrak daun pala dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, *handwash* tanpa ekstrak sebagai kontrol negatif dan sabun cair antibakteri bermerk Dettol sebagai kontrol positif. Semua proses dilakukan secara aseptis, dekat dengan api bunsen. Masukkan larutan sampel sabun uji yang sudah dibuat, masing-masing lubang larutan sampel yang masuk sebanyak 500 μ l. Masukkan ke dalam inkubator dengan suhu

37° C selama 24 jam. Setelah 24 jam, amati dan ukur zona hambat yang terbentuk. Catat dan hitung zona hambat yang didapatkan. Setelah diperoleh hasilnya dibandingkan hasil penelitian dengan standar kriteria daya antibakteri oleh Davis and Stout^[7].

Tabel 1. Kriteria daya antibakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
< 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
> 20 mm	Sangat Kuat

HASIL PEMBAHASAN

HASIL

Hasil uji antibakteri *handwash* ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter zona hambat pada bakteri *Propionibacterium acnes*

Pengulangan	Diameter Zona Hambat (mm)				
	F1	F2	F3	K-	K+
P1	6	15	12,5	1,5	16,5
P2	5,5	10	12,5	3	16
P3	10	10	10	4,5	15,5
P4	10	10	17	2,5	15
P5	6,5	10	16	0	15,5
Rata-rata	7,6	11	13,6	2,3	15,7
Kategori	Sedang	Kuat	Kuat	Lemah	Kuat

Keterangan:

P1= *P. acnes* pengulangan 1; P2= *P. acnes* pengulangan 2; P3= *P. acnes* pengulangan 3; P4= *P. acnes* pengulangan 4; P5= *P. acnes* pengulangan 5

F1= Formulasi 50%; F2= Formulasi 75%; F3= Formulasi 100%; K- (Kontrol negatif) basis sabun; K+ (kontrol positif) Dettol 60%

Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa rata-rata zona hambat *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi konsentrasi 100% (F3) terbentuk zona hambat 13,6 mm dengan kategori daya hambat kuat, konsentrasi 75% (F2) terbentuk zona hambat 11 mm dengan kategori daya hambat kuat, konsentrasi 50% (F1) adalah 7,6 mm dengan kategori daya hambat sedang,

kontrol negatif (K-) terbentuk zona hambat 2,3 mm dengan kategori lemah dan kontrol positif (K+) terbentuk zona hambat 15,7 mm dengan kategori daya hambat kuat.

Hasil uji antibakteri *handwash* ekstrak dan pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 3.



Tabel 3. Diameter zona hambat pada bakteri *Escherichia coli*

Pengulangan	Diameter Zona Hambat (mm)				
	F1	F2	F3	K-	K+
E1	5	3,5	4	6	12,5
E2	3	3,5	4,5	6	11
E3	5	4	4	4,5	10,5
E4	2,5	4	4,5	0	12,5
E5	2,5	4	5,5	4	14
Rata-rata	3,6	3,8	4,5	4,1	12,1
Kategori	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah	Kuat

Keterangan:

E1= *E. coli* pengulangan 1; E2= *E. coli* pengulangan 2; E3= *E. coli* pengulangan 3; E4= *E. coli* pengulangan 4;

E5= *E. coli* pengulangan 5

F1= Formulasi 50%; F2= Formulasi 75%; F3= Formulasi 100%; K- (Kontrol negatif) basis sabun; K+ (kontrol positif) Dettol 60%

Pada Tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata zona hambat pada bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 100% (F3) terbentuk zona hambat 4,5 mm dengan kategori daya hambat lemah, konsentrasi 75% (F2) terbentuk zona hambat 3,8 mm dengan kategori daya hambat lemah, konsentrasi 50% (F1) adalah 3,6 mm dengan kategori daya hambat lemah, kontrol negatif (K-) terbentuk zona hambat 4,1 mm dengan kategori lemah dan kontrol positif (K+) terbentuk zona hambat 12,1 mm dengan kategori daya hambat kuat.

PEMBAHASAN

Dari uji skrining fitokimia daun pala diperoleh hasil negatif untuk alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid dan saponin sedangkan hasil positif diperoleh untuk tanin. Dengan demikian metabolit sekunder yang dimiliki dalam ekstrak etanol daun pala yang terkandung dalam ekstrak pada penelitian ini adalah tanin. Hal ini diketahui karena sebelum digunakan, ekstrak daun pala diuji terlebih dahulu kandungan kimianya dengan melakukan skrining fitokimia. Tanin memiliki sifat antibakteri karena ia memiliki kemampuan untuk menginaktivasi adhesi sel bakteri dan mampu menghentikan enzim yang bertanggung jawab untuk mengangkut protein melalui membran sel^[13]. Tanin pada daun pala memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri *P. acnes* yang merupakan bakteri gram positif.

Pembentukan ikatan kompleks akan menghentikan proses sintesis protein dan menyebabkan sel bakteri menjadi lisis. Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan daya hambat antara konsentrasi ekstrak 50%, konsentrasi ekstrak 75% dan konsentrasi ekstrak 100 % yang diuji pada bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*. Daun pala memiliki daya hambat yang kuat pada *P. acnes* daripada *E. coli*. Adapun *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif, polipeptida dinding sel bakterinya tipis sehingga ikatan kompleks yang terbentuk tidak banyak dan sel bakteri tidak terhambat dengan kuat.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa handwash dengan ekstrak etanol daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) lebih efektif terhadap *Propionibacterium acnes* dibanding *Escherichia coli*. Pada *P. acnes*, formulasi 100% dan 75% menghasilkan daya hambat kuat (15,2 mm dan 11 mm), mendekati kontrol positif Dettol (15,7 mm) dan jauh melebihi kontrol negatif (2,3 mm). Sebaliknya, terhadap *E. coli*, seluruh formulasi hanya menunjukkan daya hambat lemah (maksimal 4,5 mm), masih jauh di bawah kontrol positif (12,5 mm) dan sedikit lebih tinggi dari kontrol negatif (3,4 mm). Ini menunjukkan bahwa efektivitas ekstrak daun pala bersifat selektif terhadap jenis bakteri.



DAFTAR PUSTAKA

1. BR. Tarigan, Maria Haryanti. (2023). Perbedaan Efektivitas Mencuci Tangan Menggunakan Hand Sanitizer Dengan Antiseptik Terhadap Bakteri Yang Ada Pada Tangan. *Tenaga Kependidikan* Universitas HKBP Nommensen Medan.
2. Ajay Bhatia, Ph.D., Jean-Francoise Maisonneuve, Ph.D., and David H. Persing, MD, Ph.D. (2004). *Propionibacterium Acnes And Chronic Disease*. National Library of Medicine.
3. Matthew Mueller., Christopher R. Tainter. (2021). *Escherichia Coli Infection*. *Jurnal*, National Library of Medicine.
4. Yamami, R., Fakhraina. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pala (*Myristica Fragrans*) Terhadap *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. Skripsi, Universitas Sumatra Utara Medan.
5. Atika Pratiwi, Ella Noolaela, Siti Mahyuni. (2019). Uji Daya Hambat Sediaan Cair Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt) Terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*.
6. Nurhayati, S. Lilih., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2):41-46.
7. Davis, W. W dan Stout. 1971. Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. *Microbiologi*, 22 (4): 659-665.
8. Hayati, E.K., Jannah, A., dan Fasya, A.G. 2009. Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* l) sebagai Pengawet Alami. Laporan Penelitian Kuantitatif Depag. Jakarta: Departemen Agama.
9. Kusmiyati., & Agustini Sri, W. N. (2007). Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Prophyridium cruentum*. *Biodiversitas*, 8(1):48-53.
10. Davis, W. W dan Stout. 1971. Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. *Microbiologi*, 22 (4): 659-665.
11. Sudirman, dkk. 2023. *Metodologi Penelitian 1*. Penerbit: CV. MEDIA SAINS INDONESIA.
12. Agustien, G. S., Nofriyaldi, A., & Yani, A. (2024). UJI MUTU EKSTRAK ETANOL DAUN PALA MUDA DAN DAUN TUA (*Myristica fragrans*). *Perjuangan Nature Pharmaceutical Conference*, 1(1), 65.
13. Hayati, E.K., Jannah, A., dan Fasya, A.G. 2009. Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* l) sebagai Pengawet Alami. Laporan Penelitian Kuantitatif Depag. Jakarta: Departemen Agama.