

**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* NANOPARTIKEL PERAK HASIL  
SINTESIS HIJAU YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN PALA  
(*Myristica fragrans* Houtt.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP  
POPULASI MIKROBA PADA MIE BASAH**

---

**TUGAS AKHIR**

---

**Karya tulis sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh Gelar Sarjana Teknik dari  
Universitas Pasundan**

**Oleh  
Dandy Tiara Putra  
NPM : 22.302.0087**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN  
FAKULTAS TEKNIK  
UNIVERSITAS PASUNDAN  
BANDUNG  
2026**

## ABSTRAK

### **AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* NANOPARTIKEL PERAK HASIL SINTESIS HIJAU YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN PALA (*Myristica fragrans* Houtt.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP POPULASI MIKROBA PADA MIE BASAH**

Oleh

**Dandy Tiara Putra**

**NPM : 223020087**

**(Program Studi Teknologi Pangan)**

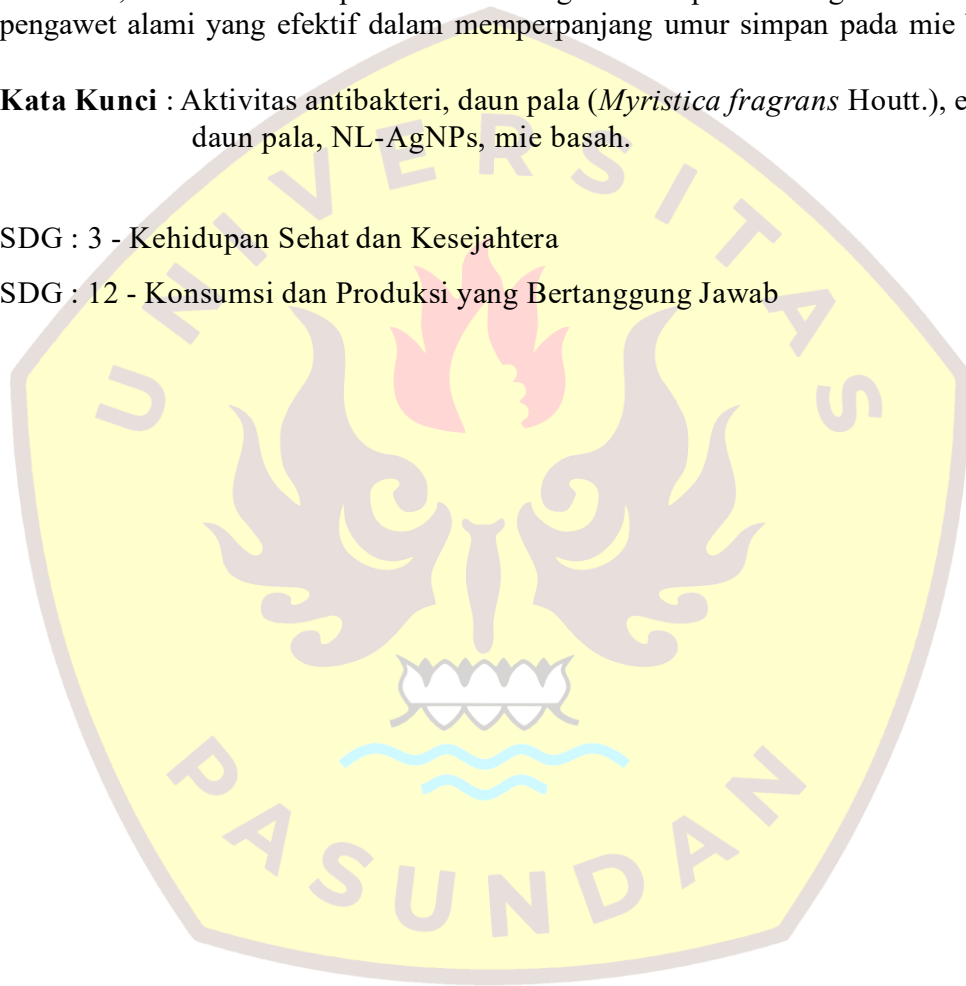
Mie basah merupakan salah satu produk pangan yang banyak dikonsumsi di Indonesia. Namun, tingginya kadar air dan pati menyebabkan mie basah rentan terkontaminasi oleh genus *Bacillus*, sehingga memiliki umur simpan yang singkat dan mendorong penggunaan pengawet sintesis yang kini mulai dihindari karena kekhawatiran terhadap dampak kesehatan. Hal ini memicu perkembangan pemanfaatan pengawet alami sebagai solusi alternatif, salah satunya adalah ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.). Akan tetapi, ekstrak daun pala memiliki antibakteri yang lebih lemah dibandingkan pengawet sintesis. Sehingga diperlukan suatu metode untuk meningkatkan efektivitasnya, salah satu caranya yaitu dengan nanoteknologi berupa sintesis menjadi nanopartikel yang dimediasi ekstrak daun pala. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik fisikokimia bubuk daun pala meliputi kadar air, warna, pH, dan aktivitas air ( $a_w$ ) dan ekstraksi dengan metode maserasi, mensintesis NL-AgNPs (*Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles*) berbasis ekstrak daun pala, menentukan aktivitas anti-*Bacillus* dari ekstrak daun pala dan NL-AgNPs, serta mengevaluasi pengaruh penambahan ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada produk mie basah. Metode penelitian diawali dengan pengeringan daun pala tua yang kemudian dihaluskan menjadi bubuk, kemudian dianalisa fisikokimia, dilanjutkan dengan ekstraksi dengan pelarut etanol 99,5% pada perbandingan 1:3 (b/v) hingga menghasilkan ekstrak kasar. Selanjutnya sintesis NL-AgNPs dengan melarutkan ekstrak daun pala kasar 10% terhadap 1 mM  $AgNO_3$ . Pengujian aktivitas antibakteri diuji dengan metode *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) yang meliputi *Well Diffusion assay* (WDA), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) terhadap *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, dan *B. megaterium*. Kemudian, mengevaluasi pengaruh ekstrak daun pala dengan konsentrasi 0,10% dan 1,00% serta NL-AgNPs 0,01% dan 0,10% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan dengan suhu ruang ( $25,00 \pm 2,00^\circ C$ ) dan pendinginan ( $4,00 \pm 2,00^\circ C$ ). Hasil penelitian bahwa bubuk daun pala memiliki nilai kadar air  $10,48 \pm 0,66\%$ , warna warna  $L^* 41,05 \pm 0,62$ ,

$a^*$   $1,87 \pm 0,22$ , dan  $b^*$   $11,72 \pm 2,89$ , pH  $4,43 \pm 0,07$ , dan  $a_w$   $0,61 \pm 0,01$ . Rendemen ekstrak kasar yang diperoleh sebesar  $11,32 \pm 0,00\%$ . Pada uji WDA menunjukkan ekstrak 10% memiliki nilai rata-rata zona hambat  $11,5 \pm 0,87$  mm hingga  $12,5 \pm 1,80$  mm, sedangkan NL-AgNPs 1% memiliki nilai rata-rata zona hambat  $11,83 \pm 0,29$  mm hingga  $15,33 \pm 4,01$  mm. Pertumbuhan *Bacillus* spp. dapat dihambat oleh ekstrak dan NL-AgNPs dengan nilai MIC masing-masing berkisar  $3,13 - 12,5$  mg/mL dan  $0,31 - 0,63$  mg/mL. Selanjutnya, *Bacillus* spp. dapat dibunuh oleh ekstrak dan NL-AgNPs dengan nilai MBC masing-masing sebesar  $>50,00$  mg/mL dan  $>5,00$  mg/mL. Pada aplikasi pangan, ekstrak dan NL-AgNPs menunjukkan kemampuan membunuh mikroba ( $0,00 \log_{10}$  CFU/mL) pada mie basah dimulai dari hari ke-3 hingga hari ke-10, baik pada suhu ruang maupun pendinginan. Dengan demikian, ekstrak daun pala dan NL-AgNPs berpotensi digunakan sebagai pengawet alami yang efektif dalam memperpanjang umur simpan pada mie basah.

**Kata Kunci** : Aktivitas antibakteri, daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.), ekstrak daun pala, NL-AgNPs, mie basah.

SDG : 3 - Kehidupan Sehat dan Kesejahtera

SDG : 12 - Konsumsi dan Produksi yang Bertanggung Jawab



## **ABSTRACT**

### **ANTI-*Bacillus* ACTIVITY OF GREEN-SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES MEDIATED BY NUTMEG LEAF EXTRACT (*Myristica fragrans* Houtt.) AND THEIR EFFECT ON MICROBIAL POPULATIONS IN WET NOODLES**

By

**Dandy Tiara Putra**

**NPM : 223020087**

**(Departement of Food Technology)**

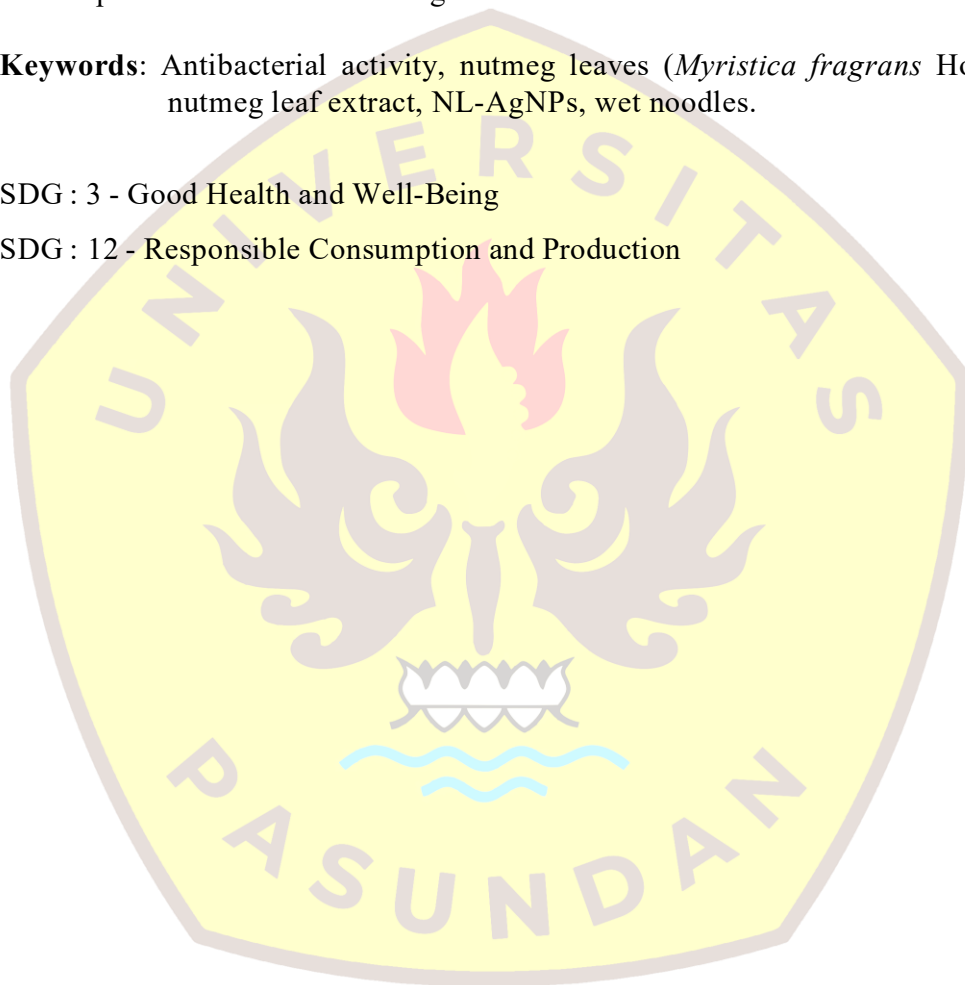
Wet noodles are one of the most widely consumed food products in Indonesia. However, their high water and starch content makes them susceptible to contamination by the genus *Bacillus*, resulting in a short shelf life and driving the use of synthetic preservatives—which are now increasingly being avoided due to health concerns. This has spurred the development of natural preservatives as an alternative solution, one of which is nutmeg leaf extract (*Myristica fragrans* Houtt.). However, nutmeg leaf extract has weaker antibacterial properties compared to synthetic preservatives. Therefore, a method is needed to enhance its effectiveness, specifically the synthesis of nanoparticles mediated by nutmeg leaf extract. This study aims to determine the physicochemical characteristics of nutmeg leaf powder, including moisture content color, pH, and water activity ( $a_w$ ), and to extract using the maceration method, to synthesize NL-AgNPs (Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles) based on nutmeg leaf extract, to determine the anti-*Bacillus* activity of nutmeg leaf extract and NL-AgNPs, and to evaluate the effect of adding nutmeg leaf extract and NL-AgNPs on the microbial population in wet noodle products. The research method began with the drying of mature nutmeg leaves, which were then ground into powder and subjected to physicochemical analysis, this was followed by extraction with 99,5% ethanol at a 1:3 (w/v) ratio to produce a crude extract. Next, NL-AgNPs were synthesized by dissolving a 10% crude nutmeg leaf extract in 1 mM AgNO<sub>3</sub>. Antibacterial activity was tested using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) methods, including the Well Diffusion Assay (WDA), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, and *B. megaterium*. Subsequently, the effects of nutmeg leaf extract at concentrations of 0,10% and 1,00% as well as NL-AgNPs at 0,01% and 0,10% on the microbial population in wet noodles during 10 days of storage at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and refrigerated conditions ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The results of study showed that nutmeg leaf powder had a moisture content of  $10,48 \pm 0,66\%$ , color values of  $L^*$  color  $41,05 \pm 0,62$ ,  $a^*$   $1,87 \pm 0,22$ , and  $b^*$   $11,72 \pm 2,89$ , a pH

4,43 ± 0,07, and an  $a_w$  0,61 ± 0,01. The crude extract yield obtained was 11,32 ± 0,00%. In the WDA test, the 10% extract showed an average inhibition zone from 11,5 ± 0,87 mm to 12,5 ± 1,80 mm, while the 1% NL-AgNPs showed an average inhibition zone 11,83 ± 0,29 mm to 15,33 ± 4,01 mm. The growth of *Bacillus* spp. can be inhibited by the extract and NL-AgNPs, with MIC ranging from 3,13 to 12,5 mg/mL and 0,31 to 0,63 mg/mL, respectively. Furthermore, *Bacillus* spp. can be killed by extract and NL-AgNPs with MBC values of >50,00 mg/mL and >5,00 mg/mL, respectively. In food applications, the extract and NL-AgNPs demonstrated antimicrobial activity (0.00 log<sub>10</sub> CFU/mL) in wet noodles from day 3 to day 10, both at room temperature and under refrigerated conditions. Thus, nutmeg leaf extract and NL-AgNPs have the potential to be used as effective natural preservatives for extending the shelf life of wet noodles.

**Keywords:** Antibacterial activity, nutmeg leaves (*Myristica fragrans* Houtt.), nutmeg leaf extract, NL-AgNPs, wet noodles.

SDG : 3 - Good Health and Well-Being

SDG : 12 - Responsible Consumption and Production



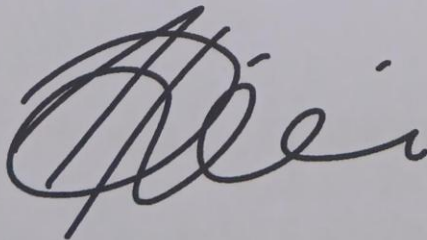
**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* NANOPARTIKEL PERAK HASIL  
SINTESIS HIJAU YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN PALA  
(*Myristica fragrans* Houtt.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP  
POPULASI MIKROBA PADA MIE BASAH**

Oleh :  
**Dandy Tiara Putra**  
**NPM : 223020087**  
**(Program Studi Teknologi Pangan)**

Fakultas Teknik  
Universitas pasundan

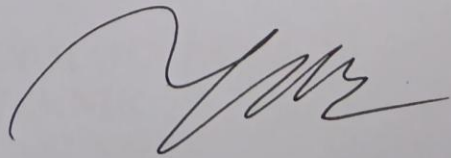
**Menyetujui**  
**Tim Pembimbing**

**Pembimbing I**



**Rini Triani, S. Si., M. Sc., Ph. D.**

**Pembimbing II**



**Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi**

**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* NANOPARTIKEL PERAK HASIL  
SINTESIS HIJAU YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN PALA  
(*Myristica fragrans* Houtt.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP  
POPULASI MIKROBA PADA MIE BASAH**

**LEMBAR PENGESAHAN**

---

---

**TUGAS AKHIR**

---

---

**Karya tulis sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik dari  
Universitas Pasundan**

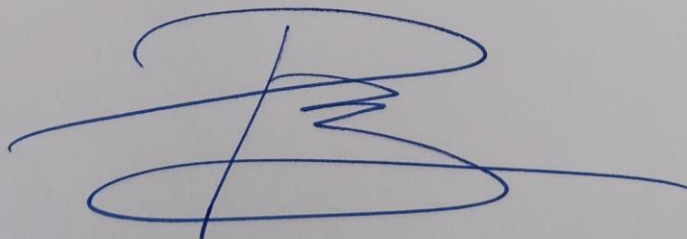
Oleh :

**Dandy Tiara Putra**

**22.302.0087**

**Menyetujui :**

**Koordinator Tugas Akhir**



**Rizal Maulana Ghaffar, S. T., M. T.**

## PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR

Tugas Akhir yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Fakultas dan Universitas, dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis dengan mengikuti aturan HaKI yang berlaku di Universitas Pasundan. Referensi kepustakaan diperkanankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai dengan kaidah ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Sitasi hasil penelitian Tugas Akhir ini dapat di tulis dalam Bahasa Indonesia sebagai berikut :

Putra, D. T. (2025) : *Aktivitas Anti-Bacillus Nanopartikel Perak Hasil Sintesis Hijau yang Dimediasi Ekstrak Daun Pala (Myristica fragrans Houtt.) dan Pengaruhnya Terhadap Populasi Mikroba Pada Mie Basah*. Tugas Akhir Program Sarjana, Universitas Pasundan.

Dan dalam Bahasa Inggris sebagai berikut :

Putra, D. T. (2025) : *Anti-Bacillus Activity of Green-Synthesized Silver Nanoparticles Mediated by Nutmeg Leaf Extract (Myristica fragrans Houtt.) and Their Effect on Microbial Populations in Wet Noodles*. Bachelor's Thesis, Universitas Pasundan.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh tugas akhir haruslah seizin Dekan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala yang telah melimpahkan Rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyusun Tugas Akhir dengan judul **“Aktivitas Anti-*Bacillus* Nanopartikel Perak Hasil Sintesis Hijau yang Dimediasi Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan Pengaruhnya Terhadap Populasi Mikroba Pada Mie Basah.”** Ini dengan tepat waktu. Tidak lupa shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada nabi kita Nabi Muhammad Sallallahu Alaihi Wasallam hingga akhir jaman nanti, Aamiin Ya Rabbal 'Alaamiin.

Dalam penyusunan laporan Tugas Akhir, penulis menyadari masih jauh dari kesempurnaan. Penulis mensyukuri laporan ini dapat terselesaikan dengan baik berkat bantuan dan dorongan keluarga tercinta yaitu Denny Septiara Wahab selaku ayah dari penulis, Eem Suratmi selaku ibu dari penulis, Siska Musdalifah selaku kakak pertama dari penulis, dan Dea Nabillah Putri selaku kakak kedua yang selalu memberikan dukungan secara finansial maupun moral. Selain itu penulis mendapatkan bimbingan serta dorongan dari berbagai pihak secara langsung maupun tidak langsung. Maka kesempatan kali ini, sebagai bentuk penghormatan penulis mengucapkan terima kasih kepada :

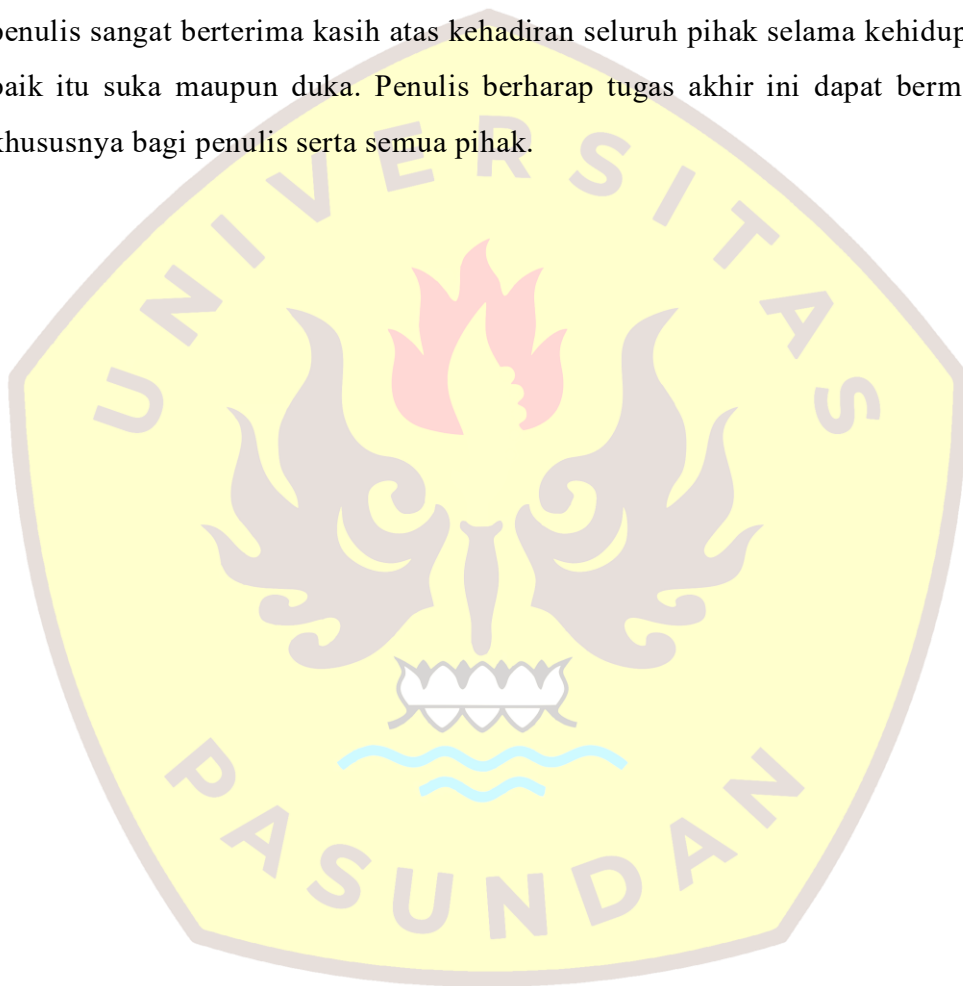
1. Rini Triani, S. Si., M. Sc., Ph. D. Selaku dosen pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan arahan dalam penyusunan laporan tugas akhir ini serta saran yang berguna untuk penulis.
2. Assoc. Prof, Dr. Yaya Rukayadi. Selaku dosen pembimbing yang telah memberikan kesempatan sebuah cerita yang sangat berarti kepada penulis serta meluangkan waktu, tenaga, dan arahan dalam kehidupan penulis secara pribadi dan penyusunan laporan tugas akhir ini.
3. Dr. Istiyati Inayah, S.Si., M.Si. Selaku dosen Penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dalam laporan tugas akhir ini.

4. Jaka Rukmana, S.T., M.T., selaku ketua program studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.
5. Rizal Maulana Ghaffar, S.T., M.T. selaku koordinator tugas akhir Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.
6. Kepada Penghuni “Kost berkah”, Leonardus Calvin Wicaksana, Azriel David Budiman, Muhammad Virgie Ambiya Munajat, Muhammad Pandu Munaadiyullah Asy-Syauqi, Gilang Ramadhan Saputra, Dava Aprilian Lampah, Renata Rifa Danisworo, Dani Muhammad Sagala, Ismail Ahmad yang selalu kebersamai penulis selama perkuliahan.
7. Kepada teman seperjuangan riset Malaysia, Irma Faustina Faizal, Dzakirah Asma Nurullah, Leonardus Calvin Wicaksana, Azriel David Budiman yang kebersamai penulis dalam penyusunan Tugas Akhir.
8. Kepada “escobar”, Naira, Saskia, Faisal, Faaza, Ghifarysa, Fadilah, Adiputra, Fadli, Felisha, Syifa, Tiara, Maghfira, Zahra, Alm. Daffa Haidar, dan Alm. M. Agoeng Bagoes yang kebersamai penulis sedari SMA.
9. Kepada Perempuan dengan NPM 223020074 yang senantiasa menemani penulis dalam suka dan duka selama perkuliahan.
10. Rekan perjuangan mikrobiologi pangan, Kamiliyah, Revalina, Teh Azizah, Kang Roiyhan, Kang Rifaldi, Teh Ribka, Teh Nurul, Zaky, Yuki, Nasywa, dan Puti.
11. Rekan Kaderisasi, Teh Amelia L., Teh Raissa A., Raissa R., Vito, Abiyyu, Keisya, Amy, Zahra, Gesa, Amelia R., Keisya A.
12. Rekan microbe Group Putri, Mia, Kung, dan Hoi yang sangat membantu penulis dalam pengerjaan penelitian ini.
13. Rekan Fermentation Group Haikal, Hayat, Aisyah, dan Elisyah yang membantu secara tidak langsung dalam pengerjaan penelitian ini.
14. Kepada penyanyi yang sudah menciptakan lagu sebagai berikut : Lany “malibu night” dan “You!”, Niki “Ocean and Engines” dan “La la la lost You”, Joji “Glimpse of Us”, “Past won’t leave my bed”, Luicy Juicy

“Sayangnya” “Lampu Kuning”, Hindia “Kita Ke Sana”, Gangga “Blue Jeans”, Honne and Beka “Location unknown”, Kendis “Ours to Keep”, Cup of Joe “Multo”, dan Nadhif Basalamah “ Kota ini tak sama tanpamu” yang menjadi lagu yang menemani kehidupan penulis.

15. Kepada “.apocalyps” dan Seluruh pihak yang telah membantu penulis selama Penyusunan maupun dalam kehidupan penulis.

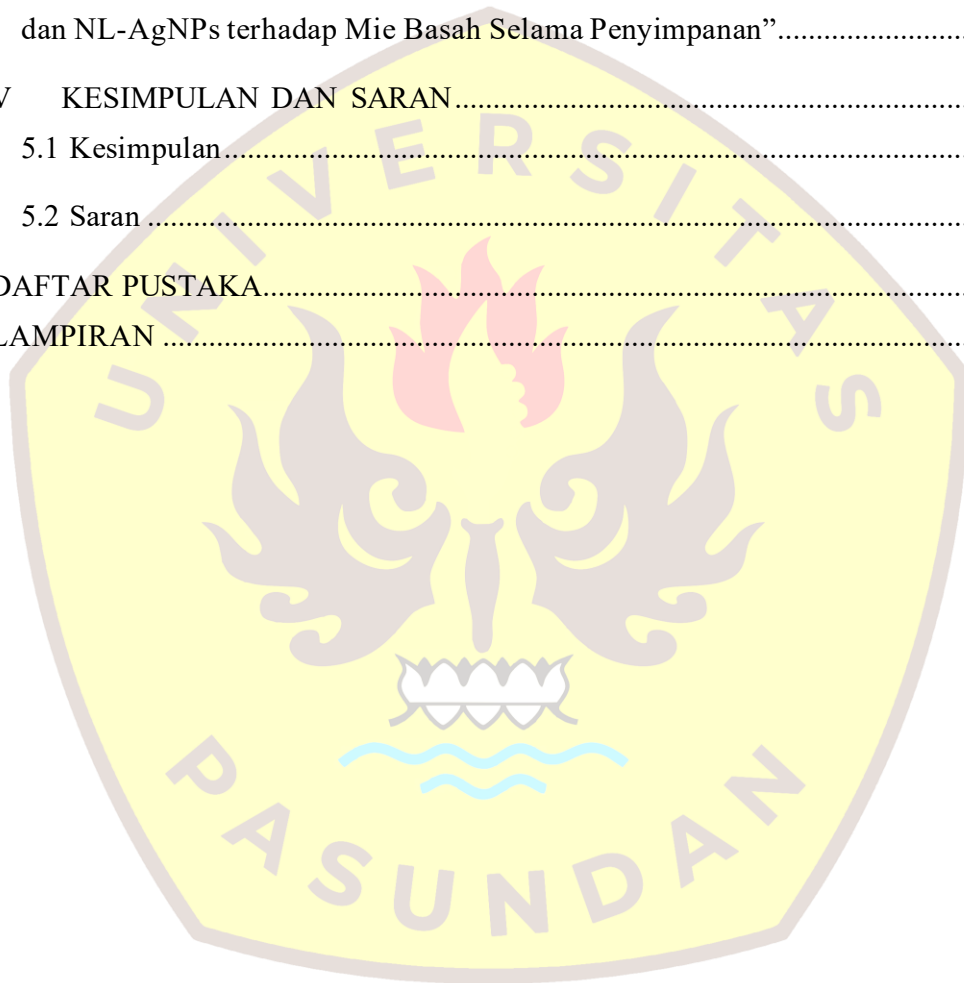
Akhir kata, semoga Allah SWT. Membalas semua kebaikan yang telah diberikan, penulis sangat berterima kasih atas kehadiran seluruh pihak selama kehidupan ini baik itu suka maupun duka. Penulis berharap tugas akhir ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis serta semua pihak.



## DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i> .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	vi
PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xvii
I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Kerangka Pemikiran.....	5
1.6 Hipotesis Penelitian.....	7
1.7 Waktu dan Tempat Penelitian.....	8
II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tanaman Pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.).....	9
2.2 Mie Basah.....	14
2.3 <i>Bacillus</i> .....	16
2.4 Nanoteknologi .....	24
2.5 Karakterisasi Toksisitas <i>Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles</i> (NL-AgNPs) .....	30
III METODOLOGI PENELITIAN .....	33
3.1 Bahan dan Alat.....	33
3.2 Metode Penelitian .....	35

3.3	Prosedur Penelitian .....	37
3.4	Jadwal Penelitian.....	56
IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	57
4.1	Penelitian Tahap 1 “Karakterisasi Bubuk Daun Pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) dan Ekstraksi Bubuk Daun Pala.” .....	57
4.2	Penelitian Tahap II “Pembuatan Sintesis Hijau NL-AgNPs dan Menentukan Aktivitas Antibakteri terhadap Spesies <i>Bacillus</i> spp” .....	63
4.3	Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Daun Pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) dan NL-AgNPs terhadap Mie Basah Selama Penyimpanan” .....	74
V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	88
5.1	Kesimpulan.....	88
5.2	Saran .....	89
	DAFTAR PUSTAKA.....	91
	LAMPIRAN .....	104



## DAFTAR GAMBAR

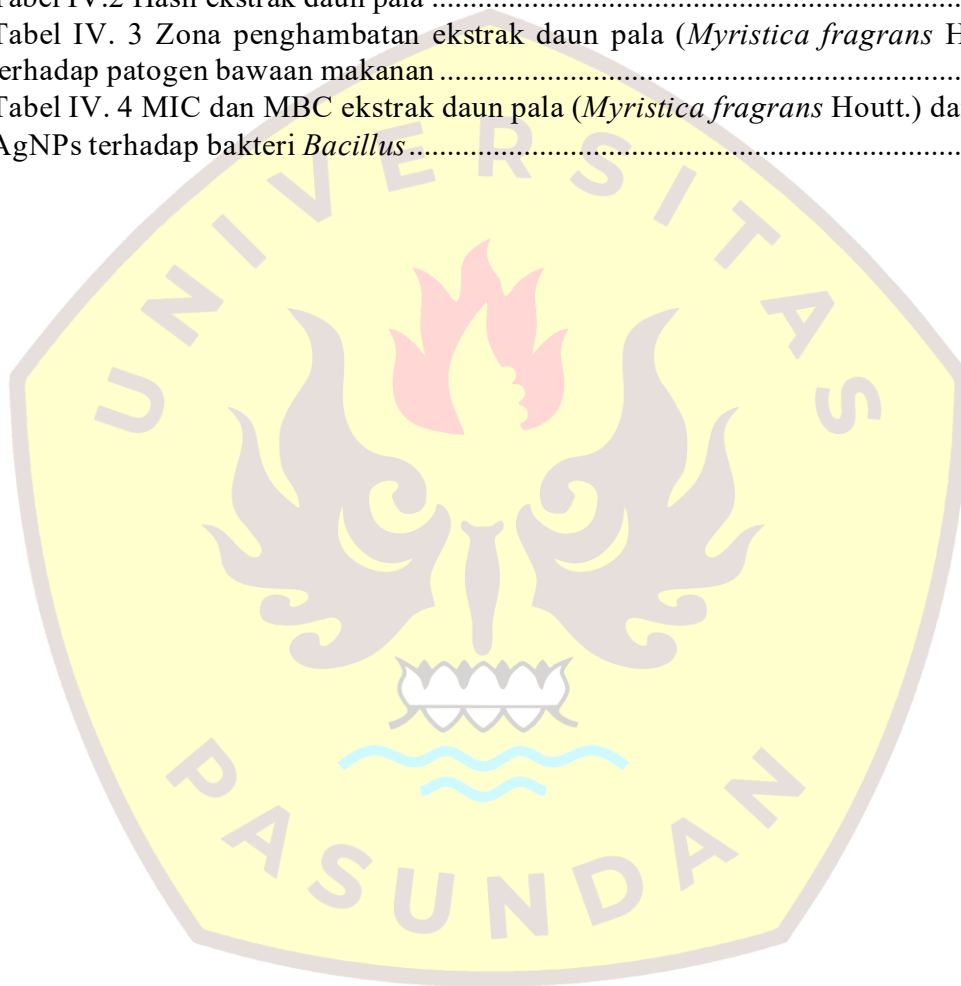
Gambar II.1 Tanaman Pala.....	10
Gambar II.2 Daun Pala.....	11
Gambar II.3 Mie Basah .....	14
Gambar II.4 <i>Bacillus</i> spp. (Handayani et al., 2022) .....	18
Gambar II.5 <i>Bacillus subtilis</i> (Hussein et al, 2019) .....	20
Gambar II.6 <i>Bacillus cereus</i> (De Vries et al., 2004) .....	21
Gambar II.7 <i>Bacillus pumilus</i> (Mazlan et al., 2021).....	22
Gambar II.8 <i>Bacillus megaterium</i> (Cahya et al., 2022).....	23
Gambar II.9 Metode sintesis nanopartikel (Chowdhury et al., 2024).....	27
Gambar II.10 Visualisasi sintesis hijau nanopartikel perak (Chugh et al., 2021). 28	28
Gambar II.11 Visualisasi reaksi kimia sintesis hijau (Chugh et al., 2021). .....	29
Gambar III.1 Diagram alir Penentuan kadar air.....	39
Gambar III.2 Diagram alir penentuan warna .....	40
Gambar III.3 Diagram alir penentuan pH .....	42
Gambar III.4 Diagram alir penentuan aktivitas air ( $a_w$ ).....	44
Gambar III.5 Diagram Alir Ekstraksi Daun Pala.....	46
Gambar III.6 Diagram Alir Prosedur Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Daun Pala .....	47
Gambar III.7 Diagram Alir <i>Well Diffusion Assay</i> (WDA).....	49
Gambar III.8 Diagram Alir Metode <i>Minimum Inhibitory Concetration</i> (MIC) .....	51
Gambar III.9 Diagram Alir Metode <i>Minimum Bactericidal Concetration</i> (MBC) .....	53
Gambar III.10 Aplikasi Ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap mie basah ...	55
Gambar IV.1 Bubuk Daun Pala.....	59
Gambar IV.2 Ekstrak Daun Pala .....	61
Gambar IV.3 Bahan sintesis hijau NL-AgNPs; (a) Ekstrak daun pala 10%, (b) NL- AgNPs 1%.....	64
Gambar IV. 4 Zona hambat kontrol positif <i>chlorhexidine</i> (CHX), kontrol negatif <i>dimethyl sulfoxide</i> (DMSO), ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1%; (a) <i>B.</i> <i>pumilus</i> , (b) <i>B. cereus</i> .....	66
Gambar IV. 5 Hasil uji MIC dan MBC; (a) <i>Bacillus cereus</i> , (b) <i>Bacillus megaterium</i> .....	70
Gambar IV. 6 Pengaruh ekstrak daun pala 0,0% (control), 0,1%, dan 1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm$ $2,0^\circ\text{C}$ ) .....	77
Gambar IV. 7 Pengaruh NL-AgNPs 0,0% (control), 0,01%, dan 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm$ $2,0^\circ\text{C}$ ) .....	80
Gambar IV.8 Pengaruh ekstrak daun 0,0 (control), 0,1%, 1% dan NL-AgNPs 0,01%, 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).....	81

Gambar IV.9 Pengaruh ekstrak daun pala 0,0% (control), 0,1%, dan 1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).....	83
Gambar IV.10 Pengaruh NL-AgNPs 0,0% (control), 0,01%, dan 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).....	85
Gambar IV.11 Pengaruh ekstrak daun 0,0 (control), 0,1%, 1% dan NL-AgNPs 0,01%, 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).....	86
Gambar IV. 12 <i>Juxtapose</i> pengaruh ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada mie basah : (a) pengaruh ekstrak daun pala terhadap suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ). (b) pengaruh NL-AgNPs terhadap suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ). (c) pengaruh ekstrak daun pala terhadap suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ). (d) pengaruh NL-AgNPs terhadap suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) .....	87



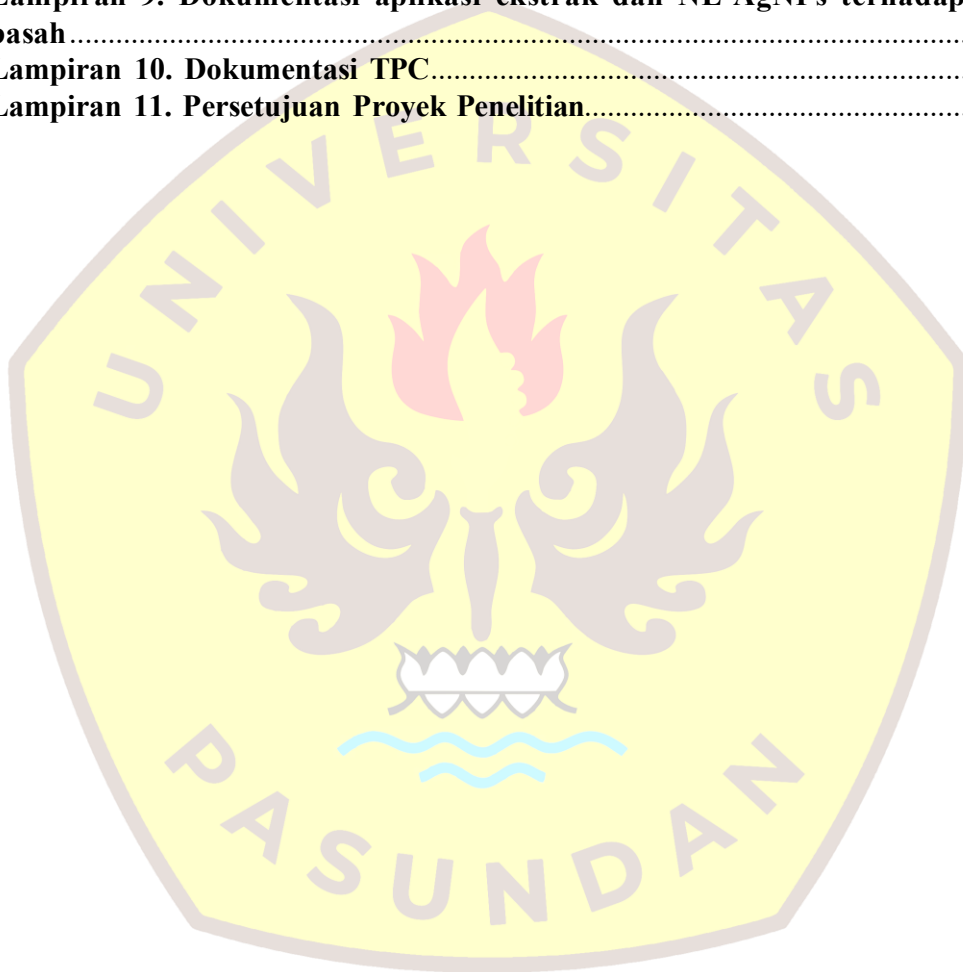
## DAFTAR TABEL

Tabel II.1 Taksonomi Tanaman Pala (Kumari et al., 2021).....	10
Tabel II. 2 Komposisi Gizi Mie Basah per 100 gram (Astawan, 1999).....	15
Tabel II.3 Taksonomi <i>Bacillus</i> spp. (Madigan, 2005).....	18
Tabel III.1 Spesifikasi strain kultur .....	34
Tabel III.2 Jadwal Penelitian.....	56
Tabel IV.1 Karakteristik fisikokimia bubuk daun pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) .....	57
Tabel IV.2 Hasil ekstrak daun pala .....	62
Tabel IV. 3 Zona penghambatan ekstrak daun pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) terhadap patogen bawaan makanan .....	65
Tabel IV. 4 MIC dan MBC ekstrak daun pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) dan NL- AgNPs terhadap bakteri <i>Bacillus</i> .....	73



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Layout 96 Well Plate</i> .....	104
Lampiran 2. <i>Two-way ANOVA : Inhibitory Zone versus Bacteria strands, Concentration</i> .....	105
Lampiran 3. <i>Analisis of varians</i> .....	107
Lampiran 4. Dokumentasi analisis fisikokimia.....	115
Lampiran 5. Dokumentasi Pembuatan ekstrak daun pala.....	116
Lampiran 6. Dokumentasi Pembuatan NL-AgNPs dengan ekstrak daun pala .....	117
Lampiran 7. Dokumentasi hasil uji WDA.....	118
Lampiran 8. Dokumentasi hasil uji MIC dan MBC.....	119
Lampiran 9. Dokumentasi aplikasi ekstrak dan NL-AgNPs terhadap mie basah.....	121
Lampiran 10. Dokumentasi TPC.....	123
Lampiran 11. Persetujuan Proyek Penelitian.....	126



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	Nama	Pemakaian pertama kali pada halaman
AgNO <sub>3</sub>	Perak Nitrat	28
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	35
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	32
a <sub>w</sub>	Aktivitas air	4
BHA	<i>Beta Hydroxy Acid</i>	1
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i>	1
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>	35
CHX	<i>Chlorhexidine</i>	32
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	32
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	29
NA	<i>No Active</i>	60
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>	34
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>	32
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>	32
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	34
NL-AgNPs	<i>Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles</i>	3
PCA	<i>Plate Count Agar</i>	32
pH	<i>Potential of hydrogen</i>	4
SD	<i>Standard Deviation</i>	35
SNI	Standar Nasional Indonesia	15
SPR	<i>Surface Plasma Resonance</i>	29
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	29
TNTC	<i>Too Numerous to Count</i>	70
TPC	<i>Total Plate Count</i>	34
WDA	<i>Well Diffusion assay</i>	34
<b>LAMBANG</b>		
±	<i>Standard Deviation</i>	35
µm	Mikrometer	17
µL	Mikroliter	33
a*	Warna kemerahan/kehijauan	34
b*	Warna kekuningan/kebiruan	34
L*	Kecerahan	34
α	Alpha	13
β	Beta	15
nm	Nanometer	12
p	<i>Probability value</i>	61
×	<i>Multiply</i>	17



# I PENDAHULUAN

Bab ini menguraikan mengenai : (1.1) Latar Belakang, (1.2) Identifikasi Masalah, (1.3) Maksud dan Tujuan Penelitian, (1.4) Manfaat Penelitian, (1.5) Kerangka Pemikiran, (1.6) Hipotesis Penelitian, dan (1.7) Waktu dan Tempat Penelitian.

## 1.1 Latar Belakang

Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan kesehatan dan kepedulian lingkungan, kebutuhan bahan pengawet alami terus meningkat. Penggunaan pengawet sintetis dalam industri pangan tergolong efektif untuk memperpanjang umur simpan, tetapi kekhawatiran mengenai potensi dampak negative terhadap kesehatan bersifat akumulatif di dalam tubuh seperti iritasi kulit, mual, muntah, pusing, keracunan hingga kematian (Swastika et al., 2020). Selain itu, penelitian mengenai ekstrak tanaman memiliki efek antioksidan dan antimikroba dapat menyaingi bahkan melampaui pengawet sintetis seperti *Butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) (Shah et al., 2014). Hal tersebut semakin mendukung pengawet alami dari sumber daya hayati sebagai sebuah solusi.

Mikroorganisme merupakan makhluk hidup mikroskopis yang memiliki peran dalam berbagai aspek kehidupan. Sebagian mikroorganisme bersifat menguntungkan seperti asam laktat yang digunakan dalam fermentasi, namun tidak sedikit pula yang bersifat merugikan karena bersifat patogenik. Mikroorganisme patogen dapat diartikan sebagai jasad renik penyebab penyakit yang bekerja lewat dua jalur utama dengan merusak jaringan inang secara fisik atau memisahkan diri dari sel pada Lokasi replikasi untuk menyebar (Putri et al., 2023).

Salah satu kelompok bakteri yang menjadi tantangan besar dalam keamanan pangan adalah *Bacillus* spp. spesies yang sulit untuk dikendalikan karena kemampuannya dalam membentuk endospore yang memiliki daya tahan luar biasa terhadap stres lingkungan, seperti suhu tinggi, radiasi, penggunaan desinfektan,

hingga kondisi kering (Logan, 2011). Ketika kondisi lingkungan membaik, spora dapat berkecambah kembali menjadi sel vegetatif yang aktif. Dalam fase aktifnya, bakteri ini memproduksi toksin dan enzim destruktif yang tidak hanya menurunkan kualitas serta memicu kebusukan pangan, tetapi juga berisiko menimbulkan penyakit bawaan makanan .

Mie basah merupakan karakteristik yang memiliki kelemahan berupa daya simpan yang rendah karena kadar air dan pati basah yang tinggi serta memiliki kadar karbohidrat yang tinggi, namun minim kandungan senyawa antioksidan. Sehingga mie basah sangat sangat rentan terhadap kontaminasi berbagai mikroorganisme, termasuk virus, kapang, khamir, hingga bakteri patogen seperti *Bacillus*. Kontaminasi mikroba secara signifikan menurunkan standar kualitas dari mie basah. (Handayani & Kumalasari, 2022).

Nanoteknologi merupakan disiplin ilmu interdisipliner yang mengintegrasikan prinsip fisika, kimia, biologi, dan teknik guna memanipulasi materi pada skala molekuler atau objek-objek kecil (Ahmad et al., 2024). Transformasi yang dibawakan oleh nanoteknologi memberikan dampak signifikan pada sektor industri, khususnya dalam pembaharuan keamanan dan pengawetan pangan. Salah satu aplikasi nanoteknologi pada kemampuan nanomaterial dalam mendeteksi keberadaan patogen dan toksin melalui karakteristik unik yang dimilikinya (Ahmad et al., 2024). Di antara berbagai jenis nanomaterial, nanopartikel menjadi pilihan karena memiliki luas permukaan yang besar. Keunggulan structural ini memungkinkan terjadinya interaksi langsung dengan mikroorganisme, sehingga memposisikan nanopartikel sebagai kandidat agen antimikroba dan pengawet yang sangat potensial dalam industri pangan.

Nanopartikel perak (AgNPs) menunjukkan potensi luar biasa sebagai agen antimikroba spektrum luas. AgNPs efektif dalam menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme patogen dan perusak pangan, termasuk bakteri gram positif, gram negatif, dan jamur (Jones et al., 2010). Mekanisme kerja yang

multifaset, mulai dari merusak membran sel, mengganggu fungsi protein dan DNA, serta menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) (Siddiqi et al., 2018). Sehingga AgNPs menjadi kandidat untuk diaplikasikan dalam sistem pengawetan makanan.

Produksi nanopartikel perak melalui metode konvensional sering kali menghadapi kendala terkait penggunaan bahan kimia sintetis yang bersifat polutif dan meninggalkan residu toksik pada produk akhir (Singh et al., 2021). Sebagai Solusi alternatif yang lebih berkelanjutan, pendekatan *green synthesis* menawarkan produser yang ramah lingkungan dengan memanfaatkan ekstrak organisme biologis sebagai agen pereduksi sekaligus penstabil (Rawwat et al., 2018). Dalam konteks ini, daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) menjadi bahan potensial karena kandungan senyawa bioaktifnya, seperti fenolik dan flavonoid, yang mampu berperan sebagai agen pereduksi dan penstabil alami dalam pembentukan AgNPs (Nurmilasari et al., 2017).

Kendati potensi AgNPs sebagai agen antimikroba telah banyak diteliti, studi yang mengintegrasikan sintesis hijau AgNPs dengan bahan alami masih sangat terbatas (Ghosh et al., 2025). Khususnya, penggunaan ekstrak daun pala sebagai agen reduktor dalam pembentukan AgNPs belum banyak dieksplorasi. Sehingga, penelitian ini menawarkan kebaharuan dengan mengeksplorasi potensi daun pala sebagai agen reduktor alami untuk mengisi celah pengetahuan, dan inovasi diharapkan menjadi landasan bagi pemanfaatan AgNPs sebagai pengawet pangan alami yang efektif dalam menanggulangi permasalahan di industri pangan.

## 1.2 Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka masalah-masalah yang dapat diidentifikasi adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana karakteristik fisikokimia bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan bagaimana hasil ekstraksi bubuk daun pala menggunakan pelarut etanol *absolute* 99,5%?

2. Bagaimana proses sintesis hijau nanopartikel perak dengan menggunakan ekstrak daun pala serta bagaimana aktivitas anti-*Bacillus* dari ekstrak dan NL-AgNPs?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak daun pala dan NL-AgNPs dengan berbagai konsentrasi dalam menekan pertumbuhan mikroba pada mie basah selama masa penyimpanan dengan suhu yang berbeda?

### 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Penelitian ini bermaksud untuk mengembangkan metode sintesis hijau nanopartikel perak dengan ekstrak daun pala, serta mengevaluasi pengaruh sebagai agen antibakteri terhadap pertumbuhan *Bacillus* spp. dan sebagai pengawet alami dalam upaya meningkatkan keamanan dan mutu mie basah selama penyimpanan.

Penelitian ini memiliki tujuan berjenjang sebagai berikut :

1. Menganalisis karakteristik fisikokimia bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) serta mengevaluasi hasil ekstraksi bubuk daun pala menggunakan pelarut etanol 99,5%.
2. Mensintesis nanopartikel perak melalui metode sintesis hijau menggunakan ekstrak daun pala serta menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun pala dan nanopartikel perak hasil sintesis hijau (NL-AgNPs) terhadap *Bacillus* spp.
3. Mengevaluasi pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada mie basah selama masa penyimpanan pada suhu yang berbeda.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari terlaksananya penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai data hasil karakteristik fitokimia dari bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) meliputi pada kadar air, warna, pH dan aktivitas air ( $a_w$ ) serta efektivitas metode ekstraksi menggunakan etanol *absolute* 99,5%.

2. Menyediakan pengetahuan dalam sintesis hijau nanopartikel perak (NL-AgNPs) menggunakan ekstrak daun pala. Serta memberikan data hasil mengenai aktivitas NL-AgNPs dan ekstrak daun pala terhadap *Bacillus* spp.
3. Memberikan informasi dan inovasi terhadap industri pangan mengenai pontesi NL-AgNPs dalam aplikasi pengawetan pangan, khususnya pada mie basah. Sehingga dapat menjadi alternatif pengawet alami yang lebih aman.

### 1.5 Kerangka Pemikiran

Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) merupakan komoditas rempah unggulan yang memiliki nilai ekonomi strategis di pasar global. Selama ini, sektor industri pangan, farma, hingga kosmetik cenderung memusatkan eksploitasi pada bagian buah dan biji sebagai produk utama. Di sisi lain, potensi daun pala masih terabaikan dan belum dioptimalkan secara komersial, sehingga bagian ini menjadi limbah atau hasil samping yang kurang mendapat perhatian dalam riset maupun aplikasi industri (Widyawati et al., 2020).

Potensi daun pala didukung dengan kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, fenolik, saponin, dan flavonoid yang berperan sebagai agen antibakteri. Selain itu, minyak atsiri yang terkandung pada daun pala memiliki potensi aktivitas antibakteri (Niken et al., 2024). Diketahui bahwa mekanisme kerja dari minyak atsiri didasarkan pada kemampuan penetrasi minyak atsiri yang tinggi terhadap dinding sel mikroba, yang akan memicu kebocoran intraseluler dan menyebabkan kematian sel bakteri secara efektif.

Proses ekstraksi bertujuan untuk mengisolasi senyawa kimia atau komponen aktif yang terkandung dalam sampel. Efektivitas proses ini sangat bergantung pada tingkat polaritas pelarut, di mana pelarut polar atau semipolar memiliki kapasitas untuk melarutkan spektrum senyawa yang luas secara optimal. Proses ini bekerja berdasarkan prinsip distribusi zat terlarut dalam senyawa aktif melalui penggunaan

dua jenis pelarut yang memiliki polaritas berbeda atau tidak saling bercampur (Handoyo, 2020). Etanol menjadi pelarut karena kandungan toksisitas yang lebih rendah dibandingkan methanol atau aseton, serta ramah lingkungan dan ekonomis. Selain itu, efisiensinya yang tinggi dalam mengekstrak senyawa flavonoid dan fenolik (Hakim & Saputri, 2020), etanol juga bersifat *food grade* dan *pharmaceutical grade* (Permatasari et al., 2020). Adapun Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi.

Maserasi merupakan teknik ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik dalam periode waktu tertentu guna mengisolasi komponen aktif target. Penggunaan etanol dalam metode ini didasarkan pada karakteristik sebagai pelarut universal yang efektif dalam mengikat senyawa dengan polaritas beragam, dari senyawa polar maupun semi-polar. Hal ini memungkinkan penarikan metabolit sekunder secara optimal, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Riwanti et al., 2020).

Nanopartikel perak (AgNPs) merupakan material nano yang memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas, mencakup sifat antibakteri, antijamur, antiviral, hingga antiinflamasi. Keunggulan AgNPs dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebabkan kemampuannya dalam menginduksi kerusakan structural pada dinding sel serta mengintervensi fungsi enzimatis seluler. Selain itu, AgNPs memicu kerusakan pada asam nukleat bakteri, yang secara efektif menghambat proses replikasi dan menghambat pertumbuhan sel (Handoko et al., 2022).

Sintesis hijau AgNPs merupakan sebuah inovatif yang memanfaatkan senyawa bioaktif tumbuhan sebagai bioreduktor untuk mengubah ion perak ( $Ag^+$ ) menjadi bentuk logam ( $Ag^0$ ). Teknik ini dikategorikan sebagai metode ramah lingkungan karena meniadakan pembentukan residu toksik serta meminimalisir risiko paparan logam berat terhadap ekosistem dan kesehatan makhluk hidup (Qurrataayun et al., 2020). Dalam pendekatan sintesis hijau, metabolit sekunder seperti senyawa

fenolik, flavonoid, dan terpenoid berperan penting dalam mereduksi ion maupun sebagai agen penstabil partikel untuk mencegah agregasi partikel.

Kontaminasi bakteri patogen merupakan ancaman terhadap kualitas dan keamanan pangan. Salah satu genus yang menjadi perhatian adalah *Bacillus* spp. khususnya *B. cereus*, sebagai gram positif dan anaerob fakultatif, *B. cereus* memiliki daya tahan luar biasa terhadap kondisi lingkungan ekstrem berkat kemampuan pembentukan sporajnya (Samodra et al., 2024). Pada saluran pencernaan manusia, *B. cereus* dapat memicu gejala nyeri perut dan diare melalui sekresi berbagai toksin berbahaya, seperti *hemolysin* BL (Hbl), *enterotoksin nonhemolitik* (Nhe), dan sitotoksin CytK dalam usus manusia (Samodra et al., 2024).

Penggunaan pengawet pada dasarnya bertujuan untuk menekan laju pertumbuhan serta aktivitas mikroorganisme pembusuk dan patogen yang berisiko merusak integritas pangan. Selain pengendalian mikrobiologis, proses pengawetan meminimalisir reaksi kimiawi yang dapat menurunkan kualitas mutu produk. Menurut Winarno (1993), pengawetan yang efektif yaitu mampu mencegah oksidasi lipid (ketengikan) sekaligus mempertahankan atribut penting seperti kandungan gizi, tekstur, dan sensoris makanan. Berdasarkan potensi aktivitas antibakteri serta kandungan metabolit sekunder yang dimilikinya, ekstrak daun pala menunjukkan peluang untuk dikembangkan sebagai pengawet alami.

### 1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah diuraikan diatas, maka dapat diambil hipotesis sebagai berikut :

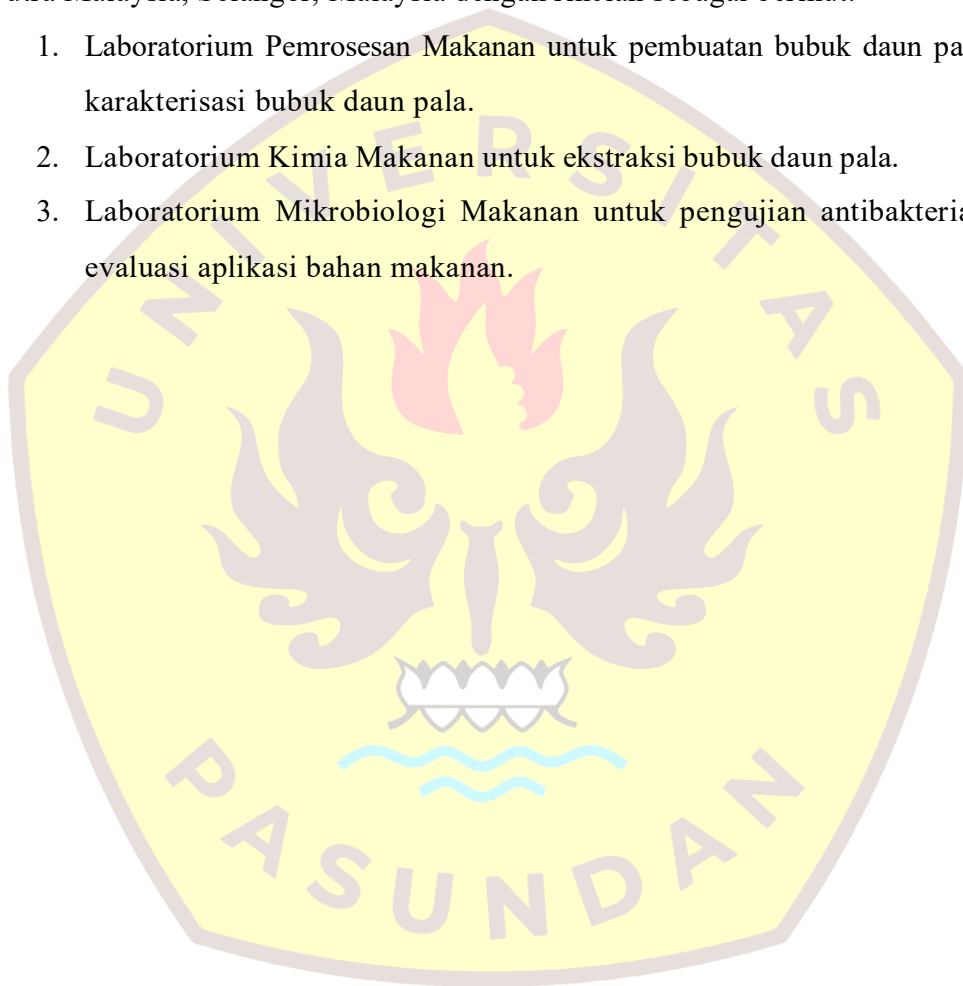
1. Diduga bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dapat dikarakterisasi dan dapat diekstraksi menggunakan etanol *absolute* 99,5%
2. Diduga ekstrak daun pala dapat disintesis menjadi NL-AgNPs dan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus* spp.

3. Diduga ekstrak daun pala dan NL-AgNPs dapat menekan pertumbuhan mikroba pada mie selama penyimpanan.

### **1.7 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dimulai dari 12 Agustus 2025 hingga 9 September 2025. Dilakukan di Laboratorium - laboratorium Fakultas Ilmu dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia dengan rincian sebagai berikut:

1. Laboratorium Pemrosesan Makanan untuk pembuatan bubuk daun pala dan karakterisasi bubuk daun pala.
2. Laboratorium Kimia Makanan untuk ekstraksi bubuk daun pala.
3. Laboratorium Mikrobiologi Makanan untuk pengujian antibakterial dan evaluasi aplikasi bahan makanan.



## II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini akan menguraikan mengenai: (2.1.) Tanaman pala, (2.2.) Mie Basah, (2.3) *Bacillus*, (2.4.) Nanoteknologi, dan (2.5.) Karakteristik Toxic *Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles* (NL-AgNPs).

### 2.1 Tanaman Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

#### 2.1.1 Biologi Pala

Tanaman pala (*Myristica fragrans* Houtt.) (Gambar II.1) merupakan tanaman biji tertutup (*Angiospermae*), berbiji tunggal dan berkeping dua (dikotil). Tanaman pala merupakan tanaman asli Indonesia yang pada awalnya berkembang di daerah Banda dan sekitarnya. Selanjutnya tanaman pala menyebar dan berkembang di Sulawesi utara sampai ke Aceh. Khususnya di Kabupaten Kepulauan Sangihe, tanaman pala merupakan salah satu tanaman perkebunan utama yang menjadi andalan daerah (Legoh et al., 2020).

Tanaman pala memiliki 200 spesies yang tersebar luas di wilayah tropis, dengan habitat optimal pada elevasi 0 hingga 700 meter di atas permukaan laut. Pertumbuhan tanaman pala ini bergantung pada kondisi edafik, meliputi lapisan *top soil* yang cukup dalam, ketersediaan hara yang mencukupi, serta sistem drainase dan aerasi tanah yang baik. Pala cenderung tumbuh subur pada tanah bertekstur pasir hingga lempung yang kandungan bahan organik yang tinggi. Secara morfologi, pohon pala memiliki tajuk yang rimbun dengan tinggi batang berkisar antara 10-18 m dan diameter 30-45 cm. Bentuk mahkotanya meruncing ke arah puncak dengan bagian atas cenderung membulat serta kerapatan daun yang tinggi. Secara reproduktif, pala umumnya bersifat berjenis kelamin tunggal, meskipun variasi berjenis kelamin ganda terkadang ditemukan. Terdapat perbedaan jelas antara pohon betina dengan memiliki cabang yang tumbuh secara horizontal, sedangkan pohon Jantan dicirikan dengan percabangan yang mengarah ke atas membentuk sudut lancip terhadap batang utama (Suyono et al., 2017).



Gambar II.1 Tanaman Pala

Klasifikasi ilmiah tanaman pala disajikan pada Tabel II.1 sebagai berikut :

Tabel II.1 Taksonomi Tanaman Pala (Kumari et al., 2021).

Level Taksonomi	Nama Taksonomi
Kingdom	Plantae
Sub kingdom	Viridiplantae
Classi	Magnoliopsida
Ordo	Myristicaceae
Familia	Myristicaceae
Genus	<i>Myristica</i>
Spesies	<i>Myristica Fragrans</i> Houtt.

Daun pala (Gambar II.2) berwarna hijau mengkilat, baik hijau muda ataupun hijau tua, tergantung pada usia daun. Daun pala memiliki panjang 5-15cm, lebar 3-7 cm dengan panjang tangkai daun 0,7-1,5 cm (Suryono et al, 2017).



Gambar II.2 Daun Pala

### 2.1.2 Fitokimia Daun Pala

Fitokimia merupakan disiplin ilmu yang mengeksplorasi karakteristik, struktur, serta interaksi berbagai senyawa kimia dalam tumbuhan, khususnya kelompok metabolit primer dan sekunder. Metabolit sendiri didefinisikan sebagai keseluruhan produk dari proses biokimia yang terjadi di dalam sel hidup, yang mencakup jalur sintesis maupun penguraian senyawa organik. Berdasarkan fungsinya, metabolit diklasifikasikan menjadi dua kategori utama, yaitu metabolit primer dan sekunder (Julianto, 2019).

Metabolit primer merupakan senyawa organik esensial yang terlibat langsung dalam proses fisiologis dasar, seperti pertumbuhan, perkembangan, dan reproduksi tanaman. Di sisi lain, metabolit sekunder disintesis melalui jalur metabolisme khusus dan tidak berperan langsung dalam pertumbuhan primer, melainkan berfungsi sebagai instrument pertahanan hayati. Senyawa ini berperan penting dalam interaksi antagonis, termasuk perlindungan terhadap herbivora dan mikroorganisme patogen, sehingga memungkinkan tanaman untuk beradaptasi dan mempertahankan keberlangsungan hidup di bawah tekanan lingkungan (Julianto, 2019).

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak daun pala yang diperoleh melalui ekstraksi pelarut etanol 70% menunjukkan bahwa keberadaan berbagai kelompok metabolit sekunder yang meliputi alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, dan terpenoid. Selain itu terdapat antioksidan dan antibakteri dari daun pala dengan kandungan senyawa fenoliknya (Paneerchelvan et al., 2015). Berdasarkan analisis kadar fenolik dengan menggunakan asam galat sebagai larutan standar didapatkan panjang gelombang 766 nm, dengan ekstrak daun pala memiliki nilai rata-rata sebesar 53,3797 mg ekuivalen asam galat/mg (Putri et al., 2023).

Karakteristik kimiawi dipertegas oleh Saputri et al (2015), yang melaporkan keberadaan senyawa spesifik seperti kuinon, lignan, dan fenilpropanoid. Kuinon, yang merupakan turunan dari senyawa fenol, memiliki peranan biologis dan farmakologis yang krusial sebagai agen antijamur, antimalaria, antioksidan, antibakteri hingga antikanker (Kurnia et al., 2021). Selain kuinon, kelompok fenol alami lainnya ditemukan pada daun pala adalah lignan dan fenilpropanoid, yang secara kolektif memperkuat potensi daun pala sebagai pengawet alami (Teponno et al., 2016; Deng & Lu, 2017).

### **2.1.3 Bioaktif Daun Pala**

Senyawa bioaktif didefinisikan sebagai substansi kimia yang memiliki aktivitas biologis dan kapasitas untuk berinteraksi dengan jaringan hidup guna menginduksi respons fisiologis maupun seluler tertentu. Dampak yang dihasilkan dapat berupa modifikasi fungsi biologis yang bersifat menguntungkan atau merugikan bagi organisme target, tergantung pada karakteristik spesifik dan dosis senyawa tersebut (Aloanis et al., 2024). Dalam bidang pangan, senyawa ini dikategorikan sebagai komponen non-nutrisi yang ditemukan konsentrasi rendah, mampu memodulasi metabolisme tubuh untuk meningkatkan status kesehatan.

Pada jaringan tumbuhan, senyawa bioaktif umumnya merupakan metabolit sekunder yang berperan penting dalam sistem pertahanan hayati dan adaptasi

terhadap tekanan lingkungan. Daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) secara spesifik menyimpan berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan senyawa fenolik yang berperan sebagai agen antibakteri dan antioksidan. Menurut Paneerchelvan et al. (2015), alkaloid berperan dalam mengintervensi integritas komponen penyusun sel, yang mengakibatkan kegagalan pembentukan dinding sel secara sempurna serta memicu kematian sel. Selain itu, alkaloid juga memiliki kapasitas untuk menghambat biosintesis asam nukleat pada bakteri. Di sisi lain, flavonoid menunjukkan aktivitas antibakteri melalui tiga mekanisme utama, yakni inhibisi sintesis asam nukleat, perusakan fungsi membrane sel, serta gangguan pada sistem metabolisme energi. Sementara itu, saponin bekerja sebagai agen aktif permukaan yang mampu menurunkan tegangan permukaan membrane sel. Proses ini meningkatkan permeabilitas membrane secara signifikan, yang pada akhirnya menyebabkan kebocoran konstituen intraseluler dan keluarnya senyawa-senyawa penting dari dalam sel (Putri et al., 2024).

Selain Berperan sebagai agen antibakteri, senyawa bioaktif dalam daun pala menunjukkan kemampuan antioksidan yang signifikan, yang terutama berasal dari kelompok senyawa fenolik. Sebagai metabolit sekunder, senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk menghentikan rantai reaksi oksidatif dengan menangkal radikal bebas. Menurut Wardani et al (2020), mekanisme antioksidan terjadi melalui donor elektron atau atom hidrogen dari gugus hidroksil fenolik kepada molekul radikal bebas. Proses tersebut memungkinkan penetralan spesies reaktif dan menghambat pembentukan radikal baru secara efektif.

Selain itu, senyawa bioaktif pada daun pala memiliki peran dalam memodulasi stress oksidatif serta mendukung mekanisme perbaikan jaringan. Hal ini berkaitan dengan regulasi spesies oksigen reaktif (ROS) dan stimulasi faktor pertumbuhan yang penting dalam proses regenerasi sel. Ekstrak methanol pada daun pala mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase, yang mengindikasikan bahwa daun pala dapat dimanfaatkan sebagai agen antidiabetes melalui kontrol penyerapan pada glukosa (Azrial, 2025).

## 2.2 Mie Basah

### 2.2.1 Tinjauan Mie Basah

Sebagai salah satu produk olahan serelia, mie merupakan bahan pangan yang sangat populer dan dikonsumsi secara luas oleh masyarakat di Kawasan Asia, termasuk Indonesia. Berdasarkan secara luas pengolahannya, komoditas mie di Indonesia secara umum diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama, yaitu mie basah, mie kering, dan mie instan. Di antara ketiga jenis tersebut, mie basah (Gambar II.3) tergolong cukup populer dan sering dijadikan pangan pokok substitusi nasi. Keunggulan mie basah yang segar, tekstur yang kenyal, serta umunya tanpa penambahan bahan pengawet (Maharani et al., 2023).



Gambar II.3 Mie Basah

Selain itu terdapat komposisi gizi pada mie basah per 100 gram yang disajikan Tabel II.2 sebagai berikut :

Tabel II.2 Komposisi Gizi Mie Basah per 100 gram (Astawan, 1999).

Zat Gizi	Mie Basah
Energy (kal)	86
Protein (g)	0.6
Lemak (g)	3.3
Karbohidrat (g)	14
Kalsium (mg)	13
Besi	-
Vitamin A	-
Vitamin B1 (mg)	-
Vitamin C (mg)	-
Air (mg)	80

Tepung terigu merupakan komponen utama dalam pembuatan mie basah. Tepung terigu sendiri merupakan hasil penggilingan biji gandum hingga menjadi serbuk halus. Berdasarkan data komposisi gizi, setiap 100 gram tepung terigu mengandung energi sebesar 365 kkal, karbohidrat 77,3 g, protein 8,9 g, lemak 1,3 g, serta  $\beta$ -karoten 180 SI/g (Maharani et al., 2023). Tingginya kandungan karbohidrat menempatkan tepung terigu sebagai sumber energi dominan, sementara kandungan protein, khususnya gluten, memegang peran penting dalam pembentukan kerangka adonan yang bersifat elastis dan kenyal.

Mie basah didefinisikan sebagai produk pangan melalui proses perebusan dengan kadar air yang cukup tinggi, yakni mencapai sekitar 52%. Kondisi kadar air yang tinggi tersebut menyebabkan mie basah memiliki stabilitas penyimpanan yang rendah, dengan daya tahan hanya berkisar antara 10 hingga 12 jam pada suhu ruang. Tahap produksinya meliputi pencampuran bahan untuk pembentukan jaringan gluten dan homogenisasi adonan, dilanjutkan dengan proses pengistirahatan (*resting*), pembentukan lembaran (*sheeting*), pencetakan, hingga pemasakan. Tingginya kadar air serta paparan lingkungan selama proses produksi secara

signifikan meningkatkan risiko kontaminasi dan pertumbuhan mikroorganisme perusak (Nurfina et al., 2022).

### 2.2.2 Kontaminan Mie Basah

Mie basah memiliki kelemahan utama pada daya simpan yang relative singkat, yang ditandai dengan degradasi mutu seperti timbulnya aroma asam, perubahan tekstus menjadi lunak dan berlendir, serta struktur yang mudah hancur. Kerentanan ini bersumber dari tingginya kadar air pada mie yang mendukung pertumbuhan dari mikroorganisme, seperti virus, kapang, khamir, dan bakteri. selain faktor kadar air, tingginya kandungan karbohidrat yang tidak diimbangi dengan kandungan antioksidan turut mempercepat laju kerusakan pada mie basah (Handayani & Kumalasari, 2022).

Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) (2009), kelompok mikroba perusak yang umum ditemukan pada produk olahan berbasis tepung terigu adalah bakteri dari genus *Bacillus* dan beberapa jenis kapang. Kontaminasi mikrobiologis ini mengakibatkan perubahan signifikan pada atribut fisik, komposisi kimia, serta organoleptic bahan pangan (Fardiaz, 1992). Aroma asam yang muncul merupakan produk samping dari metabolisme mikroorganisme, bakteri aerobik pembentuk spora, seperti *Bacillus*, memiliki kemampuan untuk mensekresi enzim amilase guna menghidrolisis pati dalam tepung terigu sebagai sumber energi utama, sehingga mampu tumbuh optimal pada kondisi kadar air tinggi. Sebaliknya, pada aktivitas air yang lebih rendah, kapang dari genus *Rhizopus* cenderung mendominasi, ditandai dengan pembentukan miselia dan spora berwarna hitam yang khas (Puspasari, 2007).

## 2.3 *Bacillus*

### 2.3.1 Genus *Bacillus*

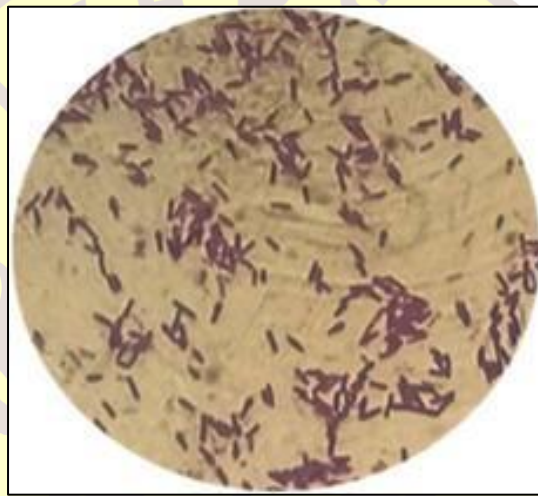
Bakteri merupakan mikroorganisme prokariotik uniseluler yang berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Struktur sel bakteri terdiri atas dinding sel yang berfungsi melindungi protoplas. Protoplas tersusun dari membran sitoplasma yang membatasi komponen intraseluler serta struktur lain seperti ribosom dan kromosom yang berada didalamnya (Padoli, 2016). Bakteri tidak memiliki membran inti, sedangkan komponen genetiknya terdapat di dalam molekul DNA tunggal yang terletak di dalam sitoplasma. Bakteri dapat hidup secara bebas, parasit, maupun saprofit, dan berperan sebagai patogen pada manusia, hewan, dan tumbuhan. Habitat bakteri tersebar luas di berbagai lingkungan, seperti tanah, air laut, atmosfer, lumpur, maupun bahan pangan. Secara morfologi, bakteri memiliki variasi bentuk, antara lain bulat, spiral, dan batang (Alimuddin, 2005).

Perkembangan bakteri dalam bahan pangan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, terutama suhu dan ketersediaan nutrisi. Pertumbuhan bakteri dalam bahan pangan dapat mengakibatkan perubahan fisik atau kimia yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut menjadi tidak layak konsumsi akibat proses pembusukan (Erlinawati & Safridha, 2022). Kontaminan silang merupakan perpindahan zat tercemar dari satu bahan pangan ke bahan lain melalui perantara seperti peralatan, proses pengolahan yang tidak higienis, dan tangan manusia (Arisman, 2009).

Bakteri patogen merupakan kelompok bakteri yang menyebabkan penyakit pada makhluk hidup. Bakteri patogen dapat menyerang organisme hidup terutama manusia dengan sistem imun yang lemah (Sukmawan et al., 2023). Selain itu, bakteri patogen menjadi penyebab utama keracunan makanan (Rorong & Wilar, 2020). Contoh dari bakteri patogen yaitu, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, dan *Clostridium* sp.

*Bacillus* spp. (Gambar II.4) merupakan bakteri berbentuk batang (basil) dan tergolong dalam kelompok bakteri gram positif yang umumnya bersifat aerobik, sebagian besar anggota genus ini memiliki kapsul yang mengandung asam glutamat (D atau L glutamic acid), sedangkan beberapa lainnya mengandung kapsul berbasis

karbohidrat. *Bacillus* spp. banyak ditemukan di tanah, secara morfologi, bakteri ini memiliki ukuran sel sekitar  $0,3-22 \times 1,27-7 \mu\text{m}$ , berbentuk batang dengan ukuran rata-rata  $1 \times 3-4 \mu\text{m}$ , dapat tersusun tunggal, berpasangan, atau membentuk rantai pendek. Sebagian spesies bersifat motil atau mampu bergerak karena mobilitas yang disebabkan oleh flagel. Salah satu karakteristik *Bacillus* adalah kemampuannya membentuk endospora ketika berada dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti suhu tinggi. Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan hidup (Riskawati, 2016).



Gambar II.4 *Bacillus* spp. (Handayani et al., 2022)

Klasifikasi taksonomi *Bacillus* spp. Disajikan Tabel II.3 Sebagai berikut :

Tabel II.3 Taksonomi *Bacillus* spp. (Madigan, 2005).

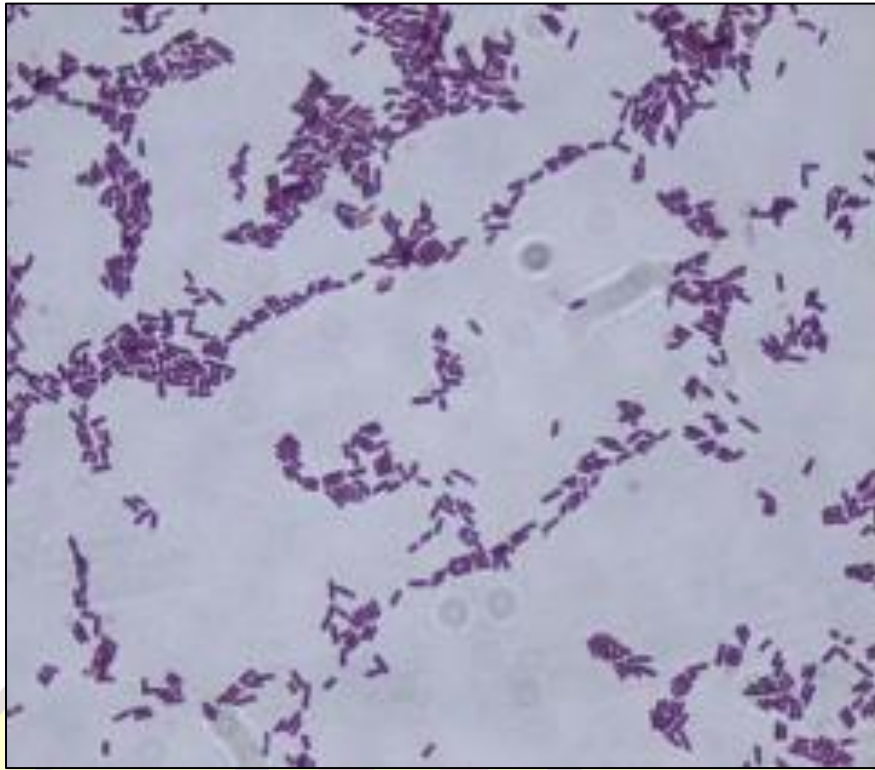
Level Taksonomi	Nama Taksonomi
Kingdom	Procaryotae
phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Ordo	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	<i>Bacillus</i>
Spesies	<i>Bacillus</i> sp

### 2.3.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* (Gambar II.5) merupakan bakteri spesies dari genus *Bacillus* dan tergolong sebagai bakteri gram positif yang bersifat aerob atau anaerob fakultatif, dan heterotrof. *B. subtilis* berbentuk batang, bersel satu, berukuran  $0,5-2,5 \mu\text{m} \times 1,2-10 \mu\text{m}$ , dan bereaksi katalase positif dengan suhu pertumbuhan optimal berkisar  $25^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$ . *B. subtilis* memiliki fisiologi yang berbeda dari bakteri lain yang bukan patogen, yakni relatif mudah dimanipulasi secara genetik dan mudah pula dibiakkan sehingga dapat dikembangkan pada skala industri (Suriani et al., 2016).

*B. subtilis* ini dapat bertahan pada kondisi lingkungan tertentu, yakni pada suhu  $-5$  sampai  $75^{\circ}\text{C}$  dengan tingkat keasaman (pH) antara 2-8 (Suriani et al., 2016). *B. subtilis* secara umum bersifat saprofit dan banyak ditemukan di tanah. Di dalam tanah, *B. subtilis* memanfaatkan eksudat akar dan bahan tanaman mati sebagai sumber nutrisinya, ketika kondisi lingkungan tidak sesuai dengan pertumbuhannya, misalnya karena suhu tinggi, tekanan fisik dan kimia, atau kahat nutrisi (Suriani et al., 2016), maka *B. subtilis* akan membentuk endospora yang membantunya menghadapi kondisi lingkungan ekstrem, tetapi dibalik itu, endospora ini bersifat *irreversible*, menghabiskan banyak energi, dan memakan waktu berjam-jam untuk diselesaikan. Spora yang diciptakan dengan hasil tinggi tetap akan memiliki kualitas yang relatif buruk (Qin et al., 2022).

*B. subtilis* diketahui dapat menyebabkan gangguan pencernaan, seperti diare, apabila terdapat dalam jumlah yang tinggi pada bahan pangan yang dikonsumsi (Zaini et al., 2024). Karenanya keberadaan spesies *Bacillus* perlu mendapatkan perhatian sebagai salah satu indikator potensi berbahaya bagi produk pangan terutama produk mie basah.



Gambar II.5 *Bacillus subtilis* (Hussein et al, 2019)

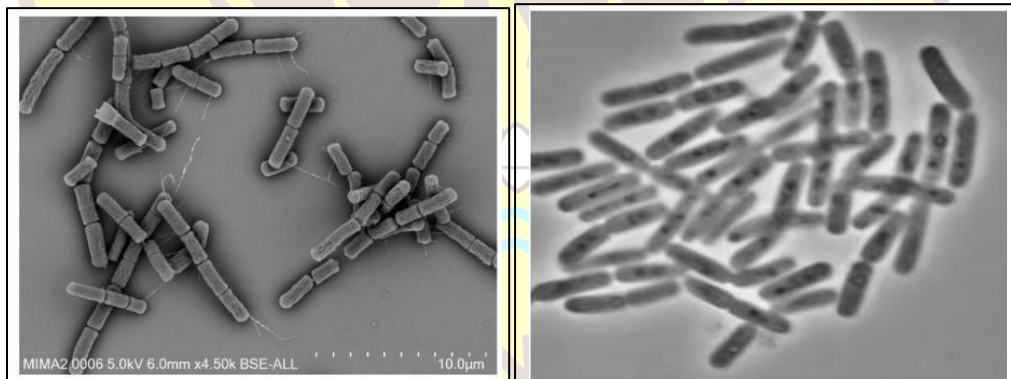
### 2.3.3 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (Gambar II.6) merupakan bakteri gram positif bersifat anaerob fakultatif berbentuk batang pendek dan tersusun dalam rantai panjang dengan ukuran lebar 1,0  $\mu\text{m}$ -1,2  $\mu\text{m}$  dan Panjang 3  $\mu\text{m}$ -5  $\mu\text{m}$  (Basaniah et al., 2024). *B. cereus* dikenal sebagai patogen pangan yang tersebar luas di lingkungan alami serta mudah menyebar melalui debu dan serangga hingga berpotensi mencemari berbagai bahan pangan (Yang et al., 2023).

Secara fisiologis, *B. cereus* mampu berkembang biak pada rentang pH 4,5-9,5, aktivitas air ( $a_w$ ) lebih dari 0,93, serta suhu antara 4°C hingga 48°C (Rodrigo et al., 2021). Kemampuan adaptasi yang tinggi ini memungkinkan bakteri tumbuh pada berbagai jenis makanan apabila kondisi lingkungan mendukung, selain itu, kemampuan membentuk spora menjadi salah satu faktor utama yang meningkatkan daya tahannya terhadap kondisi ekstrem, termasuk pada produk pangan yang

melalui proses pengeringan atau dikonversi menjadi bentuk bubuk (Samodra et al., 2024). Ketahanan spora tersebut menyebabkan *B. cereus* berpotensi mencemari hampir seluruh jenis bahan pangan (Rodrigo et al., 2021).

Keracunan pangan yang disebabkan oleh *B. cereus* merupakan salah satu bentuk penyakit bawaan makanan yang terjadi akibat produksi toksin oleh *B. cereus*. Toksin utama yang dihasilkan meliputi enterotoksin yang menyebabkan diare dan toksin emetik yang dikenal sebagai cereulide. Kedua jenis toksin ini menimbulkan gejala keracunan berupa diare dan muntah (Yang et al., 2023). Secara mekanismenya, cereulide bekerja sebagai ionofor selektif terhadap ion kalium ( $K^+$ ) yang menyebabkan penurunan potensial transmembran mitokondria yang bergantung pada kalium. Setelah diproduksi dalam pangan dan tertelan, cereulide akan diserap di usus dan didistribusikan ke seluruh bagian tubuh. Toksin ini mampu menembus sawar darah otak serta terakumulasi di hati dan ginjal, sehingga kondisi tertentu dapat menyebabkan kegagalan multi yang serius hingga berujung pada kematian (Yang et al., 2023).



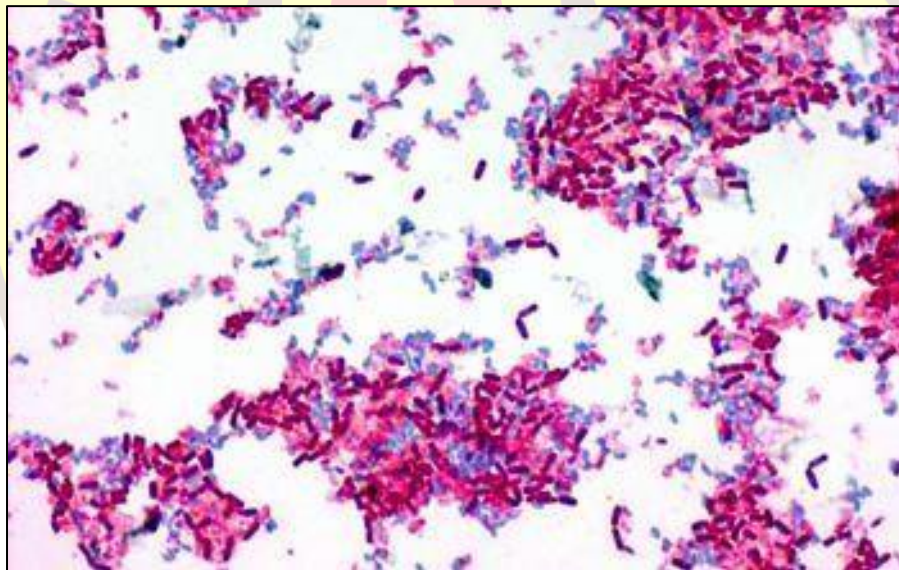
Gambar II.6 *Bacillus cereus* (De Vries et al., 2004)

#### 2.3.4 *Bacillus pumilus*

*Bacillus pumilus* (Gambar II.7) merupakan bakteri gram positif berbentuk batang, dan bersifat aerobik, mempunyai kemampuan membentuk spora berupa endospora dan dapat menghasilkan berbagai enzim serta senyawa bioaktif. *B. pumilus*

umumnya ditemukan di berbagai lingkungan termasuk air laut, sedimen laut dalam, dan tanah. Spesies ini menunjukkan ketahanan yang signifikan terhadap kondisi lingkungan ekstrem, misalnya ketersediaan nutrisi yang rendah atau bahkan tidak ada nutrisi, kekeringan, radiasi, disinfektan kimia, enzim oksidatif, dan tekanan osmotik tinggi (Dobrzyński et al., 2022).

Dalam keamanan pangan, keberadaan *B. pumilus* perlu mendapatkan perhatian khusus mengingat kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menyebabkan degradasi komponen bahan pangan. Aktivitas enzimatik tersebut berkontribusi terhadap penurunan mutu produk, baik secara fisik maupun kimiawi. Selain itu, *Bacillus pumilus* mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder yang berpotensi menimbulkan gangguan apabila terakumulasi dalam jumlah tinggi pada pangan yang dikonsumsi (Dobrzyński et al., 2022).



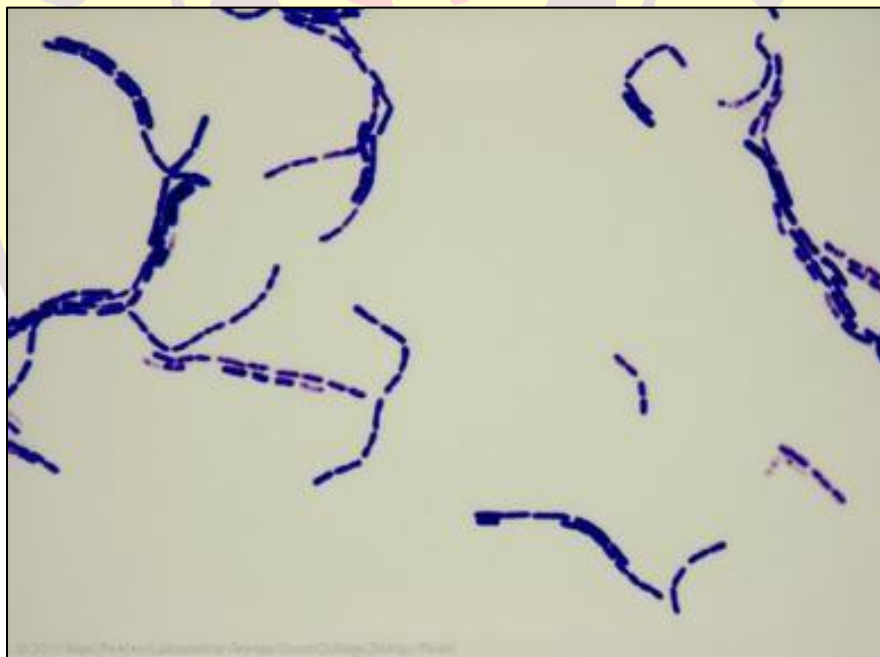
Gambar II.7 *Bacillus pumilus* (Mazlan et al., 2021)

### 2.3.5 *Bacillus megaterium*

*Bacillus megaterium* (Gambar II.8) merupakan bakteri endofit yang dapat ditemukan di jaringan tanaman dan daun. Selain itu, *B. megaterium* dapat ditemukan di sawah, makanan kering, air laut, sedimen, ikan, dan flora normal, dan

bahkan dalam madu lebah, karena kemampuan tumbuh pada berbagai macam karbon sumber (Nugraheni et al., 2022). Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup dalam jaringan inang tanpa menyebabkan penyakit. Bakteri jenis ini akan masuk ke dalam jaringan melalui bagian yang terpapar udara, misal pada tanaman maka bakteri ini akan masuk umumnya melalui akar, namun bisa juga lewat bunga, batang, daun, dan kotiledon (Istia'nah et al., 2020).

Nama *B. megaterium* diambil dari “mega” yang artinya besar dan “terium” yang artinya makhluk. Mencerminkan ukuran yang besar dengan panjang mencapai 4  $\mu\text{m}$  dan diameter 1,5  $\mu\text{m}$ , menjadikannya salah satu bakteri terbesar yang diketahui hingga saat ini. Bakteri ini juga merupakan pembentuk spora, dengan kemampuan bertahan terhadap lingkungan ekstrem, fluktuasi suhu, dan kekurangan nutrisi (Istia'nah et al., 2020). Selain itu, *B. megaterium* dapat menghasilkan auksin dan sitokinin (Nugraheni et al., 2022).



Gambar II.8 *Bacillus megaterium* (Cahya et al., 2022)

## 2.4 Nanoteknologi

Nanoteknologi merupakan bidang ilmu pengetahuan dan teknologi yang mempelajari objek-objek kecil, nanoteknologi merupakan subjek interdisipliner karena mengintegrasikan berbagai disiplin ilmu, seperti fisika, kimia, biologi, dan teknik, untuk mengendalikan serta memanipulasi materi pada tingkat molekuler (Ahmad et al., 2024). Perkembangan nanoteknologi menunjukkan kemajuan yang pesat dalam dunia sains dan industri, termasuk dalam bidang pangan, khususnya pada aspek pengawetan dan keamanan pangan. Salah satu aplikasi adalah mendeteksi patogen dan toksin dengan memanfaatkan karakteristik unik yang dimiliki nanomaterial. Selain itu, sifat khas nanomaterial, seperti luas permukaan yang tinggi dan reaktivitas yang meningkat, menjadikannya berpotensi sebagai agen antibakteri dan pengawet dalam industri pangan (Ahmad et al., 2024).

Nanopartikel merupakan salah satu bentuk nanomaterial yang banyak berkembang, nanopartikel sendiri merupakan partikel material yang memiliki ukuran yang sangat kecil pada skala nanometer, yaitu berkisar 1-100 nm. Ukuran yang sangat kecil ini memberikan sifat fisik, kimia, dan biologis yang berbeda dibandingkan material berukuran makro, sehingga meningkatkan potensinya dalam berbagai aplikasi. Berbagai jenis nanopartikel telah dikembangkan, antara lain nanopartikel emas, perak, besi, zink, serta logam oksida (Prasad, 2013).

### 2.4.1 Nanopartikel Perak

Perak merupakan logam transisi lunak yang memiliki reflektivitas tinggi dan dikenal memiliki sifat antimikroba. Sepanjang sejarah, perak telah dimanfaatkan untuk membantu membatasi penyebaran penyakit, termasuk penggunaan pada berbagai benda yang berkaitan dengan kehidupan sehari-hari. Aktivitas biologis perak terutama muncul ketika logam ini berada dalam bentuk ion monoatomik ( $\text{Ag}^+$ ), khususnya saat terdispersi atau terlarut dalam lingkungan berair, sehingga lebih mudah berinteraksi dengan sel mikroba (Sim et al., 2018).

Menurut Zyro et al. (2023), perak merupakan agen bakterisida alami yang memiliki efektivitas tinggi terhadap sekitar 650 spesies bakteri dengan tingkat resistensi yang sangat rendah. Dibandingkan dengan jenis logam lainnya, perak lebih unggul dalam aplikasi medis karena spektrum antimikroba yang luas, mencakup bakteri gram positif, gram negatif, jamur, protozoa, dan virus.

Terdapat tiga mekanisme yang diketahui bagaimana perak bekerja terhadap mikroba. Pertama, kation perak dapat membentuk pori-pori dan menusuk dinding sel bakteri dengan bereaksi dengan komponen peptidoglikan. Kedua, ion perak dapat masuk ke dalam sel bakteri, baik menghambat respirasi sel maupun mengganggu jalur metabolisme yang menghasilkan spesies oksigen reaktif. Ketiga, setelah berada di dalam sel, perak juga dapat mengganggu DNA dan siklus replikasinya (Sim et al., 2018).

Nanopartikel perak (AgNPs) merupakan salah satu jenis nanopartikel logam yang memiliki aplikasi sangat luas, antara lain pada bidang optik, elektronik, biologi, katalis, dan kedokteran. AgNPs dikenal karena memiliki sifat optik, elektronik, dan antibakteri yang unik, dengan ukuran partikel berkisar 1-100 nm, dengan luas permukaan partikel yang sangat besar sehingga meningkatkan reaktivitas serta kemampuan untuk berinteraksi dengan sistem biologis (Sati et al., 2025).

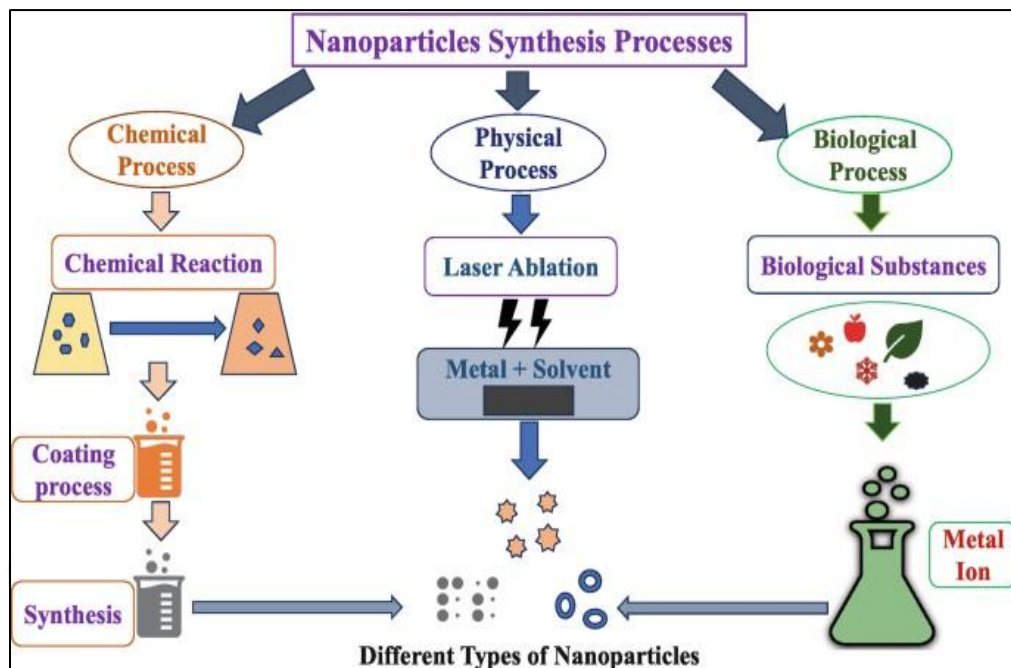
Dibandingkan dengan nanopartikel logam lainnya, nanopartikel perak termasuk salah satu yang banyak dikembangkan dan memiliki tingkat komersialisasi yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh berbagai keunggulan yang dimilikinya, seperti konduktivitas yang baik, stabilitas termal yang tinggi, aktivitas katalitik, serta efektivitas antimikroba yang luas. Karakteristik fisik dan kimia yang khas menjadikan nanopartikel perak menarik perhatian dalam pengembangan berbagai produk dan aplikasi (Oktavia & Sutoyo, 2021). Selain itu, nanopartikel perak memiliki toksisitas dan resistansi yang cenderung lebih rendah karena setelah bekerja melawan strain bakteri, nanopartikel perak akan mengalami perbaikan yang kemudian dapat menyebabkan kerusakan DNA bakteri.

Nanopartikel perak sendiri diketahui menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap berbagai bakteri gram positif maupun gram negatif. Mekanisme kerjanya yang dapat langsung secara simultan maupun terpisah. Salah satu mekanisme utama yaitu AgNPs bekerja pada tingkat membran sel dengan partikel terakumulasi pada membran dan menyebabkan destabilisasi serta kerusakan struktur membran. Hal ini disebabkan oleh nanopartikel yang memproduksi spesies oksigen reaktif (ROS) seperti radikal bebas dan hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang menyebabkan stress oksidatif dan merusak lipid, protein, serta DNA bakteri (Nanda et al., 2025), sehingga meningkatkan permeabilitas membran, memicu kebocoran komponen intraseluler, dan akhirnya menyebabkan kematian sel. Selain itu AgNPs juga berinteraksi dengan protein yang mengandung sulfur pada dinding sel bakteri, sehingga menimbulkan kerusakan struktural yang berujung pada pecahnya dinding sel (Bruna et al., 2021).

Berkaitan dengan efektivitas dan karakteristik biologis tersebut, proses sintesis nanopartikel perak menjadi aspek penting yang menentukan ukuran, stabilitas, dan aktivitasnya. Dalam sintesis nanopartikel, digunakan bahan reduktor yang berperan mereduksi ion perak menjadi partikel berukuran nano. Berdasarkan komposisinya, reduktor dibedakan menjadi reduktor sintesis dan bioreduktor (Susanti, 2021).

Penggunaan reduktor sintesis secara umum terdapat tiga metode utama yaitu fisika, kimia, dan biologis (Gambar II.9). Metode kimia menggunakan zat kimia tertentu seperti natrium borohidrida atau asam askorbat untuk mereduksi menjadi bentuk stabilnya, akan tetapi berpotensi menimbulkan pencemaran lingkungan serta risiko terhadap kesehatan, sedangkan metode fisika memerlukan kondisi operasional yang ekstrem seperti tekanan, suhu, energi, dan biaya yang tinggi seperti menggunakan teknik ablasi laser atau penguapan termal untuk menghasilkan partikel berukuran nano (Nanda et al., 2025). Sebaliknya sintesis metode biologis memanfaatkan sumber daya alam seperti tanaman, bakteri, jamur, dan alga yang berfungsi sebagai agen pereduksi. Selain itu juga lebih hemat energi, tidak bersifat toksik, bebas

polusi, ramah lingkungan, ekonomis, serta menggunakan bahan baku terbarukan yang mudah dibudidayakan dan tersedia melimpah di alam (Rusnaenah et al., 2024).

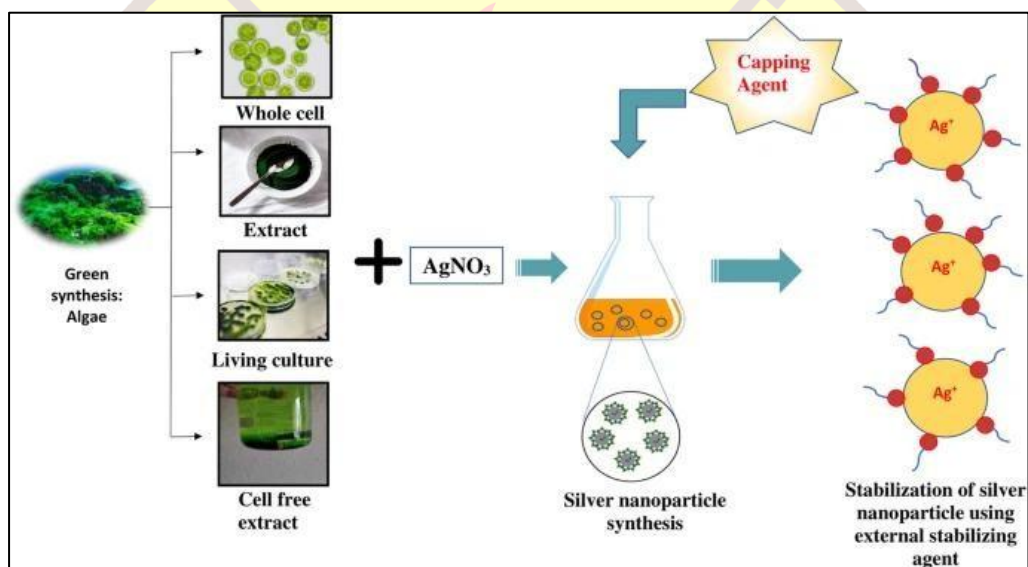


Gambar II.9 Metode sintesis nanopartikel (Chowdhury et al., 2024)

Faktor lain yang mempengaruhi proses sintesis nanopartikel perak dan karakteristik partikel yang dihasilkan. Faktor tersebut meliputi pH, suhu, tekanan, waktu inkubasi, serta komposisi ekstrak sebagai agen reduksi dan penstabil. Nilai pH medium reaksi berpengaruh terhadap ukuran nanopartikel, karena keasaman atau kebasaan dapat mempengaruhi laju reduksi ion perak, suhu media reaksi menentukan sifat fisik dan stabilitas nanopartikel yang terbentuk, tekanan pada media reaksi dapat mempengaruhi bentuk dan ukuran partikel yang disintesis, dan waktu inkubasi turut mempengaruhi kualitas nanopartikel yang disintesis, selain itu komposisi ekstrak sebagai agen reduksi dan penstabil juga berperan dalam sintesis (Patra & Kwang, 2014).

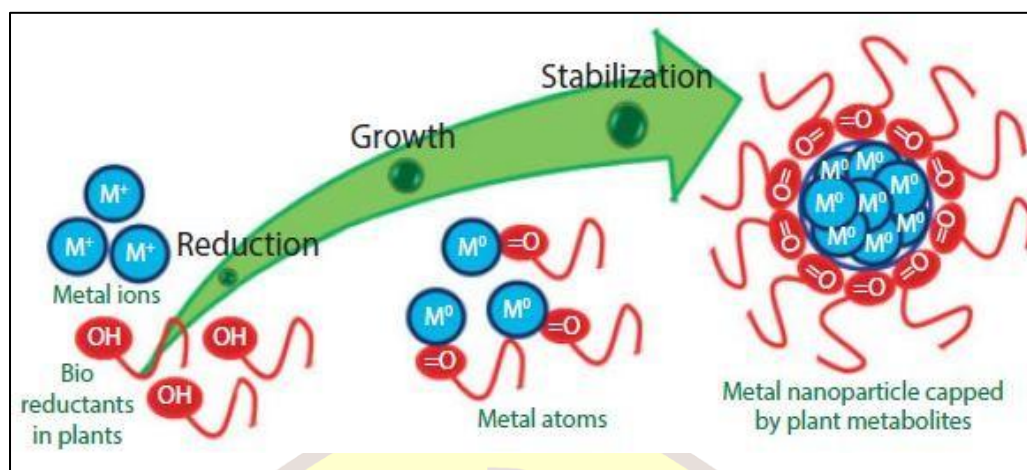
## 2.4.2 Sintesis Hijau

Sintesis hijau atau *green synthesis* (Gambar II.10) merupakan metode sintesis nanopartikel yang memanfaatkan bahan biologis sebagai bahan reduktor alami, yang umumnya berasal dari ekstrak tumbuhan atau mikroorganisme yang mengandung senyawa antioksidan atau poliol yang berperan sebagai agen pereduksi sekaligus penstabil dalam proses pembentukan nanopartikel perak sehingga menjadikan metode ini lebih ramah lingkungan, aman dan minim toksisitas dibandingkan metode konvensional (Arifin et al., 2016). Selain pendekatan biologis, metode sol-gel juga kerap dikombinasikan biosintesis untuk menghasilkan nanopartikel perak dengan stabilitas yang lebih baik.



Gambar II.10 Visualisasi sintesis hijau nanopartikel perak (Chugh et al., 2021).

Prinsip dasar sintesis hijau yaitu melalui peran gugus fungsi pada metabolit sekunder yang bertindak sebagai reduktor dengan mendonorkan elektron sehingga ion perak ( $\text{Ag}^+$ ) tereduksi menjadi perak elemental ( $\text{Ag}^0$ ) (Qurrataayun et al, 2022) (Gambar II.11). Ion perak yang berasal dari prekursor, seperti perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), direduksi oleh senyawa bioaktif dalam biomaterial. Proses reduksi ini diikuti oleh tahap pembentukan inti partikel (nukleasi) serta pertumbuhan partikel hingga mencapai ukuran nano (Nanda et al., 2025).



Gambar II.11 Visualisasi reaksi kimia sintesis hijau (Chugh et al., 2021).

### 2.4.3 NL-AgNPs

Daun pala diketahui kaya akan senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, dan terpenoid berdasarkan hasil skrining fitokimia. Senyawa fenolik yang terkandung berpotensi berperan sebagai agen pereduksi alami (Putri et al., 2023). Menurut Paneerchelvan et al (2025) kandungan fenolik tersebut diketahui berkontribusi terhadap antioksidan dan antibakteri, sehingga daun pala berpotensi dimanfaatkan sebagai sumber bioreduktor dalam sintesis nanopartikel perak. Selain itu, daun pala belum dimanfaatkan secara optimal, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber bahan alami yang melimpah.

NL-AgNPs merupakan nanopartikel perak yang disintesis dengan sintesis hijau dengan memanfaatkan ekstrak daun pala sebagai agen bioreduktor. Pemilihan daun pala didasarkan pada ketersediaan yang relatif melimpah serta pemanfaatannya yang masih belum maksimal. Selain itu, kandungan senyawa aktif seperti flavonoid yang ada pada daun pala menjadi salah satu kriteria utama dalam pemilihan bahan biologis, sehingga menjadikan daun pala sebagai kandidat yang tepat dan potensial dalam sintesis nanopartikel perak (Sefelin et al., 2025).

## 2.5 Karakterisasi Toksisitas *Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles* (NL-AgNPs)

Karakterisasi merupakan tahap penting untuk memvalidasi keberhasilan pembentukan nanopartikel sekaligus mengidentifikasi sifat fisikokimianya (Zhang et al., 2016). Sifat-sifat tersebut, meliputi dimensi partikel, morfologi, distribusi ukuran, luas permukaan, kelarutan, hingga derajat agregasi, secara signifikan menentukan aktivitas biologis yang dihasilkan. Parameter fisikokimia ini juga berperan dalam menentukan stabilitas koloid, reaktivitas kimia, serta pola interaksi nanopartikel saat terpapar pada sistem biologis.

Meskipun potensi aplikasinya sangat luas, nanopartikel perak (AgNPs) memiliki tantangan spesifik terkait aspek toksisitas yang dipengaruhi oleh karakteristik partikelnya. Menurut Barar (2015) menjelaskan bahwa AgNPs dengan ukuran yang lebih kecil memiliki rasio luas permukaan terhadap volume yang lebih besar, sehingga meningkatkan interaksi seluler yang berisiko mengganggu fungsi dasar sel. Di sisi lain, muatan permukaan yang tinggi pada skala nano memfasilitasi interaksi dengan dinding sel bakteri serta meningkatkan absorpsi molekul antibiotik, yang memperkuat efikasi antibakteri (Sa'ed et al., 2024). Faktor stabilitas juga menjadi kunci untuk menjamin penghantaran yang presisi, meminimalkan efek samping sistemik, dan mencegah berkembangnya resistensi mikroba (Wahab et al., 2021).

Secara mekanisme, interaksi AgNPs dengan sistem biologis dapat memicu stress oksidatif melalui pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang berdampak pada kerusakan DNA, peroksidasi lipid, hingga apoptosis. Sebagai upaya mitigasi, pendekatan *green synthesis* yang memanfaatkan agen biologis sebagai penstabil diketahui mampu mereduksi potensi toksisitas tersebut dibandingkan metode kimia konvensional. Namun, menurut Eker et al., (2025) tetap menegaskan bahwa aspek keamanan harus menjadi prioritas utama, mengingat penggunaan AgNPs pada dosis atau konsentrasi tinggi masih berisiko menimbulkan efek toksisitas.

Untuk mengevaluasi karakteristik AgNPs secara komprehensif, diperlukan serangkaian Teknik analitik seperti spektroskopi *Ultraviolet-visible* (Uv-Vis), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Analisis Uv-Vis berfungsi untuk mengonfirmasi pembentukan nanopartikel melalui deteksi fenomena *Surface Plasmon Resonance* (SPR), sementara FTIR berperan dalam mengidentifikasi gugus fungsi organik yang bertindak sebagai agen pereduksi maupun penstabil. Terakhir, pengamatan terhadap ukuran aktual, distribusi, serta morfologi partikel dilakukan secara visual dan langsung menggunakan instrument TEM (Zhang et al., 2016).

Terbentuknya nanopartikel perak tidak hanya ditandai dengan perubahan warna, tetapi ditandai dengan adanya  $\lambda_{maks}$  di kisaran 400-450 nm yang merupakan khas nanopartikel perak (Handoko et al., 2022). Rentang serapan tersebut berkaitan dengan fenomena *Surface Plasmon Resonance* (SPR) yaitu osilasi kolektif elektron pada permukaan logam akibat interaksi dengan radiasi elektromagnetik pada antarmuka logam-dielektrik, yang umumnya terdapat pada emas dan perak. Fenomena SPR dapat diamati melalui spektrum serapan yang diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Menurut Noor Komar (2026) hasil analisis UV-Vis terhadap NL-AgNPs menunjukkan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 420 nm dengan nilai absorbansi 1,599 a.u. puncak tersebut berada dalam rentang karakteristik SPR khas nanopartikel perak (400-450 nm), sehingga mengonfirmasi keberhasilan pembentukan AgNPs. Sebaliknya, larutan AgNO<sub>3</sub> hanya menunjukkan nilai absorbansi yang relatif rendah dan tidak menampilkan puncak khas SPR. Sementara itu, ekstrak daun pala menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 660 nm yang berkaitan dengan keberadaan senyawa bioaktifnya.

Analisis menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) dapat mengkarakterisasi gugus fungsi suatu molekul (Siti et al., 2021) karena teknik ini mendeteksi interaksi antara radiasi inframerah dengan ikatan kovalen dalam molekul. Ketika suatu molekul menyerap radiasi dari inframerah, terjadi eksitasi

energi vibrasi berupa gerakan *stretching* (tarikan) dan *bending* (tekukan) pada ikatan antar atom. Setiap jenis ikatan kimia memiliki frekuensi vibrasi yang khas sehingga menyerap radiasi inframerah pada bilangan gelombang tertentu. Perbedaan karakteristik serapan ini yang menghasilkan spektrum inframerah spesifik bagi setiap molekul. Sehingga bentuk puncak serapan pada spektrum dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gugus fungsi dalam suatu molekul (Raturandang et al., 2022). Berdasarkan Noor Komar (2026) hasil spektrum FTIR menunjukkan larutan  $\text{AgNO}_3$  memperlihatkan pita serapan pada daerah sekitar  $1380\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  yang berkaitan dengan vibrasi gugus nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), serta pita lebar pada kisaran  $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  yang diduga berasal dari gugus O-H. Spektrum ekstrak daun pala 1% menunjukkan karakteristik pita serapan yang kompleks, yaitu pita lebar pada sekitar  $3300\text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan keberadaan gugus O-H (fenol), pita pada sekitar  $2900\text{ cm}^{-1}$  yang berkaitan dengan vibrasi C-H alifatik, serta pita pada daerah sekitar  $1600\text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan adanya ikatan C=C aromatic atau C=O. keberadaan gugus fungsi tersebut menunjukkan adanya senyawa bioaktif yang berperan dalam proses ion perak. Pada spektrum NL-AgNPs 0,1% terlihat pergeseran pita dengan ekstrak daun pala sebelum sintesis. Pergeseran pita pada daerah O-H serta perubahan pada wilayah sekitar  $1600\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya interaksi antara gugus fungsi senyawa bioaktif dengan ion  $\text{Ag}^+$  selama proses pembentukan nanopartikel. Selain itu kemunculan pita pada daerah bilangan gelombang rendah ( $<600\text{ cm}^{-1}$ ) mengindikasikan kemungkinan terbentuknya interaksi antara perak dengan gugus fungsi organik (Ag-O).

Berdasarkan laporan Noor Komar (2026), karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan analisis FTIR menunjukkan bahwa nanopartikel perak berhasil disintesis melalui pendekatan sintesis hijau berbasis ekstrak daun pala. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa bioaktif dalam ekstrak daun pala berperan dalam reduksi sekaligus agen penstabil nanopartikel.

### III METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menguraikan mengenai : (3.1) Bahan dan Alat, (3.2) Metode Penelitian, (3.3) Prosedur Penelitian, serta (3.4) Jadwal Penelitian.

#### 3.1 Bahan dan Alat

##### 3.1.1 Bahan – Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam proses penelitian ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu bahan utama dan bahan analisis. Bahan utama yang digunakan adalah daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) tua berwarna hijau gelap yang diambil dari Taman Pertanian Putra, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia. Serta bahan penunjang mie basah yang dibeli dari The Centrum, Serdang, Selangor, Malaysia.

Bahan analisis yang digunakan sebagai berikut : etanol *absolute* 99,5% (SYSTEM, Selangor, Malaysia), air destilasi (*Distilled water*), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Insitute of Bioscience, UPM, Serdang, Selangor, Malaysia), *Chlorhexidine* (CHX) (Oxoid Ltd., UK), *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Oxoid Ltd., UK), *Silver Nitrate Solution* ( $\text{AgNO}_3$ ) (Smart-Lab., Selangor, Malaysia), *Muller-Hinton Broth* (MHB) (Oxoid Ltd., UK), *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid Ltd., UK), *phosphate-buffered saline* (PBS) (Hampshire, England).

Mikroba patogen yang didapatkan dari American Type Culture Collection yang disimpan di *Laboratory of Microbiology and Biochemistry Faculty of Science and Technology*, Universiti Putra Malaysia. Spesifikasi mikroba yang digunakan disajikan pada Tabel III.1, sebagai berikut :

Tabel III.1 Spesifikasi strain kultur

Varian	Asal	Media Kultur
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC33019	Mueller-Hinton agar
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	Mueller-Hinton agar
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC14884	Mueller-Hinton agar
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC14581	Mueller-Hinton agar

Note:

ATCC: American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)

### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan yaitu oven, blender Panasonic MK-5087M (Panasonic Corporation, Osaka, Jepang), plastik, botol Steril, neraca digital (Mettler Toledo, Ohio, USA), kertas saring *Whatman* No.1 steril (Whatman International Ltd, Middlesex, Inggris), Pompa aspirator (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Jepang), labu erlenmeyer, corong, labu Buchner, labu didih, *Rotary Vacuum Evaporator* Heidolph Laborota 4000 *Efficient* (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Jerman), *incubator C24 incubator shaker* (Edison, NJ. USA), *universal bottle, refrigerator, Electric Oven Dryer* YXD 2A BDO-10 (Shanghai Yiheng Scientific Instruments Co., Ltd., China), jangka sorong, A&D MX-50 *moisture analyser* (A&D Co. Ltd., Tokyo, Japan), *tarred dish*, CR 400 *Chroma* meter (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan). 3510 Jenway pH meter (Cole-Parmer Instrument Co., Staffordshire, United Kingdom), Aqualab *Water Activity Analyzers* (Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, USA), cawan Petri, *cotton bud, autoclave*, pinset, inkubator, pipet mikron, *96-well plate, magnetic stirrer, glass pasteur pipette* 6mm, plate media, *micro pipette* 1000  $\mu$ L, *micro pipette* 100  $\mu$ L, *pipette tips* 1000  $\mu$ L, *pipette tips* 100  $\mu$ L, *pipette tips* 10  $\mu$ L, *ependof tube*, vortex, aluminium foil.

## 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian terdiri dari tiga tahap penelitian, yaitu: **Tahap I.** Karakterisasi bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan Ekstraksi bubuk daun pala. **Tahap II.** Pembuatan sintesis hijau NL-AgNPs dan menentukan aktivitas antibakteri terhadap spesies *Bacillus* spp. **Tahap III.** Aplikasi ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan NL-AgNPs terhadap mie basah selama penyimpanan.

### 3.2.1 Rancangan Percobaan

**Tahap I.** Karakterisasi bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan Ekstraksi bubuk daun pala.

**Tahap I.** terdiri dari beberapa prosedur yang dilakukan, yaitu karakterisasi fisikokimia bubuk daun pala meliputi kadar air, warna ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), pH, dan aktivitas air ( $a_w$ ). Selanjutnya ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol *absolute* 99,5%. Ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya.

**Tahap II.** Pembuatan sintesis hijau NL-AgNPs dan menentukan aktivitas antibakteri terhadap spesies *Bacillus* spp.

**Tahap II.** Terdiri dari prosedur nanopartikel perak dengan sintesis hijau ekstrak daun pala. Selanjutnya pengujian aktivitas anti-*Bacillus* dengan 3 prosedur, yaitu *Well Diffusion Assay* (WDA) untuk menentukan aktivitas anti-*Bacillus* dengan menghitung diameter zona bening yang muncul dilakukan secara  $3 \times 3$ , *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) untuk menentukan konsentrasi terendah dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus* spp., dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) untuk menentukan konsentrasi terendah dalam membunuh *Bacillus* spp.

**Tahap III.** Aplikasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap mie basah selama penyimpanan.

**Tahap III.** Terdiri dari aplikasi pada mie basah dengan perlakuan marinasi menggunakan ekstrak daun pala dan NL-AgNPs pada konsentrasi tertentu sebagai antibakteri. Analisis evaluasi pertumbuhan bakteri menggunakan metode Total Plate Count (TPC) untuk mengetahui berapa banyak mikroba secara alami pada mie basah.

### 3.2.2 Respon Pengujian

**Tahap I.** Bubuk daun pala yang dianalisis meliputi kadar air (%), warna (nilai  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), pH, dan aktivitas air ( $a_w$ ) dan perhitungan rendemen hasil ekstraksi.

**Tahap II.** Nanopartikel perak daun pala (NL-AgNPs), WDA dengan menghitung zona bening yang muncul akibat aktivitas senyawa antibakteri, MIC berdasarkan pertumbuhan minimal *Bacillus* yang tumbuh, sehingga dapat diketahui konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus*, MBC berdasarkan tidak adanya pertumbuhan *Bacillus*, sehingga dapat diketahui konsentrasi yang mampu membunuh *Bacillus*.

**Tahap III.** Aplikasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap mie basah menggunakan metode perhitungan  $\log_{10}$  CFU/mL dari pengolahan data hasil TPC.

### 3.2.3 Analisis Data

Dalam penelitian ini menggunakan analisis data kuantitatif statistik deskriptif, uji *Analysis of Variance* (ANOVA), dan uji lanjut menggunakan uji *Tukey* untuk melihat perbedaan yang signifikan. Semua data dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan perangkat lunak statistik Minitab, Microsoft Excel.

Uji statistik deskriptif merupakan deskripsi suatu data berdasarkan nilai rata-rata (Mean), standar deviasi, varian, maksimum, minimum, *sum*, *range*, kurtosis, dan *skewness*. Statistik deskriptif umumnya digunakan untuk menggambarkan profil data sampel sebelum menggunakan Teknik analisis statistik untuk menguji hipotesis. Statistik deskriptif juga menyajikan ukuran-ukuran numerik yang sangat penting bagi data sampel (Ghozali, 2016).

Analisis varians (ANOVA) untuk menentukan perbedaan signifikansi antara rata-rata untuk setiap perlakuan, dengan perangkat lunak aplikasi Minitab digunakan

untuk menganalisis data untuk analisis varians (Two-Way ANOVA). Tes *Tukey* akan digunakan untuk menentukan signifikansi perbedaan ( $p < 0,05$ ) antara perlakuan tersebut serta tingkat perbedaan yang signifikan antara setiap perlakuan. Hasilnya kemudian akan dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD) duplikat, yang akan ditampilkan dalam perangkat lunak. Analisis perbedaan rata-rata akan dilakukan dengan menggunakan metode *Tukey*, dengan perbedaan signifikan yang ditentukan antara rata-rata sampel ( $p < 0,05$ ), Tingkat kepercayaan 95% dalam tes *Tukey* akan digunakan untuk ANOVA.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Pala**

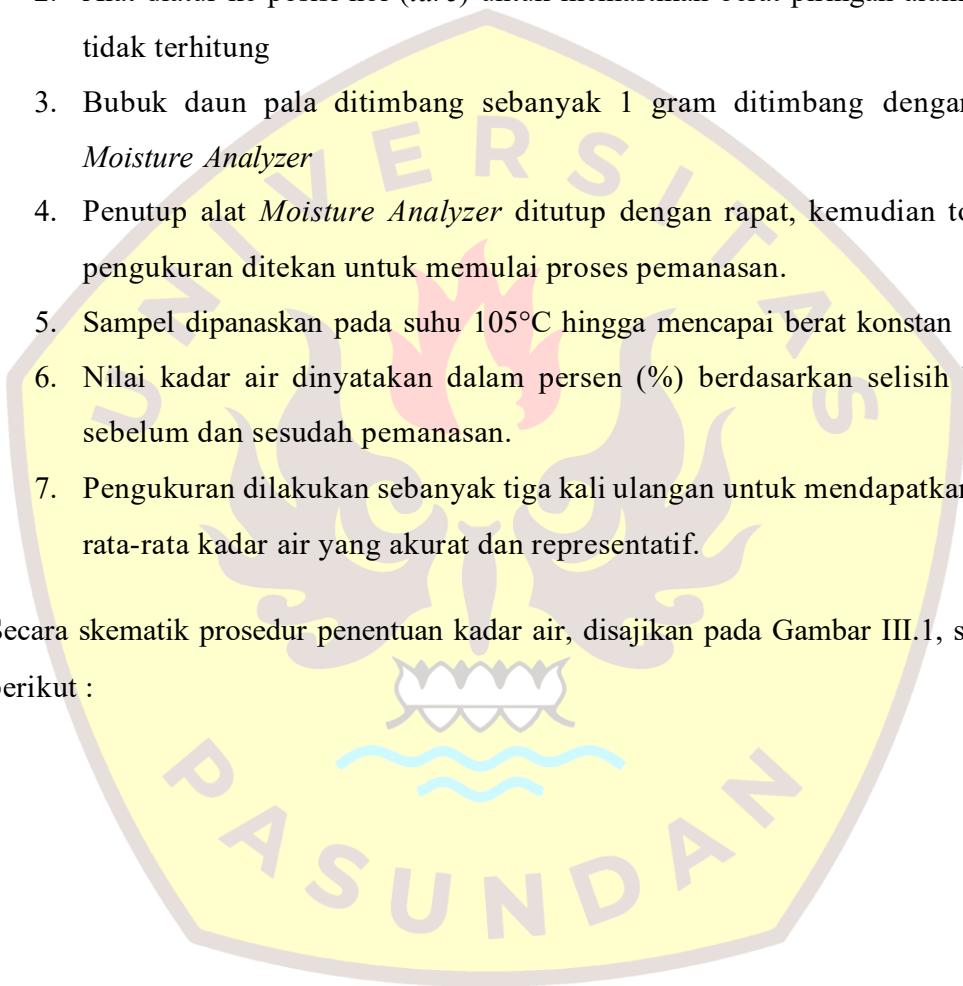
Analisis fisikokimia bubuk daun pala dilakukan untuk mengevaluasi mutu awal bahan baku yang akan digunakan. Parameter yang diamati meliputi kadar air, warna, pH, dan aktivitas air ( $a_w$ ). Kadar air berpengaruh terhadap stabilitas dan kandungan metabolit sekunder serta mempercepat degradasi senyawa akibat oksidasi ataupun pertumbuhan mikroba (Nisa et al., 2023). Analisis warna dilakukan sebagai indikator mutu bahan baku, stabilitas senyawa bioaktif, serta konsistensi bahan karena perubahan warna mencerminkan terjadinya degradasi pigmen maupun senyawa bioaktif. Nilai pH dianalisis karena berhubungan dengan kestabilan, kelarutan, dan reaktivitas senyawa bioaktif, serta dapat memengaruhi efisiensi isolasi senyawa aktif, terutama senyawa fenolik (Nurintan et al., 2025). Sementara itu, aktivitas air ( $a_w$ ) dianalisis untuk menggambarkan ketersediaan air bebas yang dapat mempercepat perubahan stabilitas struktur internal dan penurunan fungsi senyawa bioaktif akibat proses degradasi, terutama melalui reaktif oksidatif (Kim et al., 2026). Dengan demikian, analisis fisikokimia diperlukan untuk memastikan bahwa bubuk daun pala memiliki karakteristik yang sesuai agar dapat menghasilkan ekstrak yang optimal.

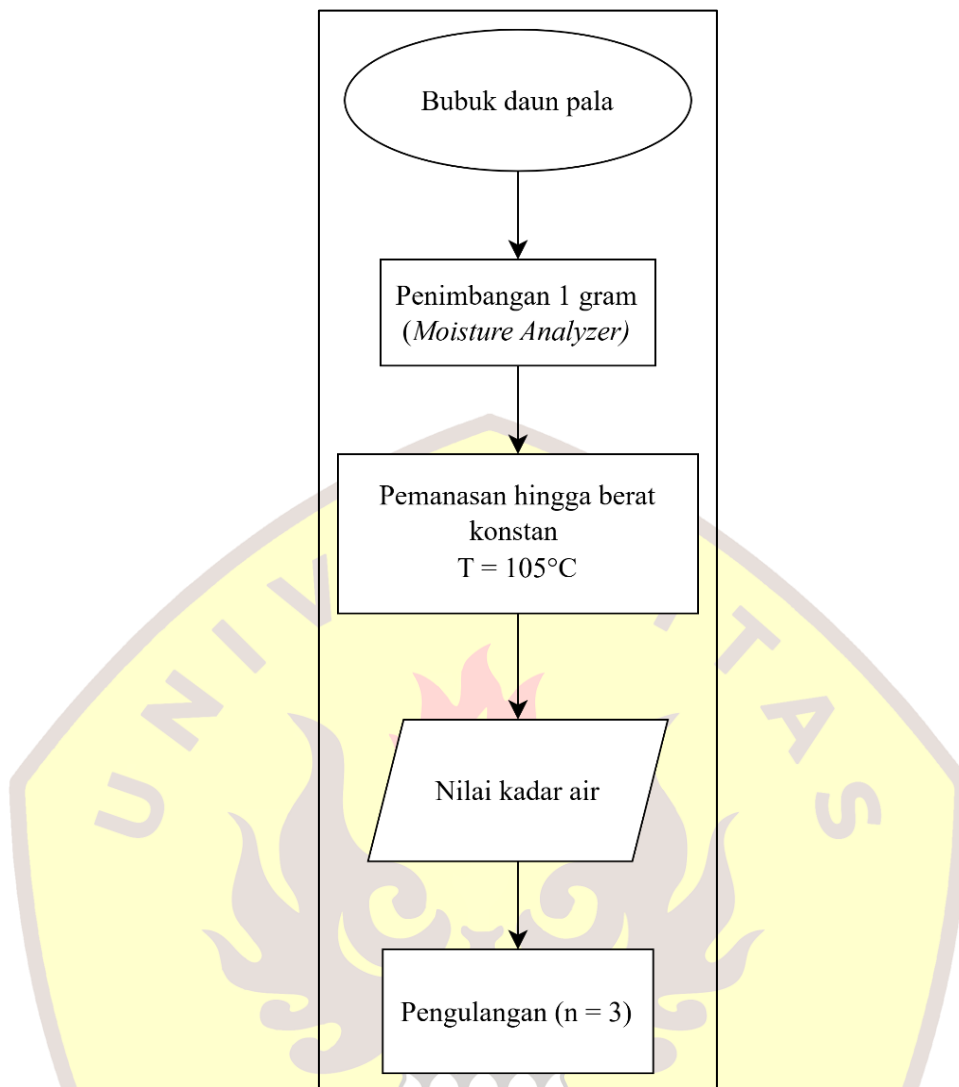
### 3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Prosedur analisis penentuan kadar air pada bubuk daun pala sebagai berikut :

1. Alat A&D MX-50 *moisture analyser* (A&D Co. Ltd., Tokyo, Japan) dihidupkan dan dipastikan piringan alumunium dalam keadaan bersih dan kering.
2. Alat diatur ke posisi nol (*tare*) untuk memastikan berat piringan alumunium tidak terhitung
3. Bubuk daun pala ditimbang sebanyak 1 gram ditimbang dengan alat *Moisture Analyzer*
4. Penutup alat *Moisture Analyzer* ditutup dengan rapat, kemudian tombol pengukuran ditekan untuk memulai proses pemanasan.
5. Sampel dipanaskan pada suhu 105°C hingga mencapai berat konstan
6. Nilai kadar air dinyatakan dalam persen (%) berdasarkan selisih bobot sebelum dan sesudah pemanasan.
7. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata kadar air yang akurat dan representatif.

Secara skematik prosedur penentuan kadar air, disajikan pada Gambar III.1, sebagai berikut :





Gambar III.1 Diagram alir Penentuan kadar air

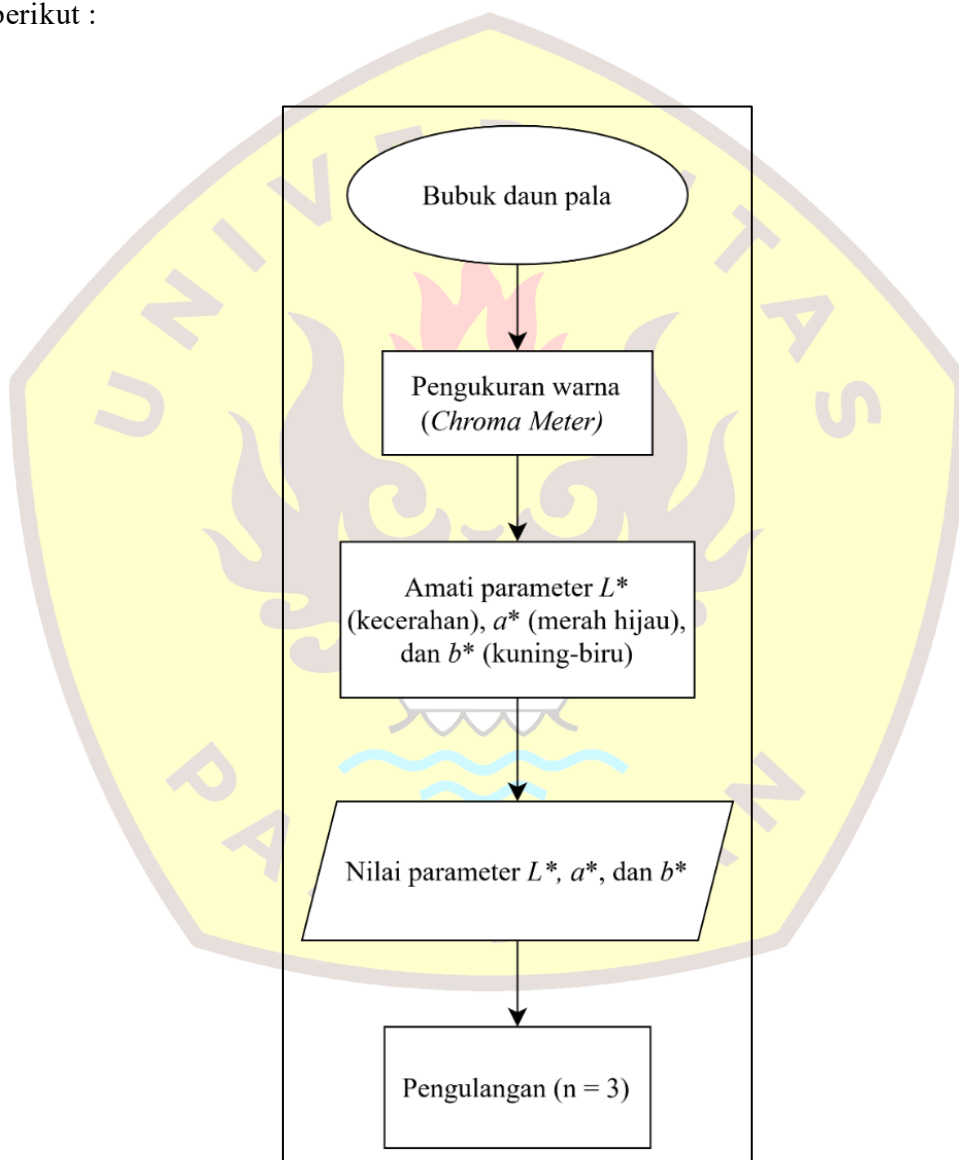
### 3.3.1.2 Penentuan Warna

Prosedur penentuan warna pada bubuk daun pala sebagai berikut :

1. Bubuk daun pala ditempatkan pada permukaan datar berwarna putih dan diratakan untuk memastikan homogenitas permukaan sampel
2. Pengukuran warna dilakukan menggunakan CR 400 *Chroma* meter (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan) yang sebelumnya sudah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan ubin putih standar (*white calibration plate*).

3. Lensa sensor pada alat *Chroma meter* ditempelkan secara rapat pada permukaan wadah berisikan sampel bubuk daun pala.
4. Nilai parameter warna yang diamati meliputi  $L^*$  (kecerahan),  $a^*$  (intensitas merah-hijau), dan  $b^*$  (intensitas kuning-biru).
5. Setiap pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk memperoleh nilai rata-rata representatif.

Secara skematik prosedur penentuan warna, disajikan pada Gambar III.2, sebagai berikut :



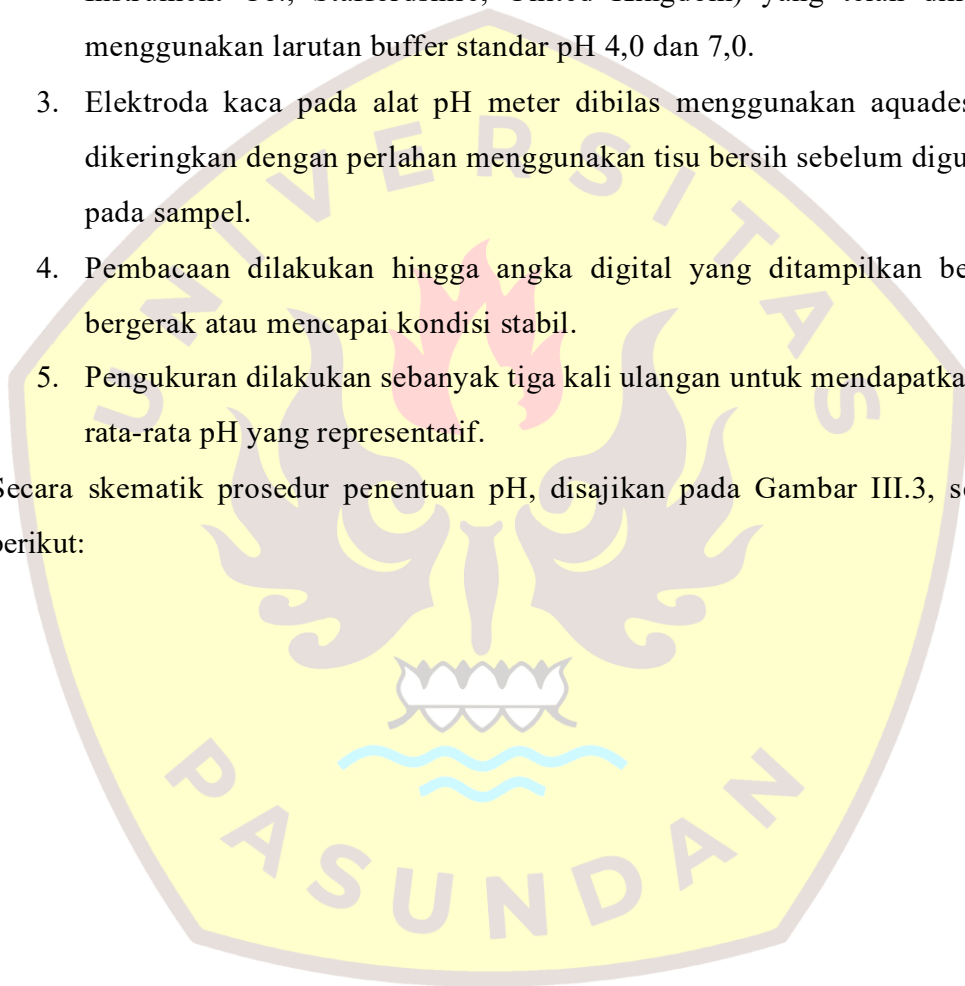
Gambar III.2 Diagram alir penentuan warna

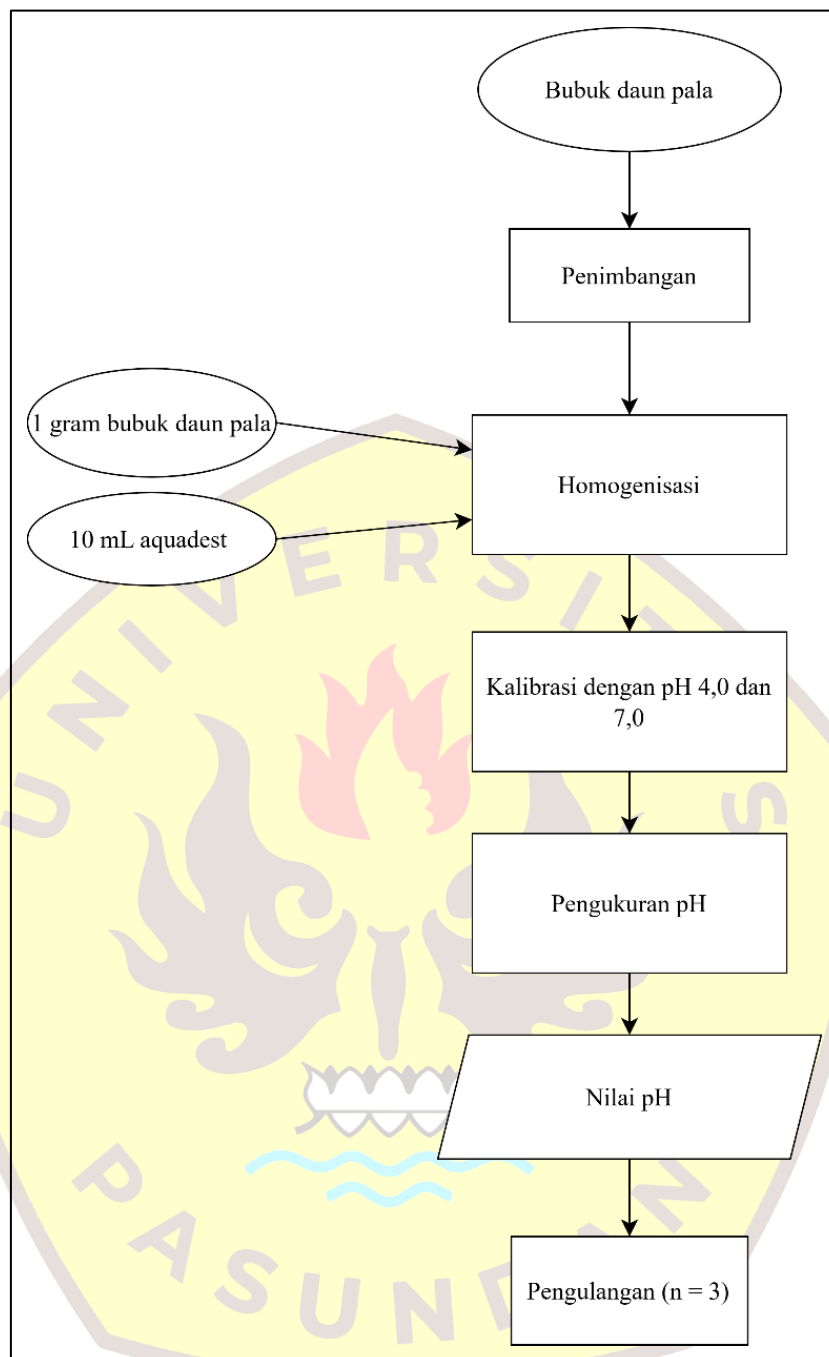
### 3.3.1.3 Penentuan pH

Prosedur penentuan pH pada bubuk daun pala sebagai berikut :

1. Sebanyak 1 gram bubuk daun pala ditimbang dan dilarutkan ke dalam 10 mL air destilasi, kemudian dihomogenkan sehingga terbentuk suspensi yang merata.
2. Nilai pH diukur menggunakan 3510 Jenway pH meter (Cole-Parmer Instrument Co., Staffordshire, United Kingdom) yang telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer standar pH 4,0 dan 7,0.
3. Elektroda kaca pada alat pH meter dibilas menggunakan aquadest dan dikeringkan dengan perlahan menggunakan tisu bersih sebelum digunakan pada sampel.
4. Pembacaan dilakukan hingga angka digital yang ditampilkan berhenti bergerak atau mencapai kondisi stabil.
5. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata pH yang representatif.

Secara skematik prosedur penentuan pH, disajikan pada Gambar III.3, sebagai berikut:





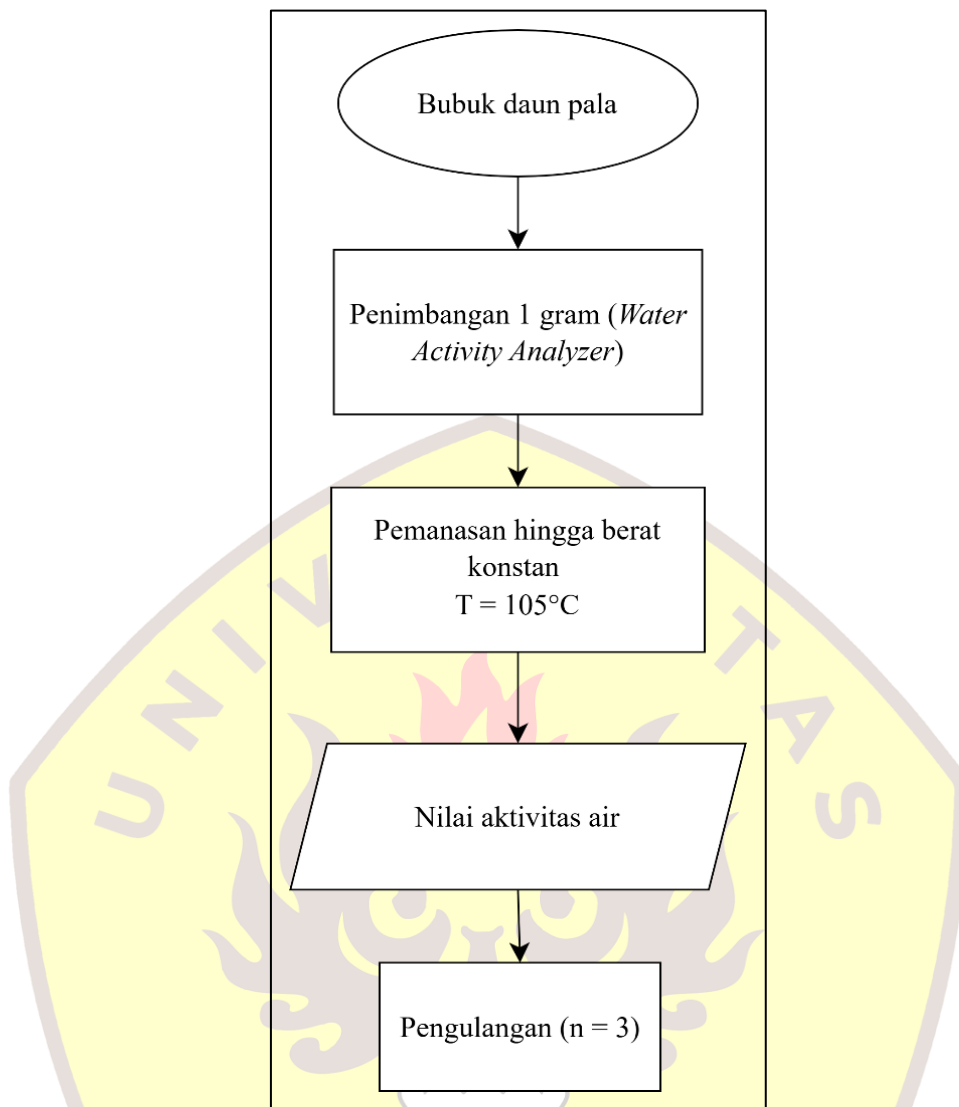
Gambar III.3 Diagram alir penentuan pH

### 3.3.1.4 Penentuan aktivitas air ( $a_w$ )

Prosedur penentuan aktivitas air ( $a_w$ ) sebagai berikut :

1. Alat Aqualab *Water Activity Analyzers* (Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, USA), dihidupkan dan dibiarkan menyala selama beberapa saat agar suhu alat stabil dan siap digunakan.
2. Bubuk daun pala dimasukkan ke dalam cawan sampel berbahan plastik transparan pada alat  $a_w$  meter. Sampel diratakan hingga menutupi dasar cawan secara merata.
3. Wadah berisi sampel dimasukkan secara hati-hati ke dalam laci atau ruang pengukuran (*sensor chamber*) pada alat  $a_w$  meter.
4. Ruang pengukuran ditutup dengan rapat untuk mengisolasi sampel dan memastikan sensor tidak terpengaruh oleh kelembapan udara dari lingkungan luar
5. Proses pembacaan dilakukan selama beberapa menit hingga angka digital berhenti bergerak atau telah mencapai kondisi stabil.
6. Nilai aktivitas air yang ditampilkan pada alat dicatat sebagai hasil pengujian.
7. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata aktivitas air yang akurat dan representatif.

Secara skematik prosedur aktivitas air ( $a_w$ ), disajikan pada Gambar III.4, sebagai berikut:



Gambar III.4 Diagram alir penentuan aktivitas air ( $a_w$ )

### 3.3.2 Ekstraksi Daun Pala

Prosedur pembuatan ekstrak daun pala adalah sebagai berikut :

1. Preparasi Bahan

Bubuk daun pala dan etanol *absolute* 99,5% disiapkan sebagai bahan pengujian.

2. Penimbangan Bahan

Bubuk daun pala ditimbang dengan berat 100 g menggunakan timbangan elektronik (Mettler Toledo, Ohio, USA).

### 3. Ekstraksi (Maserasi)

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, yaitu bubuk daun pala dicampurkan dengan etanol *absolute* dengan perbandingan 1 : 3 (b/v) di dalam labu Erlenmeyer, kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan diekstraksi menggunakan *C24 incubator shaker* (Edison, NJ, USA) dengan suhu ( $30 \pm 2,0$  °C) selama 24 jam.

### 4. Penyaringan Vakum

Larutan hasil ekstraksi disaring menggunakan filtrasi vakum dengan kertas saring *Whatman No.1* (Whatman International Ltd, Middlesex, Inggris) dan pompa aspirator (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Jepang) dengan tujuan memisahkan filtrat dari ampasnya.

### 5. Pemekatan Ekstrak

Filtrat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada kecepatan 75 RPM dan suhu 40°C selama 28 menit hingga diperoleh ekstrak daun pala.

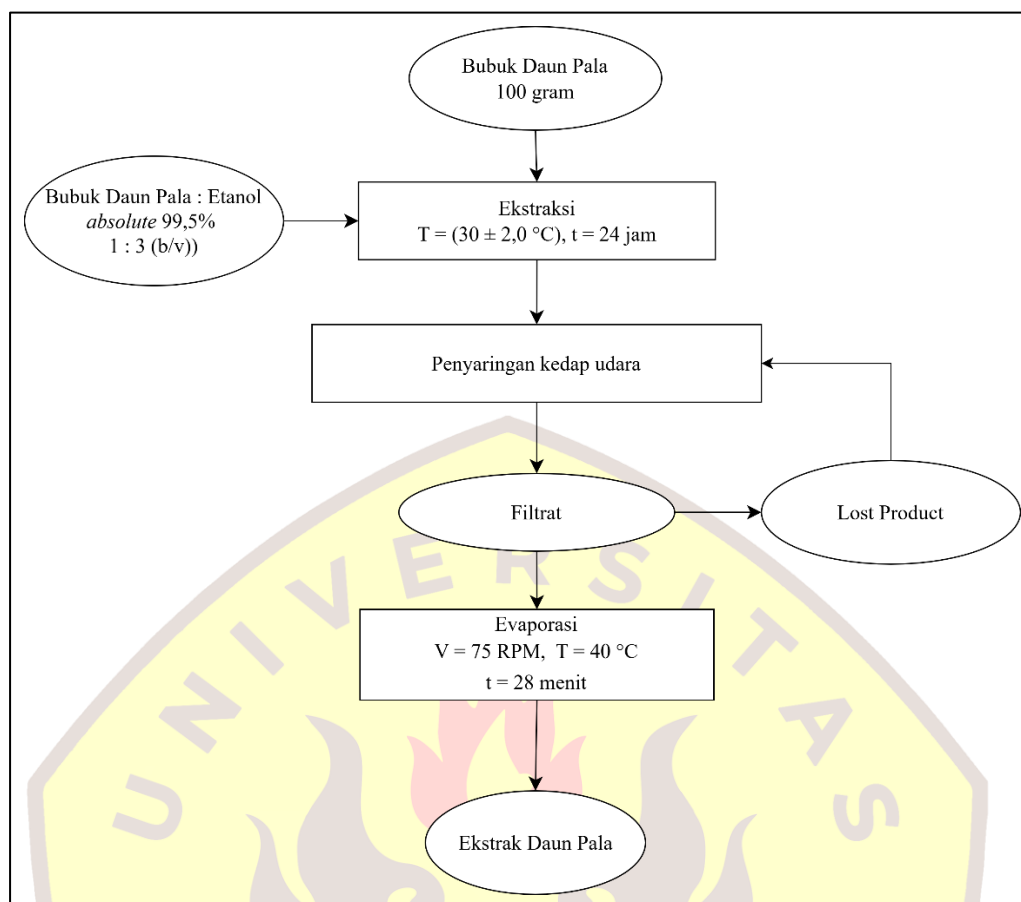
### 6. Penimbangan Akhir dan Perhitungan Rendemen

Ekstrak daun pala yang diperoleh dipindahkan ke dalam *universal bottle*, kemudian ditimbang untuk menentukan berat akhir dan menghitung rendemen ekstrak daun pala (Rumus 1) (Rukayadi et al., 2008).

Secara skematik rumus rendemen, disajikan pada Rumus 1, sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)}: \frac{\text{Berat ekstrak daun pala (g)}}{\text{Berat basis (g)}} \times 100$$

Secara skematik prosedur ekstraksi, disajikan pada Gambar III.5, sebagai berikut:



Gambar III.5 Diagram Alir Ekstraksi Daun Pala

### 3.3.3 Sintesis Hijau Daun Pala Nanopartikel Perak

Prosedur sintesis hijau daun pala nanopartikel perak adalah sebagai berikut :

1. Preparasi Bahan

Ekstrak daun pala, *Dimethyl sulfoxidine* (DMSO) 10%, dan larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 1 mM disiapkan sebagai bahan pengujian

2. Pembuatan Ekstrak Daun Pala 10%

Ekstrak daun pala ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% hingga diperoleh larutan ekstrak daun pala dengan konsentrasi 10%

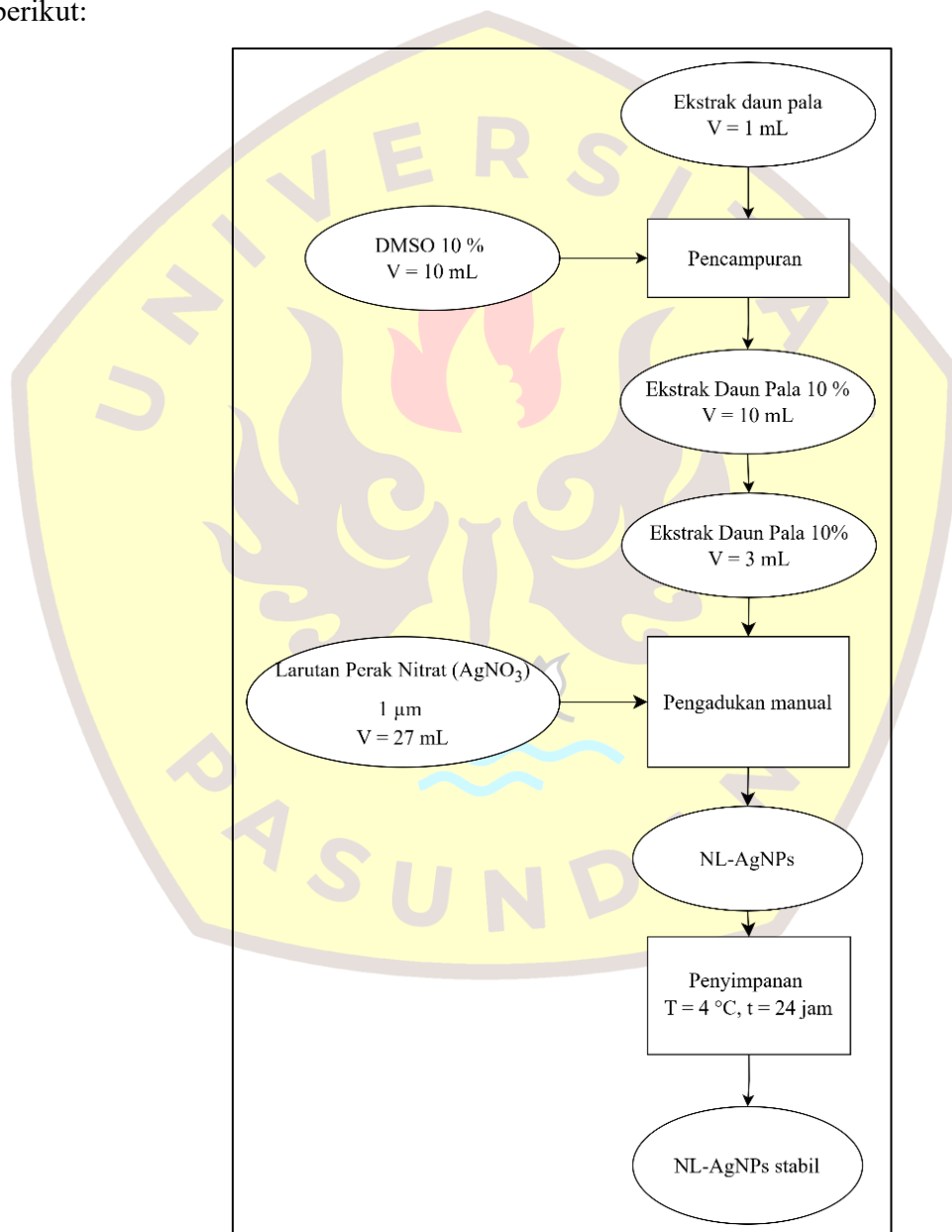
3. Proses Sintesis

Larutan ekstrak daun pala 10% dipipet dan dicampurkan dengan 27 mL larutan  $\text{AgNO}_3$ , kemudian disintesis melalui pengadukan secara manual hingga terbentuk nanopartikel perak (NL-AgNPs) (Qurrataayun, 2022).

#### 4. Penyimpanan setelah Sintesis

NL-AgNPs yang telah terbentuk disimpan pada suhu  $4\text{ }^\circ\text{C}$  selama 24 jam sebelum digunakan untuk pengujian lanjutan.

Secara skematik prosedur sintesis hijau, disajikan pada Gambar III.6 sebagai berikut:



Gambar III.6 Diagram Alir Prosedur Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Daun Pala

### 3.3.4 Prosedur *Well Diffusion Assay* (WDA)

Prosedur metode WDA adalah sebagai berikut :

1. Persiapan Bahan

*Mueller-Hinton Agar* (MHA), *Chlorhexidine* (CHX) 1% sebagai kontrol positif, *Dimethyl sulfoxidine* (DMSO) 10% sebagai kontrol negatif, ekstrak daun pala 10%, dan NL-AgNPs 1%, serta bakteri yang digunakan adalah *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* dan *B. megaterium* disiapkan sebagai bahan pengujian.

2. Inokulasi bakteri

Masing masing bakteri diinokulasikan ke seluruh permukaan media MHA yang berbeda menggunakan *sterile cotton bud*.

3. Pembuatan Sumuran

Pada media MHA yang telah diinokulasikan bakteri, dibuat beberapa sumuran menggunakan *glass Pasteur pipette* diameter 6mm.

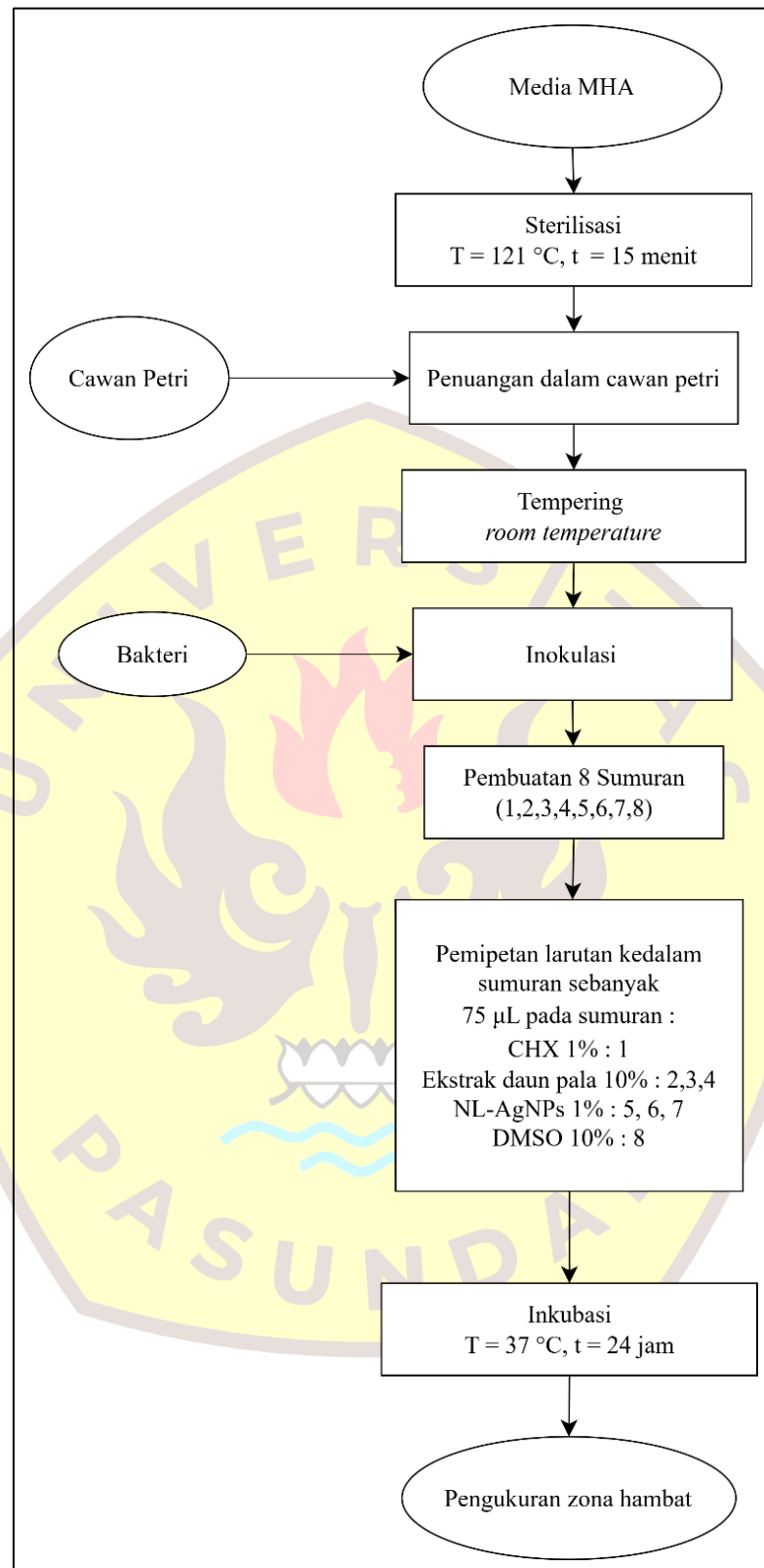
4. Perlakuan Sampel dan Inkubasi

Sebanyak 75  $\mu$ L dari masing-masing larutan perlakuan dimasukkan ke dalam sumuran, yang terdiri dari ekstrak daun pala 10% sebanyak (n=3), NL-AgNPs 1% sebanyak (n=3), CHX 1% sebagai kontrol positif sebanyak (n=1), dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif sebanyak (n=1). Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

5. Perhitungan Zona Bening

Setelah inkubasi, zona bening yang terbentuk pada area sumuran diukur menggunakan alat ukur Panjang (CLSI, 2012).

Secara skematik prosedur WDA, disajikan pada Gambar III.7, sebagai berikut:



Gambar III.7 Diagram Alir *Well Diffusion Assay* (WDA)

### 3.3.5 Prosedur *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Prosedur metode MIC adalah sebagai berikut :

1. Persiapan Bahan

Media *Mueller-Hinton Broth* (MHB), *universal bottle*, *sterile 96 well plate*, ekstrak daun pala 10%, dan NL-AgNPs 1% disiapkan sebagai bahan dan alat pengujian.

2. Inokulasi Bakteri

Biakan bakteri diambil menggunakan *sterile cotton bud*, kemudian dimasukkan ke dalam *universal bottle* berisi 10 mL media MHB dan dihomogenkan menggunakan vortex. prosedur ini dilakukan terpisah untuk setiap bakteri yang digunakan.

3. Penempatan pada *96-Well Plate*

Penempatan perlakuan pada *96-well plate* dilakukan sebagai berikut : kolom A-D digunakan untuk ekstrak daun pala 10% dan kolom E-H untuk NL-AgNPs 1%. Penempatan bakteri meliputi kolom AE untuk *Bacillus cereus*, kolom BF untuk *Bacillus subtilis*, kolom CG untuk *Bacillus pumilus*, dan kolom DH untuk *Bacillus megaterium*.

4. Pengisian Media pada *Well Plate*

Sebanyak 100  $\mu$ L media MHB murni dimasukkan ke dalam kolom 1 pada *96-well plate steril*. Sebanyak 100  $\mu$ L media MHB yang telah diinokulasikan bakteri dimasukkan ke dalam kolom 2 hingga kolom 12 pada *96-well plate*. Sebanyak 100  $\mu$ L sempel dimasukkan ke kolom 12, kemudian dihomogenkan dengan pipet, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan memindahkan 100  $\mu$ L larutan dari kolom 12 ke kolom 11, dan diulangi hingga ke kolom 3.

5. Prosedur Perbandingan dengan Larutan Kontrol

Prosedur yang sama dilakukan pada *96-well plate* lain menggunakan Chlorhexidine (CHX) 1% sebagai kontrol positif pada kolom 12 hingga kolom 3.

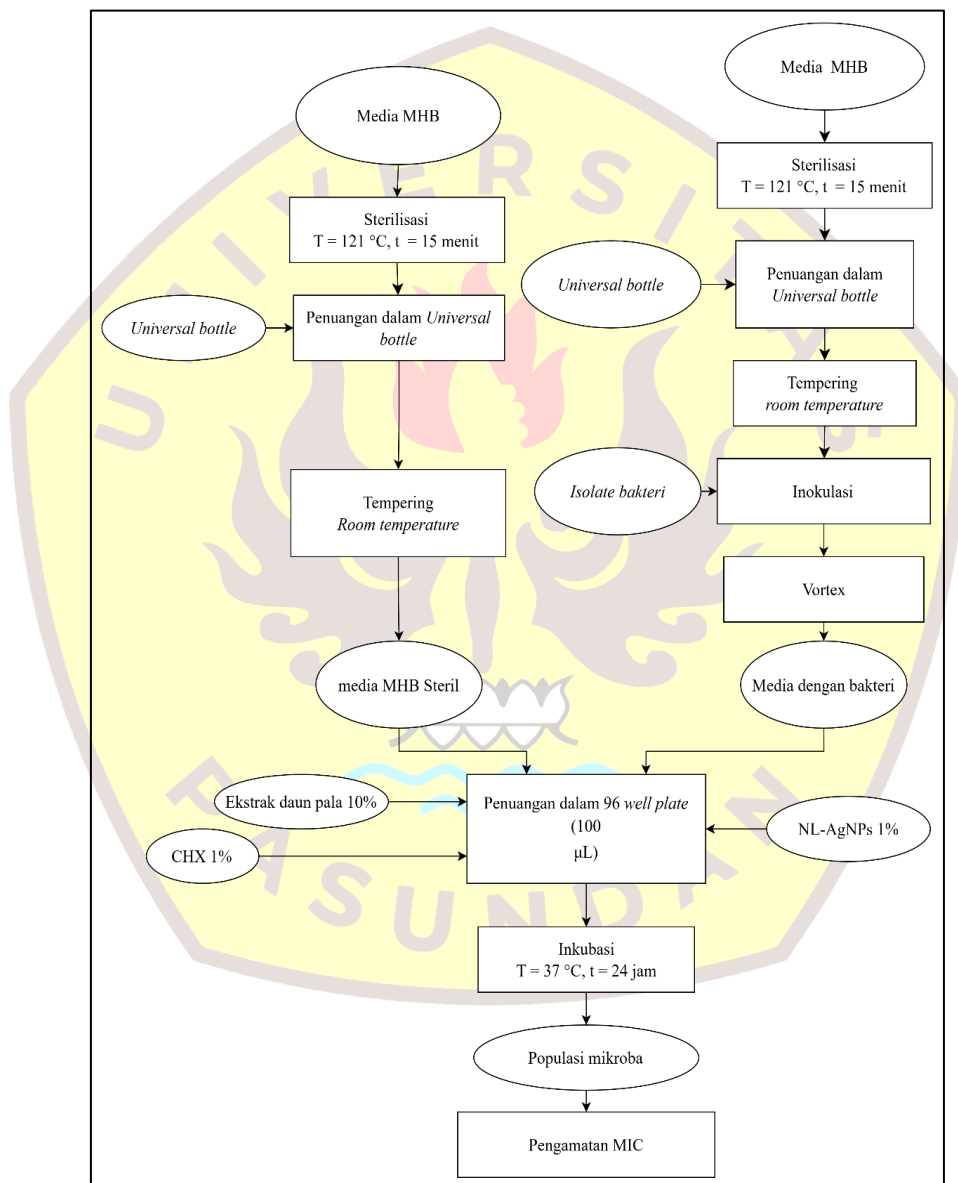
6. Inkubasi *Well Plate*

96-Well plate diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

#### 7. Penentuan Nilai MIC

Setelah inkubasi, terbentuknya endapan diamati. Konsentrasi terendah yang menunjukkan endapan paling sedikit ditentukan sebagai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (CLSI, 2012).

Secara skematik, prosedur *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), disajikan pada Gambar III.8, sebagai berikut:



Gambar III.8 Diagram Alir Metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

### 3.3.6 Prosedur *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Prosedur metode MBC adalah sebagai berikut:

1. Persiapan Bahan

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) disiapkan dalam cawan petri, kemudian bagian bawah cawan petri diberi penanda angka 1-12 mengikuti arah jarum jam.

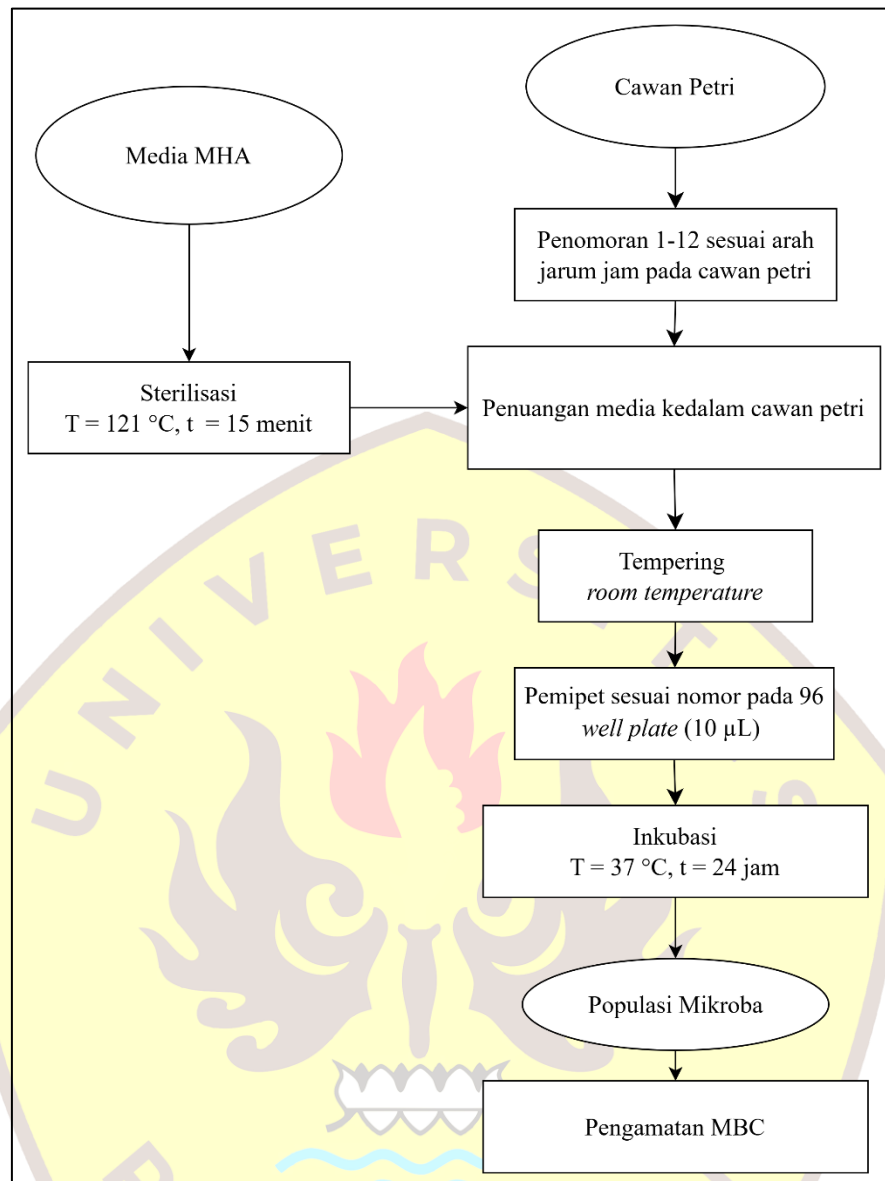
2. Inokulasi Sampel dan Inkubasi

Sebanyak 10  $\mu$ L larutan dari masing masing sumur pada 96 *Well plate* dipipet ke permukaan media MHA sesuai dengan nomor penanda dan jenis bakteri yang digunakan. Setelah seluruh sampel telah diinokulasikan, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Penentuan Nilai MBC

Setelah inkubasi, Analisa nomor yang memiliki bercak terkecil sebagai konsentrasi terendah senyawa antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh bakteri. Konsentrasi terkecil yang diperlukan untuk membunuh pertumbuhan bakteri disebut *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (CLSI, 2012).

Secara skematik, prosedur *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), disajikan pada Gambar III.9, sebagai berikut:



Gambar III.9 Diagram Alir Metode *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

### 3.3.7 Prosedur Aplikasi Nanopartikel Perak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap Mie Basah.

Prosedur aplikasi nanopartikel perak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap mie basah adalah sebagai berikut :

1. Persiapan Bahan

Sampel yang digunakan untuk pengujian terdiri atas kontrol, ekstrak daun pala dengan konsentrasi 0,1% dan 1%, serta NL-AgNPs konsentrasi 0,01% dan 0,1%

2. Standarisasi Sampel

Mie basah dipotong dengan berat seragam ( $1 \pm 0,3$  g), kemudian dimasukan kedalam 10 wadah terpisah, dengan masing masing wadah berisi 10 potongan mie basah.

3. Aplikasi Larutan Perlakuan

Mie basah dimarinasi menggunakan larutan sesuai perlakuan yaitu kontrol, ekstrak daun pala 0,1%, ekstrak daun pala 0,01%, NL-AgNPs 0,1% dan NL-AgNPs 0,01%. Mie basah kemudian disimpan pada dua kondisi suhu, yaitu suhu ruang ( $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 hari.

4. Prosedur Pembilasan

Pada pengamatan, sampel akan dipindahkan ke dalam wadah berisi 10 mL larutan PBS steril dan dihomogenkan menggunakan vortex.

5. Prosedur Pengenceran Bertingkat (*Serial Dilution*)

Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  suspensi diambil dan akan dimasukan ke dalam 990  $\mu\text{L}$  PBS steril untuk didapatkan pengenceran bertingkat hingga mencapai tingkat pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-6}$ .

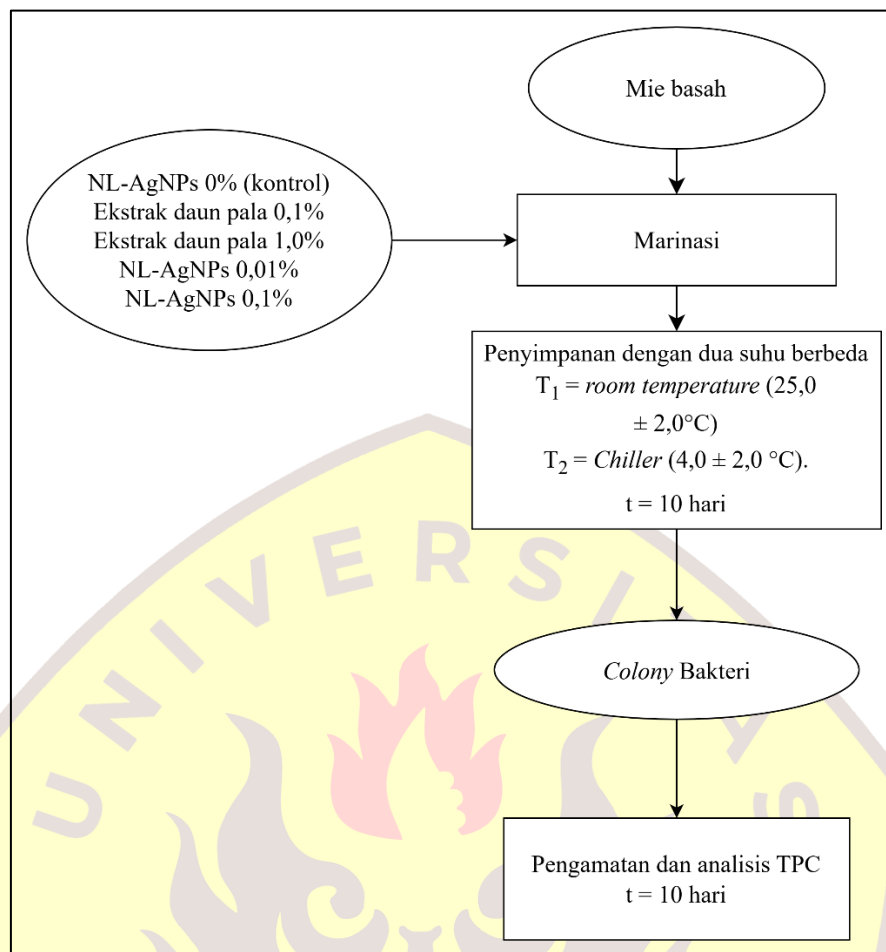
6. Inokulasi dan Inkubasi

Setiap tingkat pengenceran dipipet sebanyak 25  $\mu\text{L}$  dan diinokulasikan pada media PCA dengan digesekkan menggunakan *cotton bud* steril, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan interval hari ke-0, 1, 3, 5, 7, dan 10.

7. Perhitungan TPC

Setelah inkubasi, jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA dihitung menggunakan *colony counter* (Yusoff et al., 2015).

Secara skematik, prosedur aplikasi terhadap mie basah, disajikan pada Gambar III.10, sebagai berikut :



Gambar III.10 Aplikasi Ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap mie basah

### 3.4 Jadwal Penelitian

Jadwal penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2025 hingga bulan Mei 2026, secara rinci tersajikan pada Tabel III.2 Sebagai berikut :

**Tabel III.2 Jadwal Penelitian**

Kegiatan	2025						2026				
	Juli	Agustus	September	Oktober	November	Desember	Januari	Februari	Maret	April	Mei
Penyusunan Proposal dan Bimbingan											
Seminar Usulan Penelitian											
Pelaksanaan Penelitian											
Pengolahan Data dan Penyusunan Tugas Akhir											
Bimbingan dan Diskusi Laporan Tugas Akhir											
Daftar Sidang Tugas Akhir											
Sidang Tugas Akhir											
Revisi Pasca Sidang											

## IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menyajikan dan membahas data yang telah diolah untuk selanjutnya dilakukan pembahasan yang terdiri dari (4.1) Penelitian Tahap I, (4.2) Penelitian Tahap II, dan (4.3) Penelitian Tahap III.

### 4.1 Penelitian Tahap 1 “Karakterisasi Bubuk Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan Ekstraksi Bubuk Daun Pala.”

#### 4.1.1 Karakteristik Fisikokimia Bubuk Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

Dalam Penelitian ini, bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dianalisis untuk berbagai parameter fisik dan kimia. Analisis terhadap bubuk tersebut mencakup pada pengukuran warna, kadar air, pH, dan aktivitas air ( $a_w$ ). Hasil dari analisis tersebut dapat dilihat pada Tabel IV.1, yang menunjukkan karakteristik utama bubuk daun pala.

Tabel IV.1 Karakteristik fisikokimia bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

Karakteristik fisikokimia bubuk daun pala ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.)	Nilai	
Kadar Air (%)	10,48 ± 0,66	
Warna	$L^*$	41,05 ± 0,62
	$a^*$	1,87 ± 0,22
	$b^*$	11,72 ± 2,89
pH	4,43 ± 0,07	
Aktivitas Air ( $a_w$ )	0,61 ± 0,01	

Keterangan : Hasil dinyatakan sebagai rata-rata ± standar deviasi (SD)

#### 4.1.1.1 Kadar air bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

Kadar air merupakan komponen penting dalam bahan pangan yang memengaruhi penampakan, tekstur, serta cita rasa produk. Kandungan air menentukan daya terima, tingkat kesegaran, dan daya simpan bahan pangan. Secara umum, kadar air merupakan jumlah total air yang terkandung dalam bahan tanpa memperhatikan kondisi atau derajat keterikatan air didalamnya (Lestari et al., 2018).

Kadar air bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) yang relatif tinggi (Tabel IV.1) dapat meningkatkan risiko pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri, kapang, dan khamir yang berpotensi menyebabkan perubahan mutu dan kerusakan produk pangan selama penyimpanan (Nurfadilah et al., 2023).

Kadar air teh herbal daun pala dengan variasi umur daun dan metode pengeringan berkisar antara 6,64-7,74%. Nilai terendah diperoleh pada perlakuan daun tua dengan pengeringan matahari (6,64%), sedangkan nilai tertinggi pada daun muda dengan pengeringan oven (7,74%). Seluruh nilai tersebut masih berada di bawah batas maksimum SNI sebesar 8%. Sehingga, produk memenuhi standar mutu yang berlaku, Hasil penelitian Lestari et al. (2018) ini lebih rendah dibandingkan dengan kadar air bubuk daun pala pada penelitian ini ( $10,48 \pm 0,66$  %). Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh perbedaan bentuk produk, ukuran partikel, serta metode dan durasi pengeringan yang digunakan. Di mana bubuk berukuran partikel lebih halus cenderung lebih higroskopis sehingga menghasilkan kadar air yang lebih tinggi.

#### **4.1.1.2 Warna bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.)**

Warna merupakan atribut pangan yang pertama kali menarik perhatian konsumen dan dapat memberikan petunjuk mengenai perubahan kimia yang terjadi selama proses pengolahan (Lestari et al., 2018). Secara kimiawi, warna berkaitan dengan struktur molekuler ikatan rangkap terkonjugasi yang menangkap energi cahaya dan menyebabkan delokalisasi elektron sehingga menghasilkan warna khas pada bahan pangan (Manzoor et al., 2021).

Analisis warna ditentukan oleh tiga parameter, yaitu  $L^*$  (kecerahan),  $a^*$  (kemarahan/kehijauan), dan  $b^*$  (kekuningan/kebiruan), di mana nilai  $L^*$  berkisar dari 0 (hitam) hingga 100 (putih). Nilai  $a^*$  dari negatif (hijau) hingga positif (merah), dan nilai  $b^*$  dari negatif (biru) hingga positif (kuning) (Amelia et al., 2023). Nilai  $L^*$  bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) sebesar  $41,05 \pm 0,62$

(Tabel IV.1) mengindikasikan bahwa produk cenderung berwarna gelap dengan nuansa abu-abu (Gambar IV.1). Nilai  $a^*$  sebesar  $1,87 \pm 0,22$  menunjukkan adanya kecenderungan warna kemerahan. Sedangkan nilai  $b^*$  sebesar  $11,72 \pm 2,89$  menandakan kecenderungan warna kekuningan pada bubuk daun pala.



Gambar IV.1 Bubuk Daun Pala

#### 4.1.1.3 pH bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

Nilai pH merupakan parameter yang menggambarkan tingkat keasaman dan kebasaan suatu larutan melalui konsentrasi ion hydrogen ( $H^+$ ) yang dinyatakan dalam bentuk logaritma negatif dan konsentrasi ion tersebut. Penetapan standar pH sangat penting karena perubahan pH yang relatif kecil sekalipun dapat memberikan pengaruh signifikan terhadap stabilitas bahan maupun akurasi hasil analisis (Tiwari & Mahalpure, 2025).

Skala pH berkisar antara 0 hingga 14 di mana nilai di bawah 7 dikategorikan asam dan di atas dikategorikan basa (Alizadeh-Sani et al., 2020). Nilai pH bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) sebesar  $4,43 \pm 0,07$  (Tabel IV.1) menunjukkan bahwa produk bersifat asam. Kondisi pH yang rendah ini berperan penting dalam stabilitas dan reaktivitas senyawa bioaktif, diantaranya meningkatkan pelarutan senyawa fenolik serta mendukung efisiensi isolasi senyawa bioaktif (Nurintan et al., 2025). Selain itu, tingkat keasaman yang tinggi turut menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk dan patogen mengingat mikroorganisme metagenik umumnya tumbuh optimal pada kisaran pH 6,6-7,6 dan aktivitasnya akan menurun pada pH di bawah nilai tersebut (angraeni et al., 2021).

#### **4.1.1.4 Aktivitas air ( $a_w$ ) bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.)**

Berdasarkan Tabel IV.1, bubuk daun pala memiliki aktivitas air ( $a_w$ ) sebesar  $0,61 \pm 0,01$ , pertumbuhan mikroba dapat dihambat secara total dengan menurunkan pada kandungan air bebas atau aktivitas air ( $a_w$ ) pada bahan pangan dibawah 0,60 (Azara & Saidi, 2020). Setiap mikroorganisme memiliki nilai aktivitas air ( $a_w$ ) minimal untuk membuat tumbuh dengan baik seperti kapang yang akan tumbuh baik pada  $a_w$  0,60-0,70 (Santoso et al., 2020). Dari teori tersebut, dapat dikatakan bahwa bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dapat dirusak oleh kapang.

Aktivitas air ( $a_w$ ) merupakan indikator jumlah air bebas dalam bahan pangan yang berperan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme, sekaligus memengaruhi reaksi kimia yang terjadi selama penyimpanan. Nilai  $a_w$  dinyatakan dalam angka desimal dengan kisaran 0-1,0, di mana semakin tinggi nilainya, semakin rentan bahan terhadap kerusakan biologis maupun kimiawi (Azzara & Saidi, 2020).

Nilai  $a_w$  bubuk daun pala sebesar  $0,61 \pm 0,01$  (Tabel IV.1) berada sedikit di atas ambang 0,60 yang umumnya dijadikan acuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba secara total (Azara & Saidi, 2020). Nilai tersebut berada dalam kisaran

optimal pertumbuhan kapang, yaitu  $a_w$  0,60-0,70 (Santoso et al., 2020), sehingga bubuk daun pala berpotensi mengalami kerusakan akibat aktivitas kapang apabila tidak disimpan pada kondisi yang tepat. Oleh karena itu, pengendalian kondisi penyimpanan, seperti penggunaan kemasan kedap udara dan lingkungan berkelembapan rendah menjadi faktor penting dalam menjaga stabilitas dan keamanan produk.

#### 4.1.2 Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

Ekstraksi bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol *absolute* 99,5% dari 100 gram bahan baku. Hasil ekstraksi yang diperoleh tercantum pada Tabel IV.2, sedangkan secara makroskopis ekstrak menampilkan warna hijau kecoklatan (Gambar IV.2).



Gambar IV.2 Ekstrak Daun Pala

Hasil ekstrak daun pala disajikan pada Tabel IV.2 sebagai berikut :

Tabel IV.2 Hasil ekstrak daun pala

Hasil ekstrak daun pala	Nilai
Bubuk daun pala	100 g $\pm$ 0.00
Pelarut ekstrak	300 mL $\pm$ 0.00
Hasil ekstrak yang didapat	11,32 g $\pm$ 0.00
Persentase hasil Ekstrak (b/v)	11,32 % $\pm$ 0.00

Hasil dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD)

Etanol merupakan pelarut organik yang umum digunakan dalam proses ekstraksi karena bersifat universal yakni mampu menarik senyawa polar maupun semipolar seperti tanin, alkaloid, flavonoid, dan saponin (Riwanti et al., 2020). Konsentrasi etanol sangat memengaruhi hasil ekstraksi karena menentukan kekuatan hidrofobik pelarut serta ikatan hydrogen dengan komponen target, yang pada akhirnya berpengaruh terhadap laju disolusi dan efisiensi ekstraksi (Hakim & Rina, 2020).

Proses ekstraksi dilakukan dengan perbandingan bahan baku dan pelarut sebesar 1:3 (b/v), menggunakan 100 gram bubuk daun pala yang diekstraksi dalam 300 mL etanol *absolute*. Ekstraksi dilakukan menggunakan *incubator shakter C24* (Edison, USA) pada suhu 30°C selama 24 jam dengan kecepatan 75 rpm. Mekanisme maserasi bekerja melalui penetrasi pelarut ke dalam dinding sel, melarutkan zat aktif di dalam rongga sel, kemudian mendorongnya keluar akibat perbedaan konsentrasi antara bagian dalam dan luar sel (Riwanti et al., 2020). Larutan hasil ekstraksi, disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1 dengan bantuan *aspirator pump* yang memanfaatkan tekanan vakum untuk mempercepat pemisahan filtrat dari residu padat. Filtrat yang diperoleh, kemudian dikonsentrasikan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C kecepatan 75 rpm, selama 28 menit untuk menghilangkan pelarut etanol.

Proses ekstraksi tunggal (*single extraction*) ini menghasilkan ekstrak daun pala sebesar 11,32 gram dengan rendemen sebesar 11,32%. Nilai rendemen tersebut

telah memenuhi kriteria rendemen yang baik, yakni di atas 10% (Rodhiatul et al., 2022). Meskipun demikian, nilai itu lebih rendah dibandingkan penelitian Agustien et al. (2023) yang memperoleh rendemen sebesar 19,85% pada daun muda dan 20,17% pada daun tua menggunakan etanol *absolute* 96% dengan durasi ekstraksi  $3 \times 24$  jam. Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh durasi ekstraksi yang lebih panjang pada penelitian tersebut. Sehingga kontak bahan dengan pelarut berlangsung lebih lama dan meningkatkan senyawa yang berhasil terekstrak (Purwanti, 2024).

#### **4.2 Penelitian Tahap II “Pembuatan Sintesis Hijau NL-AgNPs dan Menentukan Aktivitas Antibakteri terhadap Spesies *Bacillus* spp”**

Penelitian tahap II terdiri dari Sintesis NL-AgNPS dan penentuan antibakteri terhadap spesies *Bacillus* spp. meliputi WDA, MIC, dan MBC.

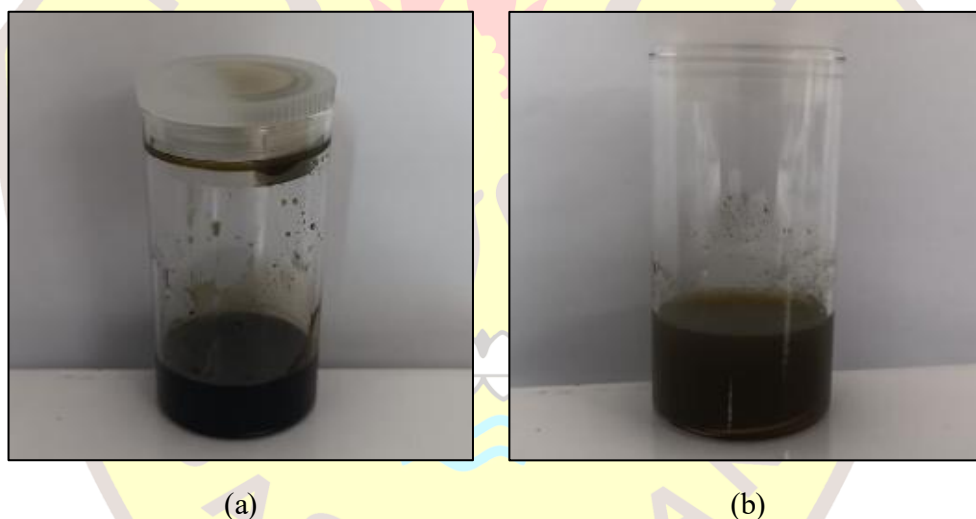
##### **4.2.1 Sintesis NL-AgNPs**

Sintesis nanopartikel perak berbasis ekstrak daun pala (NL-AgNPs) melibatkan beberapa bahan utama. Larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) berperan sebagai prekursor yang menyediakan ion perak ( $\text{Ag}^+$ ) untuk direduksi oleh senyawa bioaktif dalam biomaterial (Nanda et al., 2025). *Dimetil sulfoksida* (DMSO) digunakan sebagai pelarut untuk mengencerkan ekstrak hingga konsentrasi yang diinginkan. DMSO merupakan pelarut polar aprotik yang mampu melarutkan senyawa organik maupun anorganik dengan tingkat toksisitas rendah sehingga relatif aman dan ramah lingkungan (Fatthanah et al., 2022). Dalam proses sintesis, ekstrak daun pala berperan sebagai agen pereduksi alami melalui kandungan metabolit sekundernya yang mendonorkan elektron, sehingga ion perak ( $\text{Ag}^+$ ) tereduksi menjadi perak elemental ( $\text{Ag}^0$ ) dan membentuk nanopartikel perak (Qurrataayun et al., 2022).

10% dengan 27 mL larutan 1mM  $\text{AgNO}_3$  1, menghasilkan 30 mL larutan NL-AgNPs berkonsentrasi 1%. Sebelumnya, larutan DMSO 10% disiapkan dengan mencampurkan 2 mL DMSO 100% ke dalam 18 mL air steril (1:9, v/v). Sebanyak

1 gram ekstrak daun pala kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% untuk memperoleh larutan ekstrak 10% (b/v), dan dari larutan tersebut diambil 3 mL untuk dicampurkan dengan 27 mL larutan  $\text{AgNO}_3$ .

Indikasi keberhasilan sintesis nanopartikel perak ditandai dengan perubahan warna larutan dan pembentukan endapan. Perubahan warna dari hijau menjadi coklat serta terbentuknya endapan coklat mengindikasikan terbentuknya nanopartikel perak dalam larutan (Handoko et al., 2022). Warna hijau pada larutan awal berasal dari pigmen klorofil dalam bioreduktor, sedangkan warna coklat merupakan warna khas nanopartikel perak akibat fenomena *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Pada penelitian ini, ekstrak daun pala yang awalnya berwarna hijau tua (Gambar IV.3 (a)) mengalami perubahan warna menjadi hijau kecoklatan disertai munculnya endapan setelah berinteraksi dengan ion perak (Gambar IV.3 (b)).



Gambar IV.3 Bahan sintesis hijau NL-AgNPs; (a) Ekstrak daun pala 10%, (b) NL-AgNPs 1%

#### 4.2.2 *Well Diffusion Assay* (WDA)

Penilaian aktivitas antimikroba pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *Well Diffusion Assay* (WDA), yaitu metode yang mendeteksi kemampuan senyawa antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme di sekitar area

aplikasinya. Metode ini bekerja dengan membuat lubang kecil pada medium agar yang telah diinokulasikan mikroorganisme uji, kemudian larutan sampel diteteskan ke dalam lubang tersebut. Setelah inkubasi, zona hambatan yang terbentuk diukur untuk menentukan aktivitas antimikroba bahan yang diuji (Putri et al., 2023).

Terbentuknya zona bening di sekitar lubang mengindikasikan adanya penghambatan pertumbuhan mikroba oleh senyawa antimikroba. Mekanisme kerjanya dapat berlangsung melalui beberapa jalur, di antaranya gangguan atau kerusakan pada penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel, inaktivasi enzim esensial, serta destruksi atau inaktivasi materi genetik mikroba (Silitonga et al., 2019). Besar kecilnya zona hambatan yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis dan umur bakteri uji, konsentrasi zat antimikroba, kepadatan inokulum, resistensi bakteri terhadap substansi yang diujikan, serta kadar dan gugus fungsi senyawa aktif yang terkandung dalam bahan uji (Silitonga et al., 2019).

Aktivitas antibakteri ekstrak daun pala (10%, 100 mg/mL) dan NL-AgNPs (1%, 10 mg/mL) diuji terhadap empat spesies *Bacillus* spp. menggunakan metode WDA, dengan hasil disajikan pada Tabel IV.3, sebagai berikut :

Tabel IV. 3 Zona penghambatan ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap patogen bawaan makanan.

Strain Bakteri	Rata-rata zona hambat (mm)			
	Ekstrak [10%(b/v)]	NL-AgNPs [1%(b/v)]	CHX [1%(b/v)]	DMSO [10%(b/v)]
<i>Bacillus cereus</i> ATCC33019	11,5 ± 0,87 <sup>Aa</sup>	14,67 ± 0,58 <sup>Aa</sup>	18 ± 0.00	NA
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	12,5 ± 1,80 <sup>Aa</sup>	13,17 ± 0,76 <sup>Aa</sup>	22,5 ± 0.00	NA
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC14884	12 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	15,33 ± 4,01 <sup>Aa</sup>	18,5 ± 0.00	NA
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14581	12,5 ± 1,32 <sup>Aa</sup>	11,83 ± 0,29 <sup>Aa</sup>	24,5 ± 0.00	NA

Keterangan :

ATCC : *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA).

NL-AgNPs : Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles

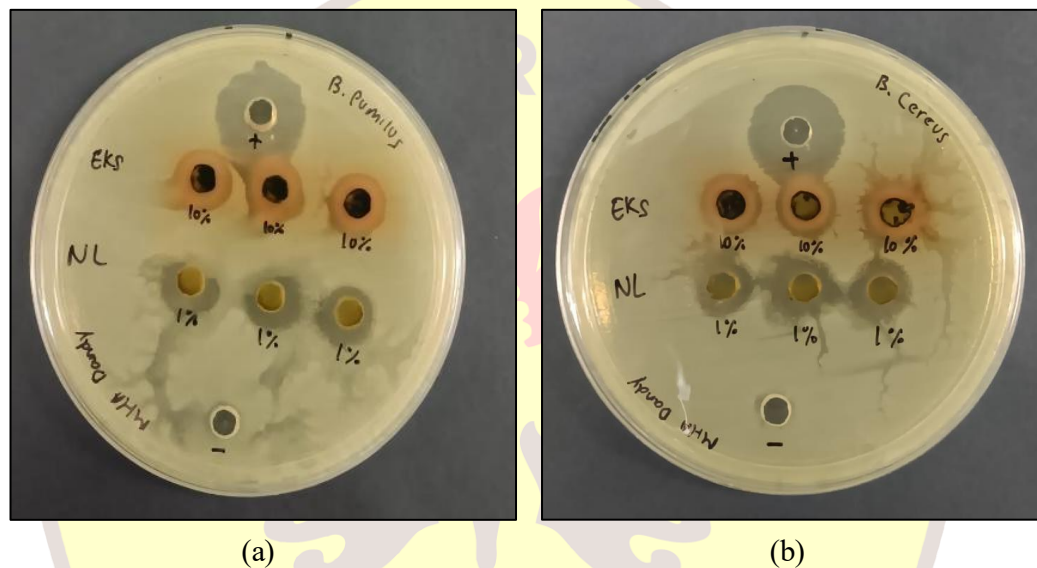
NA : *No Active* (tidak ada hambatan)

Hasil dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD);  $n = 3 \times 3$

Nilai rata rata  $\pm$  standar deviasi dengan huruf kapital yang merupakan taraf nyata dari interaksi antara konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs dengan bakteri yang tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ).

Nilai rata rata  $\pm$  standar deviasi dengan huruf kecil merupakan taraf nyata dari strain bakteri yang tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ).

Kedua perlakuan menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap seluruh bakteri yang diujikan, yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar lubang uji (Gambar IV.4).



Gambar IV. 4 Zona hambat kontrol positif *chlorhexidine* (CHX), kontrol negatif *dimethyl sulfoxide* (DMSO), ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1%; (a) *B. pumilus*, (b) *B. cereus*.

Ekstrak daun pala 10% menghasilkan diameter zona hambat berkisar antara  $11,5 \pm 0,87$  mm hingga  $12,5 \pm 1,32$  mm. Penghambatan tertinggi diperoleh terhadap *B. megaterium* ( $12,5 \pm 1,32$  mm), diikuti oleh *B. subtilis* ( $12,5 \pm 1,80$  mm), *B. pumilus* ( $12,0 \pm 0,35$  mm), dan *B. cereus* ( $11,5 \pm 0,87$  mm). NL-AgNPs 1% menunjukkan aktivitas penghambatan yang sebanding, dengan diameter zona hambat tertinggi pada *B. pumilus* ( $15,33 \pm 4,01$  mm), diikuti oleh *B. cereus* ( $14,67 \pm 0,58$  mm), *B. subtilis* ( $13,17 \pm 0,76$  mm), dan *B. megaterium* ( $11,83 \pm 0,29$  mm).

Kontrol negatif DMSO 10% tidak menunjukkan zona hambatan terhadap bakteri manapun, yang mengkonfirmasi bahwa DMSO pada konsentrasi tersebut tidak memiliki efek antibakteri dan pengaruh biologisnya dapat diabaikan (Hermawan, 2019; Summer et al., 2022). Sebaliknya, kontrol positif *chlorhexidine* (CHX) 1% menunjukkan penghambatan yang jauh lebih besar dibandingkan kedua perlakuan uji, dengan diameter zona hambat tertinggi pada *B. megaterium* ( $24,5 \pm 0,00$  mm), diikuti oleh *B. subtilis* ( $22,5 \pm 0,00$  mm), *B. pumilus* ( $18,5 \pm 0,00$  mm), dan *B. cereus* ( $18,0 \pm 0,00$  mm). Tingginya aktivitas CHX tersebut berkaitan dengan kandungan klorin yang bersifat desinfektan tingkat tinggi dan aktif terhadap berbagai mikroorganisme, dengan efek yang tidak hanya bakteristatik tetapi juga bakterisida (Pariati & Angki J., 2019).

Meskipun zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1% lebih rendah dibandingkan CHX 1%, kedua perlakuan tersebut tetap menunjukkan aktivitas antibakteri yang bermakna. CHX 1% sebagai kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 18,0–24,5 mm terhadap bakteri *Bacillus* yang diujikan, yang mencerminkan efektivitasnya sebagai agen antimikroba spektrum luas (Ariani & Hadriyanto, 2013). Berdasarkan klasifikasi respons zona hambat menurut Putri et al. (2023), yang membagi kategori menjadi lemah (<5 mm), sedang (5–10 mm), kuat (10–20 mm), dan sangat kuat (>20 mm), ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1% keduanya tergolong dalam kategori kuat dengan rentang zona hambat 10–20 mm. Dengan demikian, meskipun belum setara dengan CHX 1%, ekstrak daun pala dan NL-AgNPs berpotensi dikembangkan sebagai alternatif antimikroba alami dengan efektivitas yang cukup baik.

Perbedaan diameter zona hambat antara ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1% sejalan dengan temuan Dewi et al. (2019), yang menguji aktivitas antibakteri nanopartikel perak yang disintesis dari ekstrak daun sendok dan membandingkannya dengan larutan  $\text{AgNO}_3$  serta ekstrak daun sendok murni. Pada penelitian tersebut, larutan  $\text{AgNO}_3$  menghasilkan zona hambat sebesar 4,73 mm,

sedangkan nanopartikel perak menghasilkan zona hambat yang lebih besar, yaitu 5,13 mm. Adapun ekstrak daun sendok murni tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Hasil tersebut mengkonfirmasi bahwa proses sintesis nanopartikel dapat meningkatkan aktivitas antibakteri dibandingkan ekstrak maupun prekursor logamnya secara terpisah, yang turut mendukung temuan pada penelitian ini bahwa NL-AgNPs 1% menghasilkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak daun pala 10%.

Aktivitas antibakteri ekstrak daun pala didukung oleh kandungan metabolit sekundernya, yang meliputi flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin, tanin, dan triterpenoid (Halimathussadiah et al., 2021). Masing-masing senyawa tersebut bekerja melalui mekanisme yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian sel bakteri (Arlofa, 2025).

Senyawa fenolik dan turunannya, termasuk flavonoid, bekerja melalui proses adsorpsi pada permukaan sel bakteri yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein-fenol dengan ikatan lemah yang kemudian mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel yang menyebabkan denaturasi protein. Pada kadar tinggi, fenol menyebabkan koagulasi protein dan lisis membran sel. Flavonoid secara spesifik membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut pada bakteri, yang merusak integritas membran sel dan memicu keluarnya senyawa intraseluler (Halimathussadiah et al., 2021).

Senyawa terpenoid bekerja dengan bereaksi terhadap porin pada membran luar dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan porin yang mengakibatkan penurunan permeabilitas dinding sel. Kondisi ini menyebabkan bakteri kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhannya terhambat (Halimathussadiah et al., 2021). Tanin menghambat pertumbuhan bakteri melalui inaktivasi adhesin sel bakteri, penghambatan enzim, dan gangguan transportasi protein pada lapisan dalam sel (Putri et al., 2022). Selain itu, tanin juga dapat merusak membran sel melalui efek

toksistasnya, di mana senyawa astringen dalam tanin membentuk ikatan kompleks dengan ion logam sehingga meningkatkan efek toksik terhadap bakteri (Arlofa, 2015). Saponin bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan sel, meningkatkan permeabilitas membran, dan mendorong keluarnya senyawa intraseluler bakteri (Trusua et al., 2018).

Mekanisme antibakteri nanopartikel perak (AgNPs) bekerja melalui beberapa jalur sekaligus. Tahap awal dimulai dengan perlekatan AgNPs pada permukaan sel bakteri yang menyebabkan peningkatan permeabilitas membran, pelepasan lipopolisakarida, serta deformasi dan disintegrasi membran sel. Kondisi ini memicu kebocoran ion dan gangguan keseimbangan osmotik yang berujung pada kematian sel bakteri. AgNPs juga mampu menembus membran dan berinteraksi langsung dengan biomolekul seluler seperti DNA dan protein, sehingga mengganggu proses replikasi, transkripsi, dan metabolisme sel. Di sisi lain, ion perak ( $Ag^+$ ) yang dilepaskan berinteraksi dengan gugus sulfhidril pada protein bakteri, menyebabkan denaturasi protein dan inaktivasi enzim yang terlibat dalam respirasi seluler. Ion perak juga berikatan dengan fosfor dalam DNA dan RNA, sehingga menghambat proses genetik serta sintesis protein yang pada akhirnya menekan pertumbuhan dan proliferasi bakteri (Nanda et al., 2025).

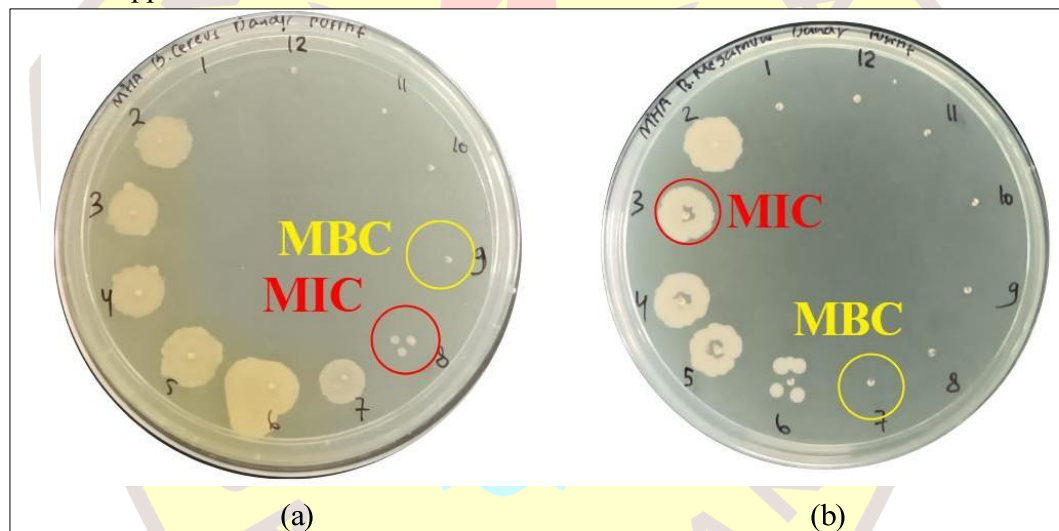
Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini masih bersifat kualitatif sehingga belum sepenuhnya menggambarkan efektivitas antibakteri secara optimal. Oleh karena itu, diperlukan pengujian lanjutan secara kuantitatif melalui penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap bakteri *Bacillus* secara lebih komprehensif.

#### **4.2.3 Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) and *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)**

Pengujian antibakteri secara kuantitatif dilakukan melalui penentuan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

menggunakan metode *two-fold microdilution*. MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara visual setelah 24 jam inkubasi, sedangkan MBC adalah konsentrasi minimum yang menghasilkan pengurangan  $3\text{-log}_{10}$  ( $>99,9\%$ ) jumlah bakteri hidup dibandingkan inokulum awal (Ishak et al., 2025). Semakin rendah nilai MIC dan MBC yang diperoleh, semakin tinggi aktivitas antibakteri suatu senyawa dalam menghambat maupun membunuh mikroorganisme target (Naid et al., 2025). Pada penelitian ini, CHX 1% digunakan sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Hasil pengujian MIC dan MBC ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan NL-AgNPs terhadap bakteri *Bacillus* disajikan pada Tabel IV.4.

Pada Gambar IV.5 merupakan bukti terbentuknya MIC dan MBC terhadap *Bacillus* spp.



Gambar IV. 5 Hasil uji MIC dan MBC; (a) *Bacillus cereus*, (b) *Bacillus megaterium*

96 well plate pada penentuan MIC dan MBC ekstrak daun pala 10% terhadap bakteri *Bacillus*; kolom 1 : kontrol negatif (a), kolom 2 : kontrol positif (b), kolom 3 : 0,09 mg/mL (c), kolom 4 : 0,20 mg/mL (d), kolom 5 : 0,39 mg/mL (e), kolom 6 : 0,78 mg/mL (f), kolom 7 : 1,56 mg/mL (g), kolom 8 : 3,13 mg/mL (h), kolom 9 : 6,25 mg/mL (i), kolom 10 : 12,50 mg/mL (j), kolom 11 : 25,00 mg/mL (k), dan

kolom 12 : 50,00 mg/mL (l) ekstrak daun pala dengan MHB serta inokulum. Sementara itu, untuk 96 *well plate* pada penentuan MIC dan MBC NL-AgNPs 1% terhadap bakteri *Bacillus* : kolom 1 : kontrol negatif (a), kolom 2 : kontrol positif (b), kolom 3 : 0,009 mg/mL (c), kolom 4 : 0,02 mg/mL (d), kolom 5 : 0,039 mg/mL (e), kolom 6 : 0,078 mg/mL (f), kolom 7 : 0,156 mg/mL (g), kolom 8 : 0,313 mg/mL (h), kolom 9 : 0,63 mg/mL (i), kolom 10 : 1,30 mg/mL (j), kolom 11 : 2,50 mg/mL (k), dan kolom 12 : 5,00 mg/mL (l) NL-AgNPs dengan MHB serta inokulum.

Ekstrak daun pala dan NL-AgNPs menunjukkan aktivitas bakteriostatik terhadap seluruh spesies *Bacillus* yang diujikan (Tabel 9). Antibakteri bakteriostatik bekerja dengan mencegah pertumbuhan bakteri tanpa membunuhnya secara langsung, berbeda dengan bakterisidal yang secara aktif membunuh bakteri hingga melampaui ambang batas tertentu, meskipun keduanya pada dasarnya dapat menyebabkan kematian bakteri pada kondisi tertentu (Ishak et al., 2025).

Nilai MIC ekstrak daun pala 10% berkisar antara 3,13–12,5 mg/mL dengan nilai MBC >50,00 mg/mL untuk seluruh bakteri uji. *B. subtilis* dan *B. pumilus* merupakan spesies paling rentan dengan nilai MIC 3,13 mg/mL dan MBC 50,00 mg/mL, diikuti *B. megaterium* dengan MIC 6,25 mg/mL dan MBC >50,00 mg/mL. *B. cereus* tercatat sebagai spesies paling resisten dengan MIC 12,5 mg/mL dan MBC >50,00 mg/mL. Keseluruhan hasil tersebut mengindikasikan efek bakteriostatik ekstrak daun pala 10% terhadap semua spesies *Bacillus* yang diujikan.

NL-AgNPs 1% menunjukkan nilai MIC yang jauh lebih rendah, berkisar antara 0,31–0,63 mg/mL dengan nilai MBC >5,00 mg/mL. *B. pumilus* dan *B. megaterium* merupakan spesies paling rentan dengan MIC 0,31 mg/mL, sedangkan *B. cereus* dan *B. subtilis* menunjukkan resistensi lebih tinggi dengan MIC 0,63 mg/mL. Sebagaimana ekstrak daun pala, NL-AgNPs 1% juga bersifat bakteriostatik terhadap seluruh spesies yang diujikan.

Perbandingan nilai MIC antara kedua perlakuan menunjukkan bahwa NL-AgNPs 1% memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun pala 10%. Peningkatan efektivitas NL-AgNPs terhadap masing-masing spesies tercermin dari perbedaan nilai MIC, di mana konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat *B. cereus* dan *B. megaterium* 20 kali lebih rendah pada NL-AgNPs dibandingkan ekstrak daun pala, sementara pada *B. pumilus* dan *B. subtilis* masing-masing 10 dan 5 kali lebih rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa hasil sintesis nanopartikel secara signifikan meningkatkan potensi antibakteri dibandingkan ekstrak daun pala.



Tabel IV. 4 MIC dan MBC ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan NL-AgNPs terhadap bakteri *Bacillus*.

Strain Bakteri	Ekstrak daun pala [10%(b/v)]			NL-AgNPs [1%(b/v)]			Enhancement
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	Keterangan	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	Keterangan	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC33019	12,5	>50,00	Bakteristatik	0,63	>5,00	Bakteristatik	20×
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	3,13	>50,00	Bakteristatik	0,63	>5,00	Bakteristatik	5×
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC14884	3,13	>50,00	Bakteristatik	0,31	>5,00	Bakteristatik	10×
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14581	6,25	>50,00	Bakteristatik	0,31	>5,00	Bakteristatik	20×

Keterangan :

ATCC : *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA)

NL-AgNPs : *Nutmeg Leaf Silver Nanoparticles*

MIC = MBC : menunjukkan efek bakterisida

MIC < MBC : menunjukkan efek bakteristatik

MIC > MBC : menunjukkan error pada penelitian

### **4.3 Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dan NL-AgNPs terhadap Mie Basah Selama Penyimpanan”.**

Deteksi mikroorganisme pembusuk, patogen, dan kontaminan biologis pada bahan pangan merupakan tahapan kritis dalam menjamin mutu dan keamanan produk. Pengujian mikrobiologi berperan penting dalam mencegah kontaminasi sekaligus meminimalkan risiko penyakit yang ditularkan melalui makanan, dan menjadi pendekatan yang umum digunakan dalam analisis keamanan pangan modern (Aladhadh, 2023).

Pada penelitian ini, analisis mikrobiologis dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak daun pala pada konsentrasi 0,1% dan 1% serta NL-AgNPs pada konsentrasi 0,01% dan 0,1% terhadap kualitas mikrobiologis mie basah. Pengujian dilakukan pada dua kondisi penyimpanan, yaitu suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) dan suhu dingin ( $4, \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), dengan variasi waktu penyimpanan selama 0, 1, 3, 4, 8, dan 10 hari. Metode yang digunakan adalah *Total Plate Count* (TPC) dengan teknik tuang (*pour plate*) untuk menghitung jumlah koloni mikroorganisme yang tumbuh pada media lempeng (Pelczar & Chan, 2005).

Perkembangbiakan mikroorganisme menjadi dasar penting dalam penilaian keamanan pangan, karena mencerminkan tingkat kebersihan serta keberadaan bakteri pada makanan, air, maupun bahan sanitasi lainnya. *Plate Count Agar* (PCA) digunakan sebagai media non-selektif untuk menumbuhkan bakteri pada suhu 20–45°C, dengan jumlah mikroba dihitung menggunakan metode *colony forming units* (CFU) per gram atau mililiter (Trisha et al., 2024). Metode ini memungkinkan estimasi jumlah mikroorganisme hidup dalam sampel dengan asumsi distribusi mikroba tersebar merata di seluruh bagian bahan pangan. Untuk menjamin keakuratan hasil, penghitungan dilakukan secara duplo ( $n=2$ ).

#### **4.3.1 Pengaruh Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap Populasi Mikroba pada Mie Basah Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ )**

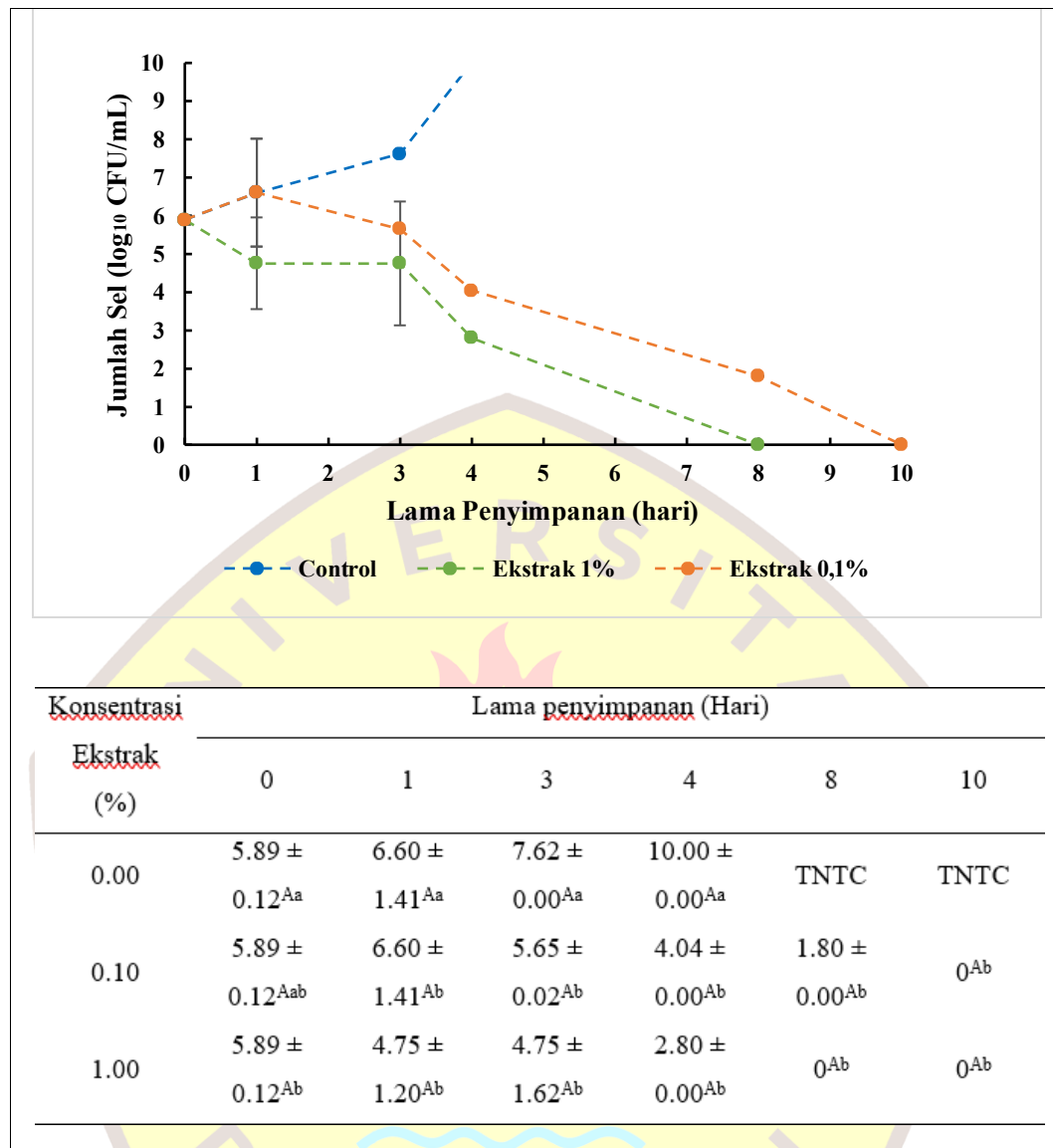
Evaluasi aktivitas antibakteri yang disajikan pada Gambar IV.6 menunjukkan pengaruh penambahan ekstrak daun pala terhadap populasi mikroba pada mie basah yang disimpan di suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 hari. Secara umum, penambahan ekstrak daun pala pada konsentrasi 0,1% dan 1,0% mampu menekan pertumbuhan mikroorganisme dibandingkan kontrol tanpa ekstrak (0,00%). Hal ini didukung oleh kandungan metabolit sekunder ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.), khususnya senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid, yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri (Putri et al., 2023; Paneerchelvan et al., 2015).

Pada perlakuan tanpa ekstrak (0,00%), jumlah bakteri meningkat setiap harinya hingga mencapai kondisi *Too Numerous to Count* (TNTC), yang mengindikasikan bahwa tanpa kehadiran senyawa bioaktif, pertumbuhan mikroba tidak dapat terhambat secara efektif selama penyimpanan. Sebaliknya, penambahan ekstrak daun pala pada konsentrasi 0,1% dan 1,0% terbukti efektif menekan pertumbuhan bakteri hingga hari ke-10 penyimpanan, dengan penurunan jumlah bakteri yang lebih signifikan pada konsentrasi 1,0% dibandingkan 0,1%. Hasil ini menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak dan kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri pada mie basah.

Nilai TPC mie basah pada hari ke-0 tercatat sebesar  $5,89 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-1, perlakuan ekstrak 0,1% mengalami peningkatan jumlah mikroba menjadi  $6,60 \log_{10}$  CFU/mL, sementara ekstrak 1% justru menunjukkan penurunan langsung menjadi  $4,75 \log_{10}$  CFU/mL. Selanjutnya, kedua konsentrasi menunjukkan tren penurunan yang konsisten selama penyimpanan. Pada hari ke-3, jumlah mikroba pada ekstrak 0,1% menurun menjadi  $5,65 \log_{10}$  CFU/mL dan ekstrak 1% tetap pada  $4,75 \log_{10}$  CFU/mL. Penurunan yang lebih signifikan terjadi pada hari ke-4, dengan ekstrak 0,1% mencapai  $4,04 \log_{10}$  CFU/mL dan ekstrak 1% sebesar  $2,80 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-8, jumlah mikroba pada ekstrak 1% telah mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL, sedangkan ekstrak 0,1% masih tercatat sebesar  $1,80 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-10, ekstrak 0,1% juga mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL.

Tren penurunan jumlah mikroba yang konsisten pada kedua konsentrasi selama 10 hari penyimpanan mengindikasikan bahwa senyawa bioaktif dalam ekstrak daun pala aktif menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada mie basah. Perbedaan laju penurunan antara konsentrasi 0,1% dan 1% menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak dan efektivitas penghambatan, di mana konsentrasi yang lebih tinggi menghasilkan penghambatan yang lebih cepat dan lebih kuat.





Keterangan :

TNTC : *Too Numerous to Count*

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf Kapital merupakan taraf nyata dari lama penyimpanan terhadap jumlah sel yang tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ).

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang merupakan taraf nyata dari konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

Gambar IV. 6 Pengaruh ekstrak daun pala 0,0% (control), 0,1%, dan 1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )

#### **4.3.2 Pengaruh NL-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Mie Basah Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )**

Evaluasi aktivitas antibakteri yang disajikan pada Gambar IV.7 menunjukkan pengaruh penambahan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada mie basah yang disimpan di suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) selama 10 hari. NL-AgNPs pada konsentrasi 0,01% maupun 0,1% keduanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri sejak hari ke-1 dan menghentikan pertumbuhan sepenuhnya pada hari ke-3, meskipun terdapat perbedaan kuantitas jumlah mikroba yang berhasil dihambat di antara kedua konsentrasi tersebut.

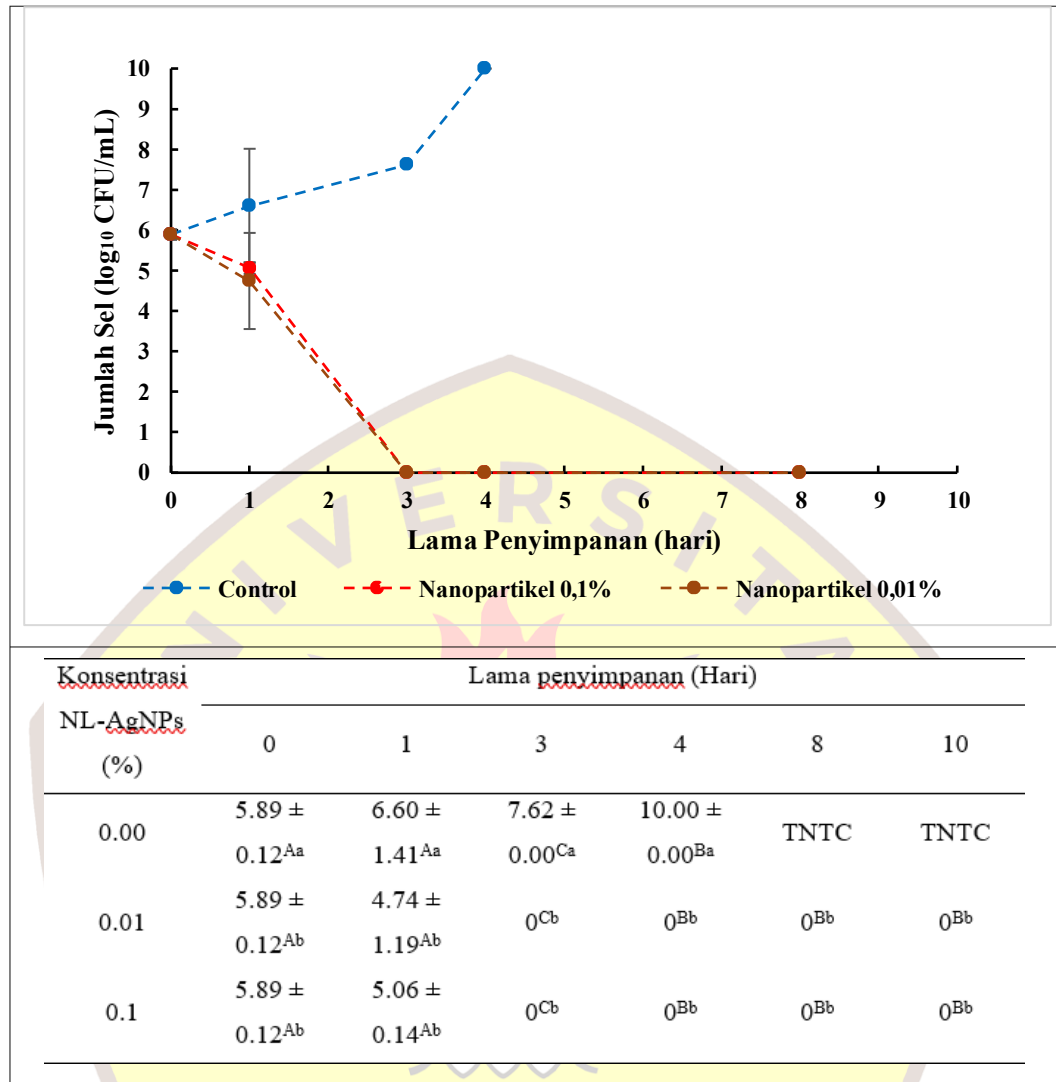
Jika dibandingkan dengan ekstrak daun pala 0,1% dan 1,0% pada kondisi penyimpanan yang sama, NL-AgNPs 0,01% dan 0,1% menunjukkan efektivitas penghambatan yang lebih tinggi, dengan kemampuan menghentikan pertumbuhan bakteri pada waktu yang lebih singkat. Hal ini mengindikasikan bahwa proses sintesis nanopartikel secara signifikan meningkatkan aktivitas antibakteri ekstrak daun pala, sehingga NL-AgNPs berpotensi lebih efektif sebagai bahan pengawet mie basah selama penyimpanan pada suhu ruang dalam jangka waktu 10 hari.

Pada hari ke-1, kedua perlakuan NL-AgNPs menunjukkan penurunan jumlah bakteri dibandingkan hari ke-0, dengan konsentrasi 0,01% tercatat sebesar  $4,74 \log_{10}$  CFU/mL dan konsentrasi 0,1% sebesar  $5,06 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-3, jumlah bakteri pada kedua konsentrasi menurun drastis hingga mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL dan tidak menunjukkan tanda peningkatan hingga hari ke-10, mengindikasikan bahwa NL-AgNPs tidak hanya menghambat tetapi juga mampu membunuh bakteri secara efektif selama penyimpanan pada suhu ruang.

Perbandingan efektivitas antara ekstrak daun pala dan NL-AgNPs pada penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) disajikan pada Gambar IV.8. Ekstrak 1,0% baru mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-8, sedangkan ekstrak 0,1% baru

mencapai nilai yang sama pada hari ke-10. Sebaliknya, NL-AgNPs pada kedua konsentrasi (0,01% dan 0,1%) telah mencapai 0  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-3. Perbedaan ini menunjukkan bahwa NL-AgNPs memiliki efektivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun pala dalam mempertahankan kualitas mikrobiologis mie basah pada penyimpanan suhu ruang.





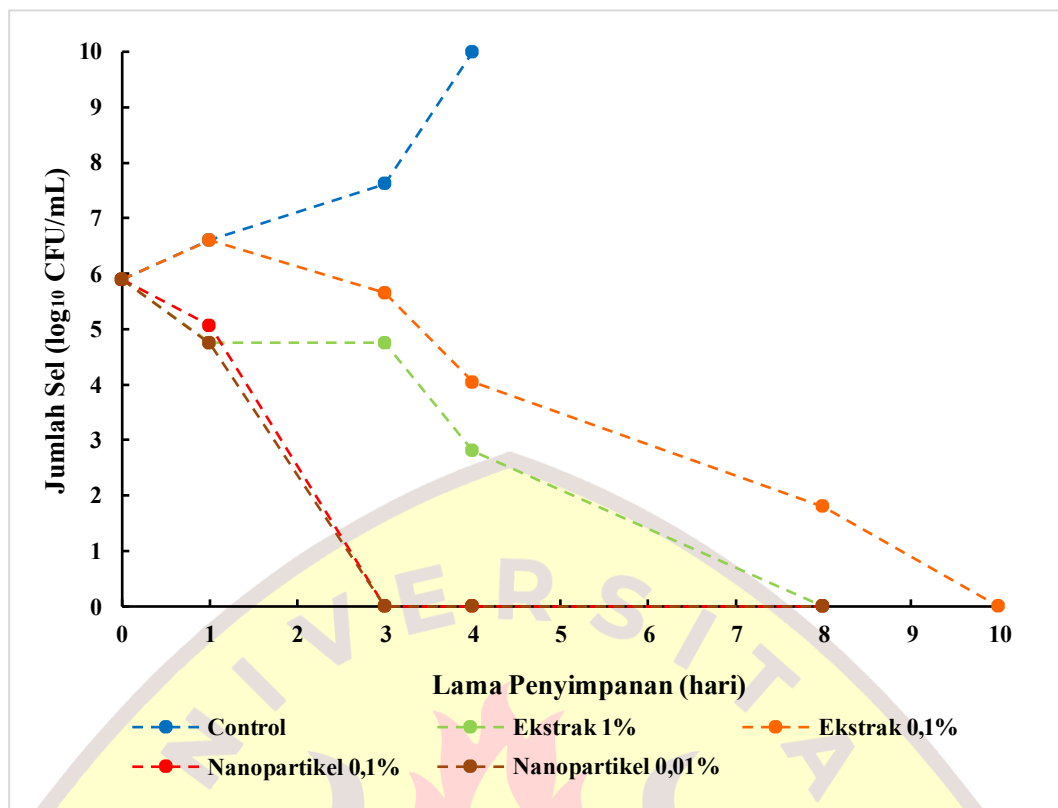
Keterangan :

TNTC : *Too Numerous to Count*

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf Kapital merupakan taraf nyata dari lama penyimpanan terhadap jumlah sel yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang merupakan taraf nyata dari konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

Gambar IV. 7 Pengaruh NL-AgNPs 0,0% (control), 0,01%, dan 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )



Gambar IV.8 Pengaruh ekstrak daun 0,0 (control), 0,1%, 1% dan NL-AgNPs 0,01%, 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ )

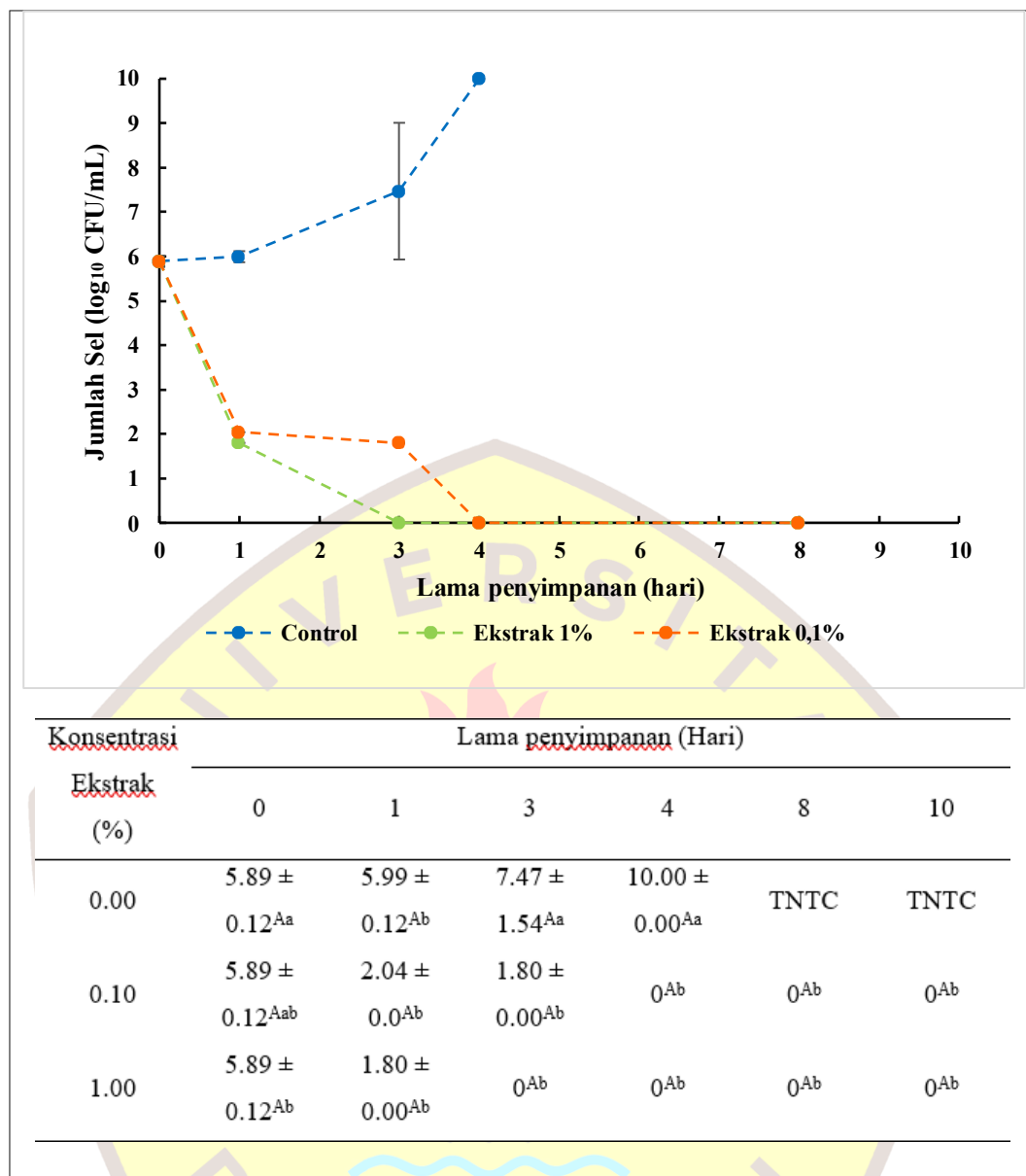
Meskipun NL-AgNPs terbukti lebih efektif dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba, proses sintesisnya memerlukan bahan dengan biaya yang relatif tinggi sehingga kurang ekonomis untuk diterapkan secara luas. Sebaliknya, ekstrak daun pala menunjukkan efektivitas yang cukup baik sebagai agen antibakteri berkat kandungan senyawa bioaktifnya, dengan biaya produksi yang lebih terjangkau. Dengan demikian, ekstrak daun pala berpotensi menjadi alternatif pengawet alami yang lebih aplikatif dan ekonomis, khususnya untuk produk mie basah sebagaimana dibuktikan dalam penelitian ini.

### 4.3.3 Pengaruh Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap Populasi Mikroba pada Mie Basah Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ( $4.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ )

Evaluasi aktivitas antibakteri disajikan pada Gambar IV.9 menunjukkan pengaruh penambahan ekstrak daun pala terhadap populasi mikroba pada mie basah yang disimpan di suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 hari. Penambahan ekstrak pada konsentrasi 0,1% dan 1,0% secara umum mampu menekan pertumbuhan mikroorganisme dibandingkan kontrol, didukung oleh kandungan metabolit sekunder ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) yang meliputi senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid dengan aktivitas antibakteri (Putri et al., 2023; Paneerchelvan et al., 2015).

Nilai TPC awal pada hari ke-0 tercatat sebesar  $5,89 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-1, konsentrasi ekstrak 0,1% menunjukkan penurunan jumlah bakteri menjadi  $2,04 \log_{10}$  CFU/mL, sedangkan konsentrasi 1,0% menghasilkan penurunan yang lebih signifikan hingga  $1,80 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-3, konsentrasi 1,0% telah mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL, sementara konsentrasi 0,1% masih tercatat sebesar  $1,80 \log_{10}$  CFU/mL. Pada hari ke-4, konsentrasi 0,1% juga mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL dan kondisi ini bertahan hingga hari ke-10, menunjukkan bahwa kedua konsentrasi ekstrak daun pala efektif menghambat pertumbuhan bakteri selama penyimpanan pada suhu pendinginan.

Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun pala berpotensi digunakan sebagai pengawet alami yang efektif untuk mie basah selama penyimpanan 10 hari pada suhu pendinginan. Efektivitas tersebut merupakan hasil kombinasi antara kondisi suhu rendah yang menekan aktivitas bakteri dan kandungan senyawa bioaktif ekstrak daun pala yang berperan sebagai agen antibakteri. Di antara kedua konsentrasi yang diujikan, ekstrak 1,0% menunjukkan efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan 0,1%, tercermin dari kemampuannya mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL lebih cepat, yaitu pada hari ke-3 dibandingkan hari ke-4 pada konsentrasi 0,1%.



Keterangan :

TNTC : *Too Numerous to Count*

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf Kapital merupakan taraf nyata dari lama penyimpanan terhadap jumlah sel yang tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ).

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang merupakan taraf nyata dari konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

Gambar IV.9 Pengaruh ekstrak daun pala 0,0% (control), 0,1%, dan 1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ )

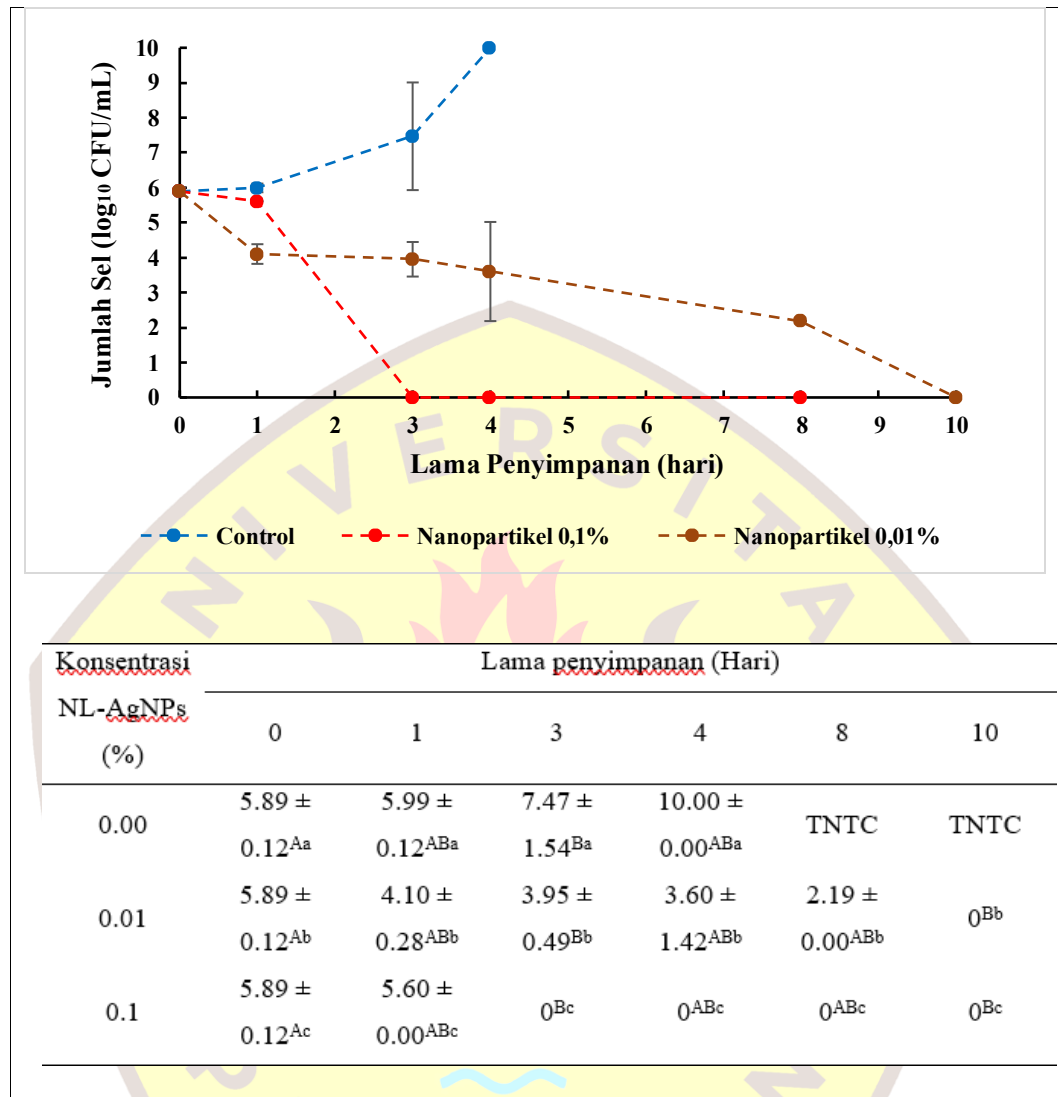
#### **4.3.4 Pengaruh NL-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Mie Basah Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ( $4.0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).**

Evaluasi aktivitas antibakteri disajikan pada Gambar IV.10 menunjukkan pengaruh penambahan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada mie basah yang disimpan di suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 hari. Berbeda dengan hasil pada penyimpanan suhu ruang, perbandingan antara ekstrak daun pala dan NL-AgNPs pada suhu pendinginan menunjukkan bahwa ekstrak daun pala memberikan efektivitas penghambatan yang lebih tinggi. Pada hari ke-1, jumlah bakteri pada perlakuan ekstrak 0,1% dan 1,0% masing-masing tercatat sebesar 2,04 dan 1,80  $\log_{10}$  CFU/mL, sedangkan pada NL-AgNPs 0,01% dan 0,1% jumlah bakteri masih lebih tinggi, yaitu 4,10 dan 5,60  $\log_{10}$  CFU/mL.

NL-AgNPs 0,01% menunjukkan penurunan bertahap dengan jumlah bakteri 3,95  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-3, 3,60  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-4, dan 2,19  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-8, sebelum akhirnya mencapai 0  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-10. Sementara itu, NL-AgNPs 0,1% menunjukkan penurunan yang lebih cepat hingga mencapai 0  $\log_{10}$  CFU/mL dan bertahan hingga hari ke-10. Hasil ini mengindikasikan bahwa pada kondisi suhu pendinginan, ekstrak daun pala lebih unggul dalam menekan pertumbuhan bakteri pada tahap awal penyimpanan dibandingkan NL-AgNPs, meskipun keduanya pada akhirnya mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara efektif.

Perbandingan efektivitas antara ekstrak daun pala dan NL-AgNPs pada penyimpanan suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) disajikan pada Gambar IV.11. Ekstrak 1,0% mencapai 0  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-3, sebanding dengan NL-AgNPs 0,1% yang mencapai nilai yang sama pada hari ke-3. Sementara itu, ekstrak 0,1% mencapai 0  $\log_{10}$  CFU/mL pada hari ke-4, lebih cepat dibandingkan NL-AgNPs 0,01% yang baru mencapai nilai tersebut pada hari ke-10. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pada kondisi suhu pendinginan, ekstrak daun pala lebih unggul dibandingkan NL-AgNPs 0,01%, dan menunjukkan efektivitas

yang setara dengan NL-AgNPs 0,1% dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada mie basah.

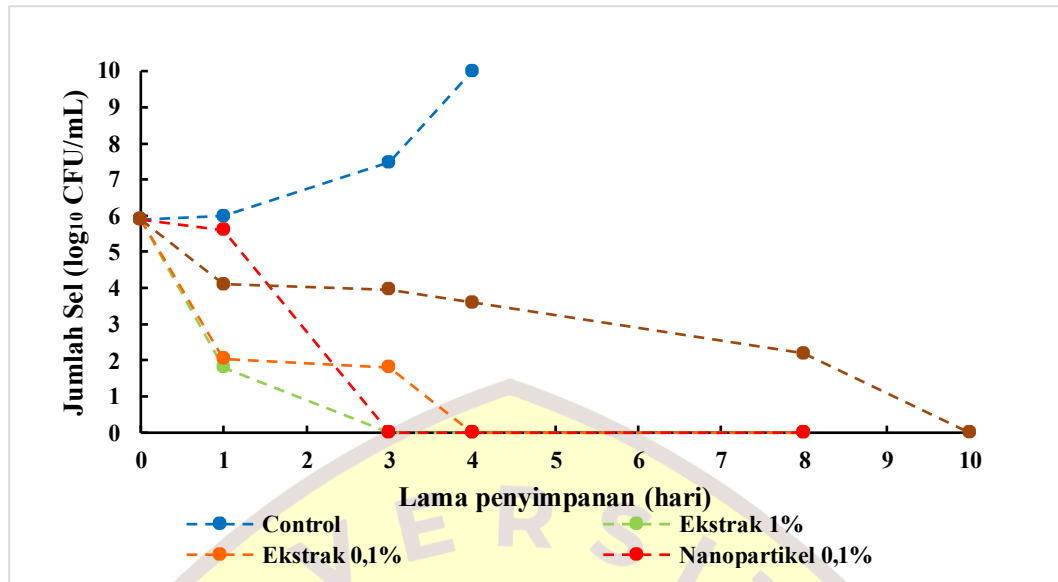


Keterangan :

TNTC : *Too Numerous to Count*

Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf Kapital merupakan taraf nyata dari lama penyimpanan terhadap jumlah sel yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Nilai rata rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang merupakan taraf nyata dari konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

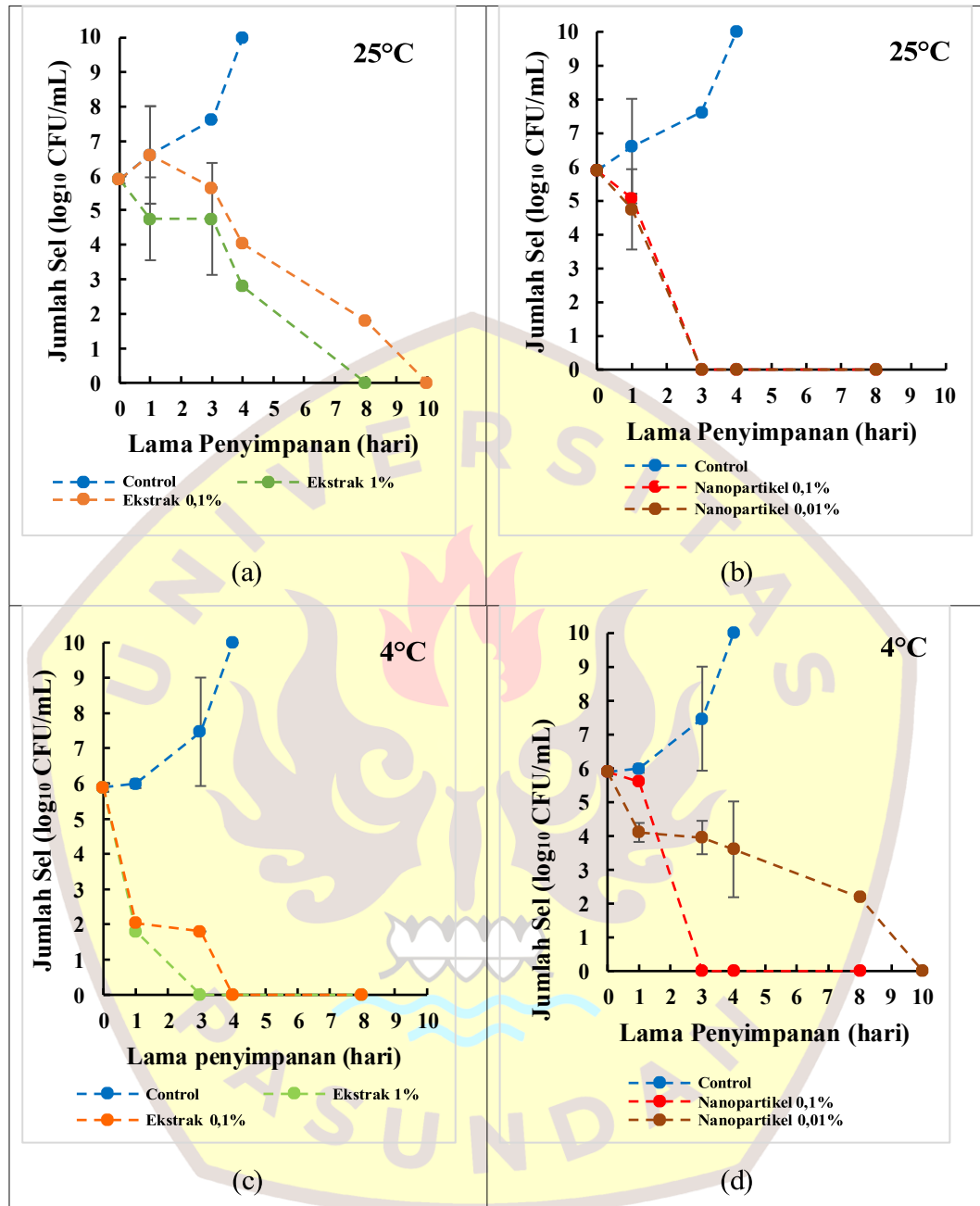
Gambar IV.10 Pengaruh NL-AgNPs 0,0% (control), 0,01%, dan 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ )



Gambar IV.11 Pengaruh ekstrak daun 0,0 (control), 0,1%, 1% dan NL-AgNPs 0,01%, 0,1% terhadap populasi mikroba pada mie basah selama 10 hari penyimpanan suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )

Keunggulan ekstrak daun pala dibandingkan NL-AgNPs pada kondisi suhu pendinginan berkaitan dengan perbedaan mekanisme kerja keduanya. Ekstrak daun pala mengandung senyawa bioaktif yang bekerja secara langsung dalam menghambat pertumbuhan mikroba dan merusak membran sel bakteri (Mirna et al., 2016), sehingga efek penghambatan terjadi lebih cepat. Sebaliknya, NL-AgNPs bekerja melalui mekanisme yang lebih kompleks, meliputi proses interaksi dengan permukaan sel, penetrasi ke dalam sel, hingga kerusakan sel secara bertahap (Eker et al., 2025). Meskipun mekanisme bertahap ini menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih stabil dan berkelanjutan (Batista et al., 2018; Okur et al., 2025), karakteristik tersebut kurang optimal untuk produk seperti mie basah yang umumnya dikonsumsi dalam jangka waktu singkat setelah produksi. Dengan demikian, ekstrak daun pala dinilai lebih aplikatif dan ekonomis sebagai alternatif pengawet alami untuk mie basah, sementara NL-AgNPs tetap berpotensi untuk aplikasi pengawetan pada produk pangan dengan masa simpan yang lebih panjang.

Pada gambar IV.12, tersajikan kurva pertumbuhan dari berbagai perlakuan dan penyimpanan sebagai berikut :



Gambar IV. 12 *Juxtapose* pengaruh ekstrak daun pala dan NL-AgNPs terhadap populasi mikroba pada mie basah : (a) pengaruh ekstrak daun pala terhadap suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). (b) pengaruh NL-AgNPs terhadap suhu ruang ( $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). (c) pengaruh ekstrak daun pala terhadap suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). (d) pengaruh NL-AgNPs terhadap suhu pendinginan ( $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )

## V KESIMPULAN DAN SARAN

Bab ini menyimpulkan hasil penelitian (5.1) dan menyampaikan saran-saran berdasarkan penelitian yang bisa diajukan untuk penelitian selanjutnya (5.2)

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan diperoleh beberapa Kesimpulan antara lain :

1. Bubuk daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) memiliki karakteristik fisikokimia yang meliputi kadar air  $10,48 \pm 0,66\%$ , warna  $L^* 41,05 \pm 0,62$ ,  $a^* 1,87 \pm 0,22$ ,  $b^* 11,72 \pm 2,89$ , pH  $4,43 \pm 0,07$ , dan aktivitas air ( $a_w$ )  $0,61 \pm 0,01$ . Ekstraksi menggunakan etanol absolut 99,5% dengan perbandingan 1:3 (b/v) melalui metode maserasi menghasilkan rendemen sebesar 11,32%, menunjukkan bahwa metode tersebut efektif dalam mengekstrak senyawa bioaktif dari daun pala.
2. Ekstrak daun pala berhasil dimanfaatkan sebagai agen bioreduktor dalam sintesis hijau nanopartikel perak (NL-AgNPs). Sintesis dilakukan dengan mencampurkan 3 mL larutan ekstrak 10% (b/v) dengan 27 mL larutan  $\text{AgNO}_3$  sehingga menghasilkan 30 mL NL-AgNPs berkonsentrasi 1%, yang ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat kehitaman. Senyawa bioaktif dalam ekstrak daun pala terbukti mampu berperan sebagai agen pereduksi sekaligus penstabil nanopartikel, menghasilkan partikel dengan potensi bioaktif yang lebih baik dibandingkan ekstrak murni. Ekstrak daun pala 10% dan NL-AgNPs 1% terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, dan *B. megaterium*. Pada uji WDA, ekstrak 10% menghasilkan zona hambat 11,5–12,5 mm, sedangkan NL-AgNPs 1% sebesar 11,83–15,33 mm. Nilai MIC dan MBC ekstrak 10% masing-masing berkisar 3,13–12,5 mg/mL dan >50,00 mg/mL, sedangkan NL-AgNPs 1% jauh lebih rendah, yaitu 0,31–0,63 mg/mL dan >5,00 mg/mL, mengindikasikan potensi antibakteri yang lebih tinggi.

3. Pada aplikasi pengawetan mie basah, kedua perlakuan mampu menekan pertumbuhan mikroba secara efektif pada suhu ruang ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) maupun suhu pendinginan ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ), dengan jumlah mikroba mencapai  $0 \log_{10}$  CFU/mL lebih cepat dibandingkan kontrol yang menunjukkan peningkatan signifikan selama penyimpanan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa daun pala yang selama ini merupakan hasil samping Perkebunan pala yang belum dimanfaatkan secara optimal, memiliki potensi besar sebagai sumber bahan pengawet alami. Ekstrak daun pala dinilai lebih aplikatif dan ekonomis untuk pengawetan mie basah mengingat sifatnya yang mudah diproduksi dan biaya yang lebih terjangkau. Sementara, NL-AgNPs berpotensi dikembangkan lebih lanjut untuk aplikasi pengawetan produk pangan dengan masa simpan yang lebih panjang. Hasil penelitian ini membuka peluang pengembangan pengawet alami berbasis tanaman lokal sebagai alternatif pengganti pengawet sintesis, yang sejalan dengan tren industri pangan menuju produk yang lebih aman, alami, dan berkelanjutan.

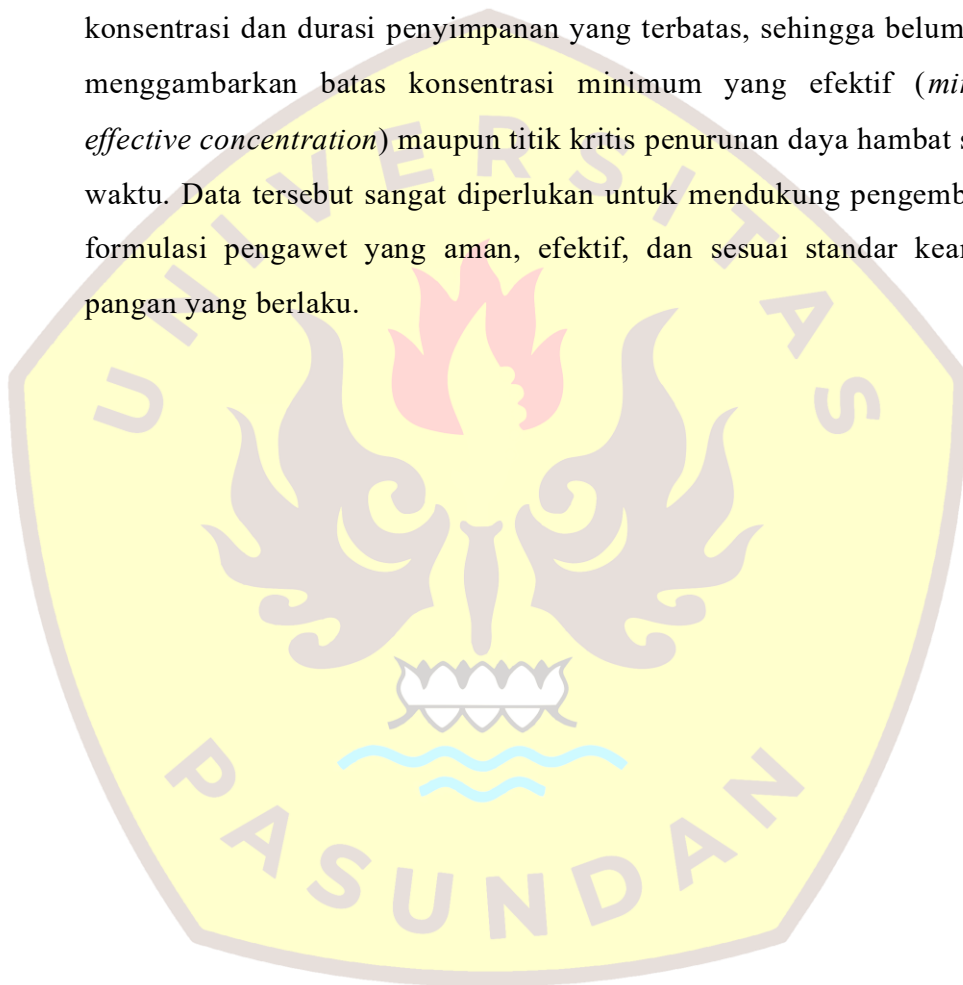
## 5.2 Saran

Adapun saran yang berdasarkan hasil penelitian sebagai berikut :

1. Penelitian lanjutan disarankan untuk mengeksplorasi pengaruh variasi jenis pelarut dan konsentrasi alkohol terhadap karakteristik ekstrak daun pala. Pemilihan pelarut menentukan polaritas dan selektivitas ekstraksi, sehingga jenis pelarut yang berbeda berpotensi menghasilkan profil senyawa bioaktif yang berbeda pula. Dengan membandingkan efektivitas berbagai pelarut, dapat ditentukan kondisi ekstraksi yang paling optimal untuk memaksimalkan kandungan senyawa bioaktif sekaligus aktivitas antibakteri ekstrak daun pala.
2. Sintesis nanopartikel berbasis logam lain, seperti nanopartikel tembaga (CuNPs), atau seng oksida (ZnO-NPs), menggunakan ekstrak daun pala sebagai agen bioreduktor perlu dikaji lebih lanjut. Setiap jenis nanopartikel memiliki karakteristik fisikokimia, mekanisme antibakteri, dan profil

toksisitas yang berbeda. Perbandingan antar jenis nanopartikel akan memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai potensi ekstrak daun pala sebagai bioreduktor, sekaligus membantu mengidentifikasi nanopartikel yang paling efektif dan aman untuk aplikasi di bidang pangan.

3. Pengujian dengan variasi konsentrasi ekstrak daun pala dan NL-AgNPs yang lebih luas, disertai perpanjangan durasi penyimpanan, perlu dilakukan untuk memperoleh gambaran yang lebih menyeluruh mengenai efektivitas dan stabilitasnya sebagai pengawet. Penelitian ini hanya menguji konsentrasi dan durasi penyimpanan yang terbatas, sehingga belum dapat menggambarkan batas konsentrasi minimum yang efektif (*minimum effective concentration*) maupun titik kritis penurunan daya hambat seiring waktu. Data tersebut sangat diperlukan untuk mendukung pengembangan formulasi pengawet yang aman, efektif, dan sesuai standar keamanan pangan yang berlaku.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhamid, A. G., & El-DougDoug, N. K. (2020). Controlling Foodborne Pathogens with Natural Antimicrobials by Biological Control and Antivirulence Strategies. *Heliyon* 6(9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05020>
- Aguestien et al., (2024). Uji Mutu Ekstrak Etanol Daun Pala Muda dan Daun Tua (*Myristica fragrans*). *Perjuangan Nature Pharmaceutical Conference* Vol 1(1).
- Ahmad, N. H., Rukayadi, Y., Khan, S., Parmin, N. A., Nizar, N. N. A., & Mohammad, Z. H. (2024). Nanotechnology in food safety and preservation. In *Innovative Food Packaging and Processing Technologies: Present and Future*, 233–278. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91742-1.00015-5>
- Aladhadh, M. (2023). A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms*, 11(5), <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111>.
- Ali, Amiluddin. Mikrobiologi Dasar. Jilid I. Cet.1 ; Makassar : UNM Press, 2005.
- Alizadeh-sani, M., Mohammadian, E., Rhim, J., & Mahdi, S. (2020). Trends in Food Science & Technology pH-sensitive ( halochromic ) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 105(September), 93–144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.014>.
- Amelia, A., Kusumiyati, K., & Farida, F. (2023). Analisis Kadar Air, Susut Bobot, dan Warna ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) pada Paprika Hijau (*Capsicum annuum var Grossum*) dengan Jenis Edible Coating Berbeda. *Paspalum*, 11(2), 294-301.
- Ansarin K., Khoubnasabjari M., Jouyban a. Reliability of Malondialdehyde as a Biomarker of Oxidative Stress in Psychological Disorders. *BioImpacts* 5(3). 123-127.
- Arifin, N., Dan, H., & Wijayati, N. (2016). Sintesis Nanopartikel Perak menggunakan Bioreduktor Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) dengan Irradiasi Microwave. *Indonesian Journal of Chemical Science. J. Chem. Sci*, 5(3).

- Arisman. (2009). Buku Ajar Ilmu Gizi Keracunan Makanan. Buku Kedokteran EGC.
- Arnold et al. (2024). Buku Bahan Ajar Senyawa Bioaktif. CV. Tahta Media Group
- Arshad, M. S., & Batool, S. A. (2017). Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety. In *Food Additives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70197>
- Astawan, M. (1999). Membuat Mie dan Bihun. Penebar, Jakarta.
- Aulia Putri, A., Ahda, Y., Hilda Putri, D., & Achyar, A. (2023). Optimization of Pathogenic Bacterial DNA Isolation in PCR-Based River Water Samples Optimasi Isolasi DNA Bakteri Patogen pada Sampel Air Sungai Berbasis PCR. *Serambi Biologi* 8(3), 471-474.
- Azrial F. (2025). Potential of Bioactive Compounds in Indonesian Endemic Nutmeg (*Myristica fragrans* and *Myristica argentea*) and their Applications in health : An Overview. *JEVNAH* 2(2), 122-132.
- Azara, R., & Saidi, I. A. (2020). Mikrobiologi Pangan (prof. D. I. A. eko. Prihatiningrum & S. K. Prajati, Amy Yoga (eds.)). UMSIDA press.
- Baboo Prasad, S., & Aeri Jamia Hamdard, V. (2013). Current Understanding of Synthesis and Pharmacological Aspects of Silver Nanoparticles. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 1(7), 536-547. <https://doi.org/10.13140/2.1.3744.0964>
- Barar J. (2017). Bioimpacts of Nanoparticle Size : Why it Matters. *Bioimpact* 5(3), 113-115.
- Basaniah, \*, Basaniah, B., Rahayu, Y. P., Nasution, H. M., Dalimunthe, G. I., Studi, P., Farmasi, S., Muslim, U., & Al-Washliyah, N. (2024). Produksi Protein Sel Tunggal dari Kultur *Bacillus cereus* dengan Medium Limbah Cair Tahu. *Jurnal Kesehatan Dan Kedokteran*, 1(2), 129-147. <https://doi.org/10.62383/vimed.v1i2.152>
- Batubara, I., & Nursid, M. (2020). Pengaruh Konsentrasi Etanol dan Waktu Maserasi terhadap Rendemen, Kadar Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Padina australis*. *Majalah ilmiah Biologi Biofera : A Scientific Journal*. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2020.37.2.1192>

- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences* 22(13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- BSN. 2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. Badan Standar Nasional. Jakarta : Indonesia.
- Cahya K. Kawuri R. Wijana I. (2022). Potensi *Bacillus* sp. Sebagai Agen antagonis terhadap *Athelia rolfsii* Penyebab Busuk Pangkal Batang Kedelai (*Glycine max* L.). *Metamorfosa : Journal of Biological Sciences*, 9(2), 325.
- Chen, H., Xiao, H., & Pang, J. (2020). Parameter optimization and potential bioactivity evaluation of a betulin extract from white birch bark. *Plants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/plants9030392>
- Chowdhury S. (2024). Medicinal Plant-Based Nanoparticle Synthesis and their Diverse Applications. *Ethnopharmacology and OMICS Advances in Medicinal Plants*, 213-250.
- Chugh et al. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Algae and the Importance of Capping Agents in the Process. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 126.
- CLSI. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. *Clinical and Laboratory Standard Institute*, 32(2), 1-68.
- De Vries, Y. P., Hornstra, L. M., De Vos, W. M., & Abee, T. (2004). Growth and Sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under Defined Conditions: Temporal Expression of Genes for Key Sigma Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2514–2519. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2514-2519.2004>
- Deng Y., Lu S. (2017). Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 7(36), 257-290.
- Devi Maharani, A., & Priyo Bintoro, V. (2023). Karakteristik Fisik dan Hedonik Mie Basah Berbahan Dasar Terigu dengan Substitusi Tepung Labu Kuning dan Tepung Daun Kelor. *Jurnal Teknologi Pangan* 7(1). [www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/tekpangan](http://www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/tekpangan).

- Dewi et al. (2019). Karakter Fisik and Aktivitas Antibakteri Nanopartikel Perak Hasil Green Synthesis menggunakan Ekstrak Air Daun Sendok (*Plantago major* L.). *Pharmaceutical Sciences and Research* 6(2), 69-81.
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069053>
- Eker F., AdAkdaşçi, E., Duman H., Bechelany M., Karav S. (2025). Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Plant Extracts : A Comprehensive Review of Physicochemical Properties and Multifunctional Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 26(13), 1-39.
- Erlinawati, E., & Putri, S. K. (2022). Identifikasi bakteri patogen pada jajanan telur gulung yang dijual di Kecamatan Syiah Kuala Banda Aceh. *Jurnal SAGO Gizi Dan Kesehatan* 4(1), 58. <https://doi.org/10.30867/gikes.v4i1.1061>
- Fardiaz. 1992. Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut. Bogor : IPB Press.
- Fathanah U., Razi F., Lubis M., Yusuf M., Syamsuddin Y., Meilina H., Muchtar S., Kamaruzzaman S., Khairunnisa A. (2022). Modifikasi Membran Polyethersulfone dengan Penambahan Nanopartikel Mg(OH)<sub>2</sub> dalam Pelarut Dimethyl Sulfoxide. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* 18(2), 165.
- Fawwaz, M., Nurdiansyah, S., & Baits, M. (2017). Potensi Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt) Sebagai Sumber Fenolik. In *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* 4(1).
- Ghosh, S., Mandal, R. K., Mukherjee, A., & Roy, S. (2025). Nanotechnology in the manufacturing of sustainable food packaging: a review. In *Discover Nano* 20(1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s11671-025-04213-x>
- Habibah T. P. Z. (2013) Identifikasi Penggunaan Formalin pada Ikan Asin dan Faktor Perilaku Penjual Di Pasar Tradisional Kota Semarang. *Unnes Journal of Public Health*, 2(3), 2-9.
- Hakim Ali Rakhman., & Saputri, R. (2020). Narrative Review Optimasi Etanol sebagai Pelarut S. *Jurnal Surya Medika*, 6, 177–180.

- Halimathussadiyah., Rahmawati D., Indriyanti N. (2021). Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) sebagai Antibakteri. *Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*.
- Handayani, N. E., & Kumalasari, I. D. (2022). Analisis mikrobiologi dan organoleptik mi basah hasil formulasi dengan penggunaan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai pengawet alami dan antioksidan. *Agrointek : Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 16(2), 153–163. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v16i2.12557>
- Handayani Putri, F., Taebe, B., Iqbal, M. (2023). Phytochemical Screening And Determination of Total Phenolic and Flavonoid Controls of Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) Leaves From Banda District, Central Maluku Regency. *Jurnal Novem Medika Farmasi*, 17-26.
- Handoko, V., Yusradinan, A., Nursyahid, A., Wandira, A., & Wulandari, A. P. (2022). Chimica et Natura Acta Green Synthesis Nanopartikel Perak dengan Bioreduktor Ekstrak Daun Rami (*Boehmeria nivea*) Melalui Iradiasi Microwave. 10(1), 15–21. <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n1.35755>
- Hussein, Z. M., Abedali, A. H., & Ahmead, A. S. (2019). Improvement Properties of Self-Healing Concrete by Using Bacteria. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 584(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/584/1/012034>
- Isha K., Hemlata K., & Gitika C. (2021). *Myristica fragrans* (Jaiphal): A Significant Medicinal Herbal Plant. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8(2), 213–224. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.2.27>
- Ishak A., Mazonakis N., Spornovasilis N., Akinosoglou K., Tsuoutis C. (2025). Bactericidal Versus Bacteriostatic Antibacterials : Clinical Significance, Differences and Synergistic Potential in Clinical Practice. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1-17.
- Kesehatan Saintika Meditory, J., Christiani Telambanua, A., & Novita Yusuf, R. (2024). Eksplorasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus Mutans*

- penyebab karies gigi secara in Vitro. *Jurnal Kesehatan Saintika Meditory*, 444-452.
- Kusmiati, A., & Saptari Haryani, T. (2020). Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Kulit Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai Antibakteri *Salmonella enteritidis*. *Ekologia : Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 19(1).
- Lady Yunita Handoyo Prodi, D. S., & Ilmu Kesehatan, F. (2020). Pengaruh Lama Waktu Maserasi (Perendaman) Terhadap Kekentalan Ekstrak Daun Sirih (Piper Betle). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1), 34-41.
- Legoh L. W., Runtunuwu S., & Wanget S. (2020). Karakterisasi Pala (*Myristica fragrans* L.) di Kabupaten Kepulauan Sangihe Berdasarkan Morfologi Buah dan Daun. *Jurnal Transdisiplin Pertanian (Budidaya Tanaman, Perkebunan, Kehutanan, Peternakan, Perikanan), Sosial Dan Ekonomi*, 16, 279–290.
- Lestari M., Rusliana E., Saleh M., Rasulu H. (2018). Pengaruh Umur Daun Pala dan Jenis Pengeringan terhadap Sifat Kimia dan Organoleptik Teh Herbal Daun Pala. *Tehcno* 7(2), 177-189.
- Logan, N. A. (2012). Bacillus and Relatives in Foodborne Illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
- Madigan, M. 2005. Brock Biology of Microorganism. Englewood Cliff : Prentice Hall.
- Manzoor M., Singh J., Gani A., Noor N. (2021). Valorization of Natural Colors as Health-Promoting Bioactive Compounds : Phytochemical Profile, Extration Techniques, and Pharmacological Perspectives. *Food Chemistry*, 362.
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Mazlan S., Jaafar N., Wahab A., Sulaiman Z. (2021). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Bacillus pumilus* causing trunk bulges of RRIM 3001 Superclone Rubber Tree in Malaysia. *European Journal of Plant Pahtology*. 159(20). <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-021-02208-9>.

- Naid T., Herwin, Muldin N. I. (2025). Antibacterial Activity test of Ceremai Leaf Ethanol Extract (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) Againsts Bactericia Causing Skin Infections by TLC-Bioautography and Agar Diffusion. *Jurnal Microbiology Science* 5(1). 44-52.
- Nanda Y. A. T., Dominica D., Haque A. F., Rahmatullah F. (2025). Sintesis Hijau Nanopartikel Perak sebagai Antibakteri. *Bencoolen Journal of Pharmacy*, 5(1), 25-32.
- Nasution, M. A., Andry, M., Lubis, M. F., Illian, D. N., Rani, Z., & Fauzi, Z. P. A. (2024). Phytochemical Analysis and Nanoparticle Formulations of Extracts *Myristica fragrans* Houitt Leaves as Antibacterial. *Trends in Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.48048/tis.2024.8335>
- Nisa M, Jannah R, Qodri U, Ratih D, Sari T. (2023). Pengaruh Metode Pengeringan terhadap Kadar Flavonoid simplisia Daun Cermai (*Phyllanthus acidus* L.Skeels). *Jurnal Farmasi Ma Chung : Sains Teknologi dan Klinis Komunitas* 1(1), 8-10.
- Novia Putri, R., Nuriyah Wahidah, S., Taufiq Al Hafidz, I. (2023). Uji Daya Hambat Antimikroba Secara Difusi Sumuran dan Difusi Paper Disk. *Era Sains : Journal of Science, Engineering and Information Systems Research*, 1(4), 28-33.
- Nugraheni I. A., Widyaningsih N., Syarifah S. M., Susila W. A. (2022). Uji Antagonis *Bacillus megaterium* terhadap *Fusarium oxysporum* dan Pengaruhnya pada Pertumbuhan Tanaman Cabai Rawit. *Biosense*, 5(1), 16-21.
- Nurfadilah, Novitasari, M., & Maruka, S. (2023). Uji Total Mikroba, Kadar Air, dan pH Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dengan Perendaman Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Selama Penyimpanan Suhu Ruang. *Journal of Sustainable Research In Management of Agroindustry (SURIMI)*, 3(2), 17–22. <https://doi.org/10.35970/surimi.v3i2.2036>
- Nurfina, Sumartini, Situmorang P. A. (2022). Fortifikasi Tepung Tulang Ikan Tenggiri (*Scomberomos Commerson*) pada Mie Basah dengan Variasi Penggunaan Bahan Tambahan Pangan terhadap Karakteristik Fisik dan Sensori Mie Basah. *Seminar Nasional Teknologi*, 56-64.

- Nurintan S., Tuljannah N., Riskayanti. (2025). Pengaruh pH dan Suhu terhadap Profil Senyawa Bioaktif Rumput Laut : Analisis dalam Perspektif Kimia Kelautan. *Jurnal Riset Kelautan dan Perikanan*, 1(1), 38-46.
- Nurmilasari, N., Ginting, B., & Helwati, H. (2017). Isolation Of Antioxidant Compounds Of Methanol Extract Of Nutmeg Leaves (*Myristica fragrans* Houtt). *Jurnal Natural*, 17(1), 49–57. <https://doi.org/10.24815/jn.v17i1.6998>
- Oktavia I. N., Sutoyob S. (2021). Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Bioreduktor Ekstrak Tumbuhan sebagai Bahan Antioksidan. *Journal of Chemistry*, 10(1), 37-51.
- Paneerchelvan, S., Lai, H.-Y., & Kailasapathy, K. (2015). Antioxidant, Antibacterial and Tyrosinase Inhibiting Activities of Extracts from *Myristica fragrans* Houtt. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(1), 39–49. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2015/17296>
- Patra, J. K., & Baek, K. H. (2014). Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. In *Journal of Nanomaterials* (Vol. 2014). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2014/417305>
- Padoli. (2016). Mikrobiologi dan parasitology keperawaatan. News.
- Patriati, Johnny A. (2019). Perbedaan Kumur *Chlorhexidine* terhadap Skor Gingivitis Pasien Ortho Cekat Usia 15-30 Tahun di Praktek Drg. Sofyan Makassar.
- Patra J. K., Baek K. (2014). Green Nanobiotehcnology : Factors affecting Synthesis and Characterization Techniques. *Journal of Nanomaterials*.
- Pelczar & Chan (2005). Dasar-dasar Mikrobiologi. Jakarta: UI Press.
- Purwanti Y. (2024). Pengaruh Daya dan Waktu MAE terhadap Suhu ekstraksi, Rendemen, dan Aktivitas Antioksidan. *Jurnal cendekia Ilmiah*, 3(5).
- Puspasari K. (2007). Aplikasi Teknologi dan Bahan Tambahan Pangan Untuk Meningkatkan Umur Simpan Mie Basah Matang. repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/3743/F06pah.pdf. (Diakses 24 Mei 2014)
- Putri, I. I., & Chatri, M. (2024). Peranan Metabolit Sekunder sebagai Antimikroba. *Jurnal Pendidikan Tambusai*, 8(1).

- Qin, Y., Angelini, L. L., & Chai, Y. (2022). *Bacillus subtilis* Cell Differentiation, Biofilm Formation and Environmental Prevalence. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061108>
- Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-silleras, B., & Redondo-Del-río, M. P. (2019). Food safety through natural antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>
- Qurrataayun, S., Rifai, Y., Rante, H., Kunci, K., Biosintesis, :, & Citratus, C. (2022). Sintesis Hijau Nanopartikel Perak (Agnp) Menggunakan Ekstrak Daun Serai (*Cymbopogon Citratus*) Sebagai Bioreduktor. *Original Article MFF*, 26(3), 124–128. <https://doi.org/10.20956/mff.v26i3.21047>
- Riskawati. (2016). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Patogen Pada Tanah Dilingkungan Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Kota Makassar. UIN Alauddin Makassar. Makassar.
- Riwanti, P., & Izazih, F. (2020). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura. In *J-PhAM Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 82(2).
- Rodrigo, D., Rosell, C. M., & Martinez, A. (2021). Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods* 10(2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10020302>
- Rorong, J. A., Willar W. F. (2020). Keracunan Makanan Oleh Mikroba. In *Techno Science Journal* 2(2), 47-60.
- Rusnaenah A., Azzahra T. A. S. (2024). Sistesis Silver Nanoparticles (AgNPs) Menggunakan Bioreduktor Limbah Daun Pisang Kepok (*Musa paradisiaca linn*). *Journal of Polymer Chemical Engineering and Technology* 1(1), 33-40.
- Sa'ed M., ayivi R. D., Wei J., Obara S. (2024). Gold Nanoparticles antibacterial activity : Does the Surface Matter?. *Colloid and Interface Science Communications* 62.
- Samodra E. M. A., Wattimury A., Budiarmo T. Y., Amarantini C. (2024). Identifikasi *Bacillus* sp. Pada Makanan Ringan berbasis Umbi-umbian Melalui Analisis Molekuler Gen Toxin Hbl dan Nhe. *Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat* 4(5), 1235-1244.

- Santoso B. D., Ananingsih V. K., Soedarini B., Stephanie J. (2020). Pengaruh Variasi Maltodekstrin dan Kecepatan Homogenisasi terhadap Karakteristik Fisikokimia Enkapsulat Butter Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dengan Metode Vacuum Drying. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian* 13(2), 95-100.
- Saputri A., Fajriah S., Cahyana A. H., Putria D. K., Saputra Z., Angelina M. (2024). Phytochemical Profiles, Antioxidant, and Anticancer activities from Leaves and Seeds Extract of *Myristica fragrans*. *Jurnal Kimia Reset* 9(2).
- Sati A., Ranade T. N., Mali S. N., Yasin H. K. A., Pratap A. (2025). Silver Nanoparticles (AgNPs) : Comprehensive Insights into Bio/Synthesis, Key Influencing Factors, Multifaceted Applications, and Toxicity- A 2024 Update. *ACS Omega* 10. 7549-7582.
- Sefelin S., Sri R., Dian I. (2025). Green synthesis Nanopartikel Perak Menggunakan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.). *INSOLOGI : Jurnal Sains dan Teknologi* 4(6), 1627-1635.
- Julianto T. S. (2019). Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia. UII. Yogyakarta.
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., & Mir, S. A. (2014). Plant Extracts as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. *Meat Science* 98(1), 21–33. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>
- Saifudin, azis et al. (2011). Standarisasi Bahan dan Obat Alam. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A Review On Biosynthesis Of Silver Nanoparticles And Their Biocidal Properties. *Journal of Nanobiotechnology* 16(1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Silitonga L. R. Nursyirwani. Effendi I. (2019). Isolation, Identification and Sensitivity of Amilolitic Bacteria from Mangrove Ecosystem Sediment in Purnama Marine Station Dumai on the Pathogenic Bacteria. *Asian Journal of Aquatic Sciences* 2(3), 257-266.
- Sim W., Barnard R., Blaskovich M., Ziora Z. (2018). Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications : A Patent Review of the Past Decade (2007-2017). *Antibiotics* 7(4).

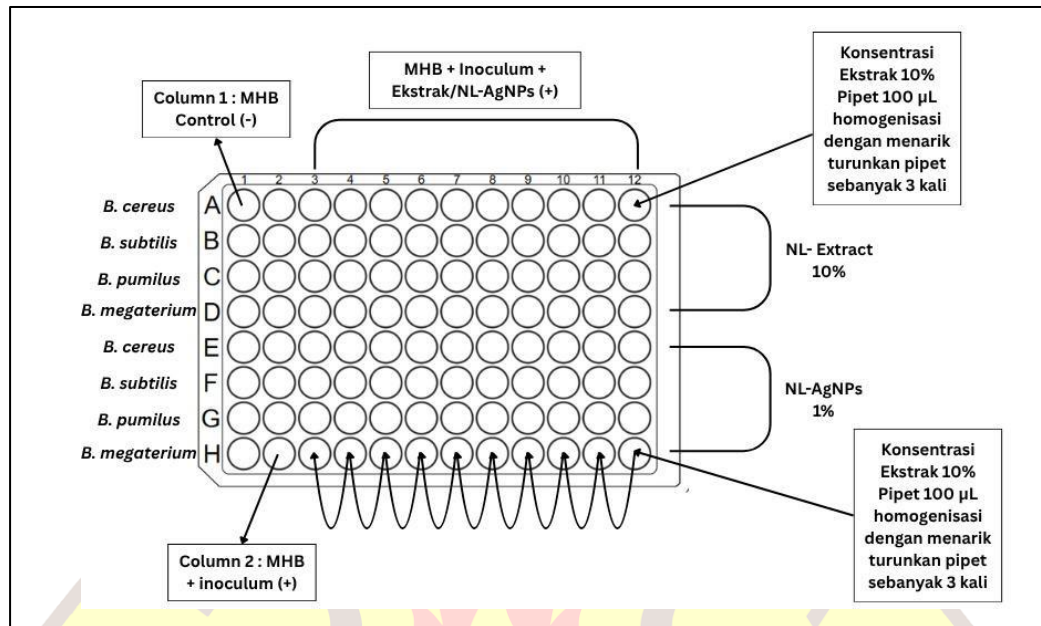
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. In *Journal of Nanobiotechnology* 16(1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
- Singh, M., Renu, Kumar V., Upadhyay S. K., Singh R., Yadav M., Seema, Kumari S., Sharma A. K., Manikanadan S. (2021). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of saraca indica and its profound antibacterial activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 8110–8120. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81108120>
- Souza, P. F. N., Marques, L. S. M., Oliveira, J. T. A., Lima, P. G., Dias, L. P., Neto, N. A. S., Lopes, F. E. S., Sousa, J. S., Silva, A. F. B., Caneiro, R. F., Lopes, J. L. S., Ramos, M. V., & Freitas, C. D. T. (2020). Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie*, 175, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>
- Sukmawan D. F., Suhartati R., & Novitriani K. (2023). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Patogen Di Perairan Pantai Pangandaran. 334-343.
- Summer K., Browne J., Hollanders M., Berkendorff K. (2022). Out of Control : The Need for Standardised Solvent Approaches and Data Reporting in Antibiofilm Assays Incorporating Dimethyl Sulfoxide (DMSO). *Biofilm* 4.
- Suriani, Muis A. (2016). Prospek *Bacillus subtilis* sebagai Agen Pengendali Hayati Patogen Tular Tanah pada Tanaman Jagung. *Jurnal Litbang* 35(1), 37-45.
- Susanti, Ramadhani F., Soraya M., Afriani F. (2021). Potensi Green-Synthesis Nanopartikel Perak Berbasis Bahan Floral di Indoneisa : sebuah Review. *Seminar Nasional Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat*.
- Suyono, Wati Rina, & Pratama Yoga. (2017). sistem pendukung keputusan menentukan kualitas bibit pala menggunakan metode SAW (Simple Additive Weighting). *Jurnal Management Sistem Informasi dan Teknologi*.
- Swastika, W. Edi S., Jamhari., & Rio O. S. (2020). Sosialisasi dan Peningkatan Keterampilan dalam Pemanfaatan Bahan Pengawet Alami pada Produk Nugget di Desa Ngringo, Kecamatan Jaten, Kabupaten Karanganyar. *Journal*

- of Agri-food, Nutrition and Public Health. 1(1), 30-38.  
<http://dx.doi.org/10.20961/agrihealth.v1i1.40935>
- Tabaika, R., Juniartin, J., Muna, L., & Masita, A. (2024). Identifikasi Jenis Tanaman Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) di Lokasi Pembibitan Pala di Kota Ternate (Sebagai Bahan Ajar Mata Kuliah Morfologi Tumbuhan. *Edu Cendikia: Jurnal Ilmiah Kependidikan*, 4(2), 399–407.  
<https://doi.org/10.47709/educendikia.v4i02.4507>
- Tepomno R., Kusari S., Spitteller M. (2016). Recent Advances in research on lignans and nelignans. *Natural Product Reports* 33(9), 1044-1092.
- Tiwari R., Mahalpure G. (2025). A Detailed review of pH and Its Applications. *Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical Research* 6(2), 492-505.
- Utomo, S. B., Fujiyanti, M., Lestari, W. P., & Mulyani, S. (2018). Antibacterial Activity Test of the C-4-methoxyphenylcalix[4]resorcinarene Compound Modified by Hexadecyltrimethylammonium-Bromide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria. *JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia)*, 3(3), 201. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v3i3.22742>
- Wahab S., Khan T., Adil M., Khan A. (2021). Mechanistic Aspects of Plant-Based Silver Nanoparticles against Multi-drug Resistant Bacteria. *Heliyon* 7(7).
- Wahyuni S., Patang P., Putra R. (2023). Kajian Minimum Inhibitor Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal concentration (MBC) Ekstrak Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena* L.) sebagai Pengembangan Antibakteri Herbal.
- Wardani, Y. K., Betty, E., Kristiani, E., & Sucahyo, D. (2020). Korelasi Antara Aktivitas Antioksidan dengan Kandungan Senyawa Fenolik dan Lokasi Tumbuh Tanaman *Celosia argentea* Linn. *Bioma* 22(2), 136-142.
- Widyawati, R., Hidayah N., Kusuma W. L. D., Nuwa M. I. (2020). Potensi Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) Sebagai Pengawet Alami Terhadap Kualitas Daging Ayam Broiler. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*, 5(2), 47-51.  
<https://doi.org/10.32503/fillia.v5i2.1170>
- Winarno, F. G. (1993). Pangan: Gizi, Teknologi dan Konsumen. . Gramedia Pustaka Utama.

- Windiartono, A., Riyanti, R., & Wanniatie, V. (2016). Efektivitas Tepung Bunga Kecombrang (*Nicolaia Speciosa Horan*) Sebagai Pengawet Terhadap Aspek Kimia Daging Ayam Broiler. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 4(1), 19-23.
- Yang S., Wang Y., Ren F., Wang X., Pei X., Zhang W., Dong Q. (2023). The Sources of *Bacillus cereus* Contamination and their Association with Cereulide Production in Dairy and Cooked Rice Processing Lines. *Food Quality and Safety* 7, 1-14.
- Zaini N., Mayasari U., Nasution R. A. (2024). Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun Ekor Kuning (*Acalypha hispida*) sebagai Disinfektan Alami Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Klebsiella pneumoniae* secara In-Vitro. *Bioma : Jurnal Biologi Makassar* 9(1), 87-96.
- Zulaicha S. A., Saputra I. S., Sari i. P., Ghifari M. A., Yulizar Y., Permana Y. N., Sudirman. (2021). Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Bioreduktor Alami Ekstrak Daun Ilalang (*imperata cylindrica* L.). *rafflesia Journal of Natural and Applied Sciences* 1(1), 11-19.
- Zhang, X., Liu Z., Shen, W., Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles : Synthesis, Charaterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Science*,. 17(9).
- Żyro, D., Sikora, J., Szykowska-Jóźwik, M., Ochocki J. (2023). Silver, Its Salts and Application in Medicine and Pharmacy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21).

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Layout 96 Well Plate



96 well plate untuk penentuan MIC dan MBC ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap bakteri patogen sebagai berikut :

Kolom 1 : kolom negatif

Kolom 2 : kontrol positif

Kolom 3 : 0,09 mg/mL

Kolom 4 : 0,20 mg/mL

Kolom 5 : 0,39 mg/mL

Kolom 6 : 0,78 mg/mL

Kolom 7 : 1,56 mg/mL

Kolom 8 : 3,13 mg/mL

Kolom 9 : 6,25 mg/mL

Kolom 10 : 12,50 mg/mL

Kolom 11 : 25,00 mg/mL

Kolom 12 : 50,00 mg/mL ekstrak daun pala dengan MHB dan inokulum.

96 well plate untuk penentuan MIC dan MBC NL-AgNPs terhadap bakteri patogen sebagai berikut :

Kolom 1 : kolom negatif

Kolom 2 : kolom positif

Kolom 3 : 0,009 mg/mL

Kolom 4 : 0,020 mg/mL  
 Kolom 5 : 0,039 mg/mL  
 Kolom 6 : 0,078 mg/mL  
 Kolom 7 : 0,156 mg/mL  
 Kolom 8 : 0,313 mg/mL  
 Kolom 9 : 0,625 mg/mL  
 Kolom 10 : 1,25 mg/mL  
 Kolom 11 : 2,5 mg/mL  
 Kolom 12 : 5,00 mg/mL NL-AgNPs dengan MHB dan inokulum.

**Lampiran 2. Two-way ANOVA : Inhibitory Zone versus Bacteria strands, Concentration.**

**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj		F-Value	P-Value
		SS	MS		
Concentration	1	15,844	15,844	5,49	0,032
Bacteria	3	6,948	2,316	0,80	0,510
Concentration*Bacteria	3	17,198	5,733	1,99	0,157
Error	16	46,167	2,885		
Total	23	86,156			

**Tukey Pairwise Comparisons: Concentration**

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Concentration	N	Mean	Grouping
1	12	13,750	A
10	12	12,125	B

*Means that do not share a letter are significantly different.*

***Tukey Pairwise Comparisons: Bacteria***

***Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence***

Bacteria	N	Mean	Grouping
BP	6	13,6667	A
BC	6	13,0833	A
BS	6	12,8333	A
BM	6	12,1667	A

*Means that do not share a letter are significantly different.*

***Tukey Pairwise Comparisons: Concetration\*Bacteria***

***Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence***

Concentration*Bacteria	N	Mean	Grouping
1 BP	3	15,3333	A
1 BC	3	14,6667	A
1 BS	3	13,1667	A
10 BS	3	12,5000	A
10 BM	3	12,5000	A
10 BP	3	12,0000	A
1 BM	3	11,8333	A
10 BC	3	11,5000	A

*Means that do not share a letter are significantly different.*

### Lampiran 3. *Analysis of varians*

**Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada mie basah setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada suhu ruang ( $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$ )**

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj		F-Value	P-Value
		SS	MS		
Concentration	3	279,67	93,222	9,85	0,000
Day	5	24,52	4,903	0,52	0,760
Error	27	255,62	9,467		
Lack-of-Fit	10	194,69	19,469	5,43	0,001
Pure Error	17	60,93	3,584		
Total	35	561,11			

#### Tukey Pairwise Comparisons: Concentration

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration	N	Mean	Grouping
0	12	9,35225	A
0.1	1	5,26932	A B
0,1	11	3,88179	B
1	12	3,03267	B

*Means that do not share a letter are significantly different.*

**Tukey Pairwise Comparisons: Day****Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Day	N	Mean	Grouping
4	6	6,24194	A
3	6	5,96677	A
0	6	5,85477	A
1	6	5,71668	A
8	6	4,56211	A
10	6	3,96177	A

*Means that do not share a letter are significantly different.*

**Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada mie basah setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi NL-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada suhu ruang ( $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$ ).**

**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Concentration	2	456,374	228,187	1007,87	0,000
Day	5	43,666	8,733	38,57	0,000
Concentration*Day	10	200,931	20,093	88,75	0,000
Error	18	4,075	0,226		
Total	35	705,047			

**Tukey Pairwise Comparisons: Concentration****Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

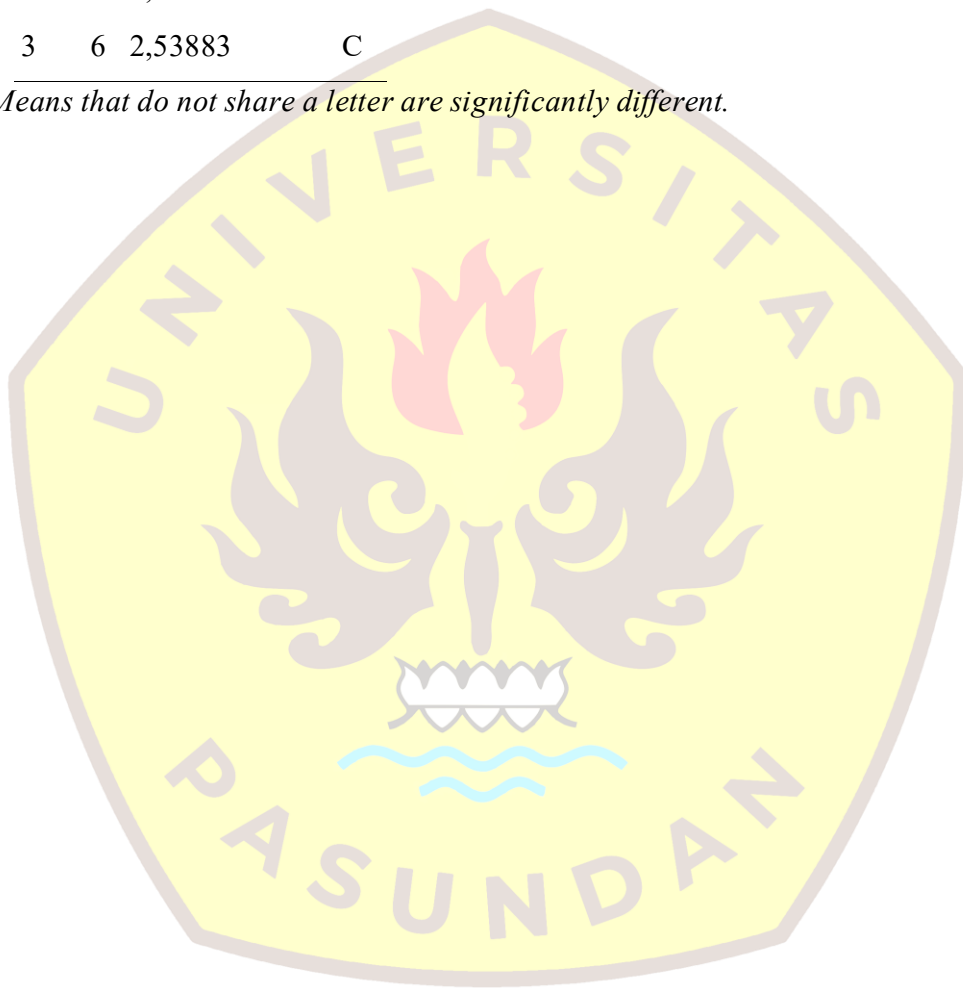
Concentration	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,35225	A
0,10	12	1,82617	B
0,01	12	1,77275	B

*Means that do not share a letter are significantly different.*

**Tukey Pairwise Comparisons: Day****Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Day	N	Mean	Grouping
0	6	5,89300	A
1	6	5,47050	A
4	6	4,00000	B
8	6	4,00000	B
10	6	4,00000	B
3	6	2,53883	C

*Means that do not share a letter are significantly different.*



### Tukey Pairwise Comparisons: Concentration\*Day

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration*Day	N	Mean	Grouping
0,00 4	2	12,0000	A
0,00 8	2	12,0000	A
0,00 10	2	12,0000	A
0,00 3	2	7,6165	B
0,00 1	2	6,6040	B C
0,10 0	2	5,8930	B C
0,00 0	2	5,8930	B C
0,01 0	2	5,8930	B C
0,10 1	2	5,0640	C
0,01 1	2	4,7435	C
0,10 10	2	0,0000	D
0,01 8	2	0,0000	D
0,01 10	2	0,0000	D
0,10 8	2	0,0000	D
0,01 4	2	0,0000	D
0,10 3	2	-0,0000	D
0,10 4	2	-0,0000	D
0,01 3	2	-0,0000	D

*Means that do not share a letter are significantly different.*

**Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada mie basah setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ekstrak daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada suhu pendinginan ( $4 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ).**

#### **Analysis of Variance**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Adj SS</b>	<b>Adj MS</b>	<b>F-Value</b>	<b>P-Value</b>
Concentration	3	473,48	157,826	22,43	0,000
Day	5	38,91	7,781	1,11	0,380
Error	27	189,98	7,036		
Lack-of-Fit	10	163,16	16,316	10,34	0,000
Pure Error	17	26,82	1,578		
Total	35	695,75			

#### **Tukey Pairwise Comparisons: Concentration**

##### **Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

<b>Concentration</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Grouping</b>
0	12	9,22575	A
0.1	1	5,50535	A B
0,1	11	1,70360	B
1	12	1,28233	B

*Means that do not share a letter are significantly different.*

### Tukey Pairwise Comparisons: Day

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Day	N	Mean	Grouping
0	6	6,25170	A
4	6	5,15503	A
10	6	4,35870	A
8	6	4,35870	A
3	6	3,44853	A
1	6	3,00291	A

*Means that do not share a letter are significantly different*

**Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada mie basah setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi NL-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada suhu pendinginan ( $4 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ).**

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Concentration	2	362,16	181,080	264,00	0,000
Day	5	19,05	3,810	5,55	0,003
Concentration*Day	10	204,70	20,470	29,84	0,000
Error	18	12,35	0,686		
Total	35	598,25			

### Tukey Pairwise Comparisons: Concentration

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,22575	A
0,01	12	3,28975	B
0,10	12	1,91692	C

*Means that do not share a letter are significantly different.*

**Tukey Pairwise Comparisons: Day****Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Day	N	Mean	Grouping
0	6	5,89300	A
1	6	5,23450	A B
4	6	5,20067	A B
8	6	4,73000	A B
10	6	4,00000	B
3	6	3,80667	B

*Means that do not share a letter are significantly different.*



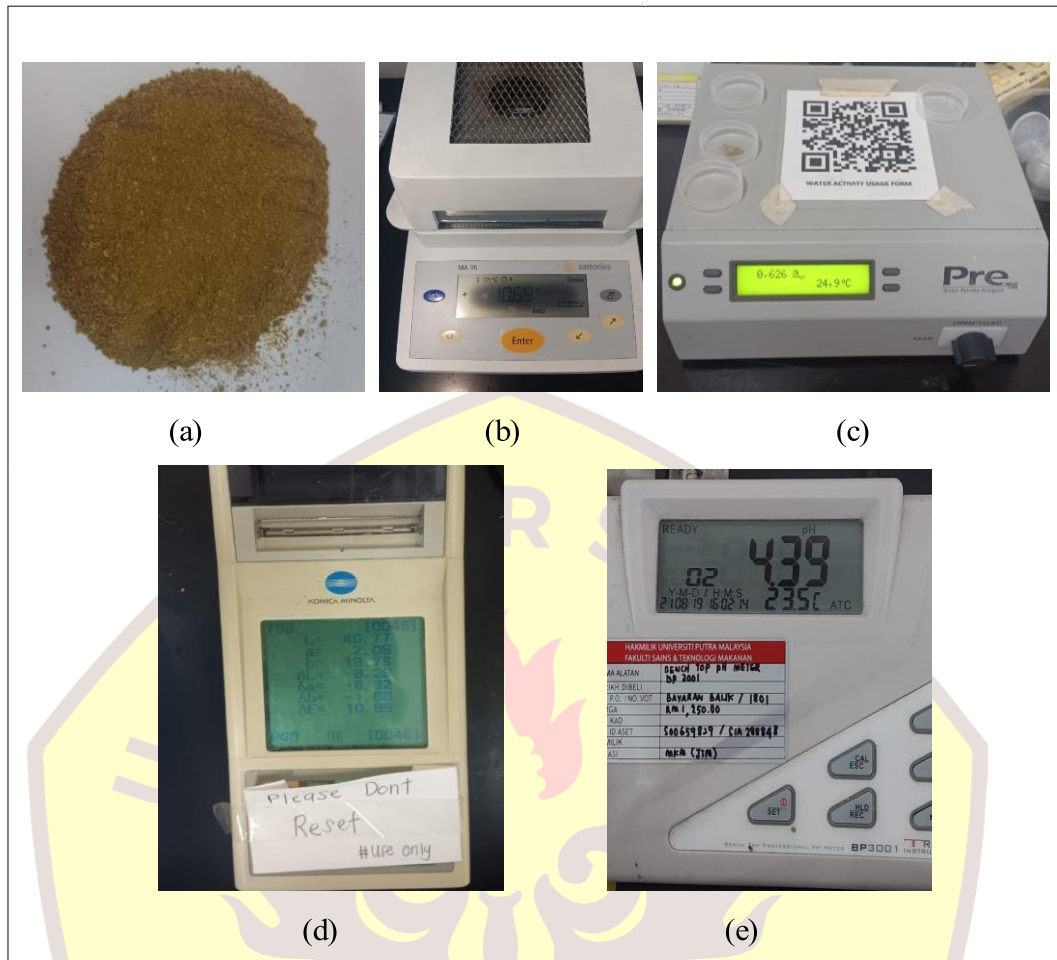
### Tukey Pairwise Comparisons: Concentration\*Day

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration*Day	N	Mean	Grouping
0,00 4	2	12,0000	A
0,00 8	2	12,0000	A
0,00 10	2	12,0000	A
0,00 3	2	7,4685	B
0,00 1	2	5,9930	B C
0,10 0	2	5,8930	B C
0,01 0	2	5,8930	B C
0,00 0	2	5,8930	B C
0,10 1	2	5,6085	B C
0,01 1	2	4,1020	C D
0,01 3	2	3,9515	C D
0,01 4	2	3,6020	C D
0,01 8	2	2,1900	D E
0,10 3	2	0,0000	E
0,10 8	2	0,0000	E
0,01 10	2	0,0000	E
0,10 10	2	0,0000	E
0,10 4	2	0,0000	E

*Means that do not share a letter are significantly different.*

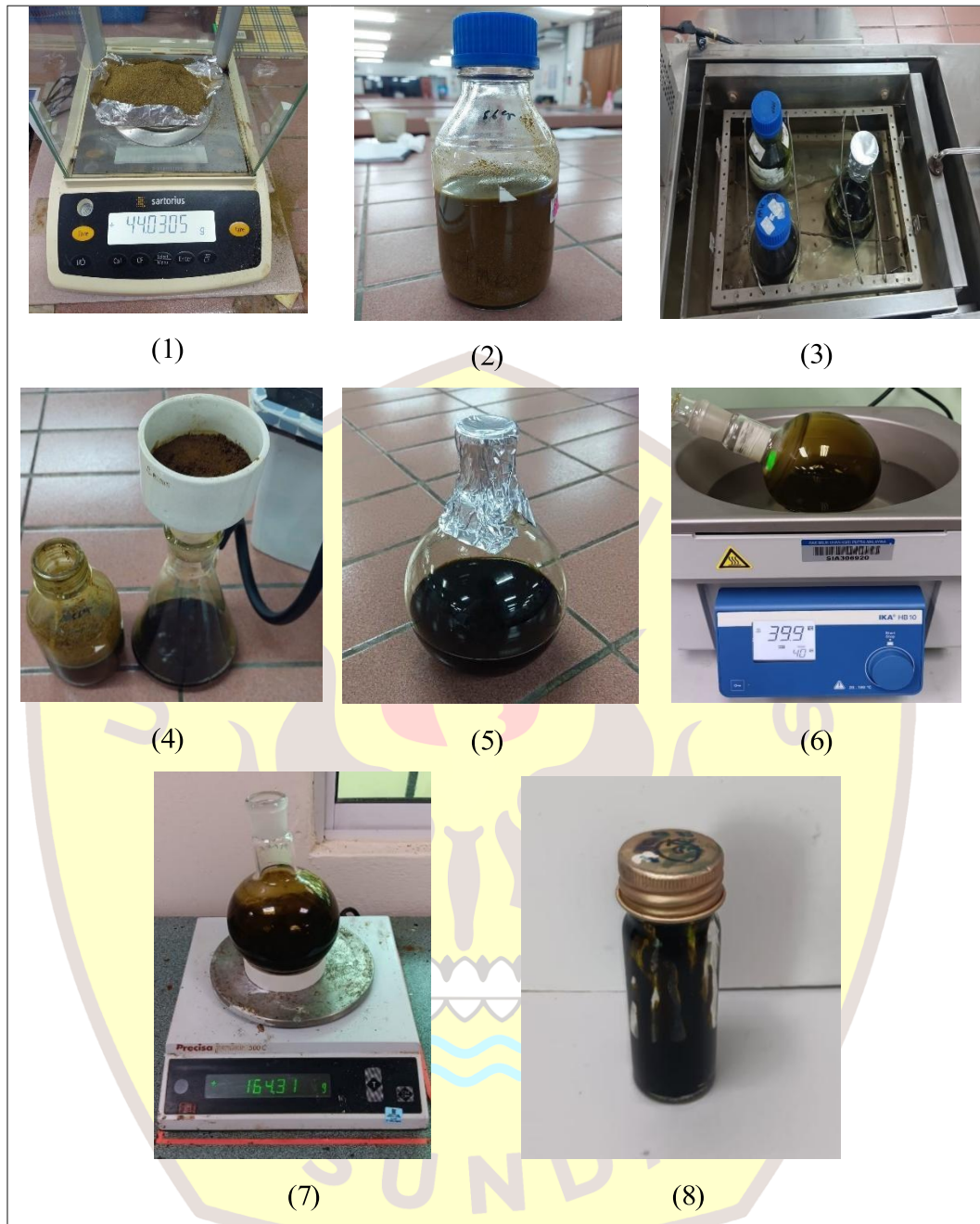
#### Lampiran 4. Dokumentasi analisis fisikokimia



Keterangan :

- (a) Bubuk daun pala.
- (b) pemeriksaan kadar air.
- (c) pemeriksaan aktivitas air ( $a_w$ ).
- (d) pemeriksaan warna.
- (e) pemeriksaan pH.

### Lampiran 5. Dokumentasi Pembuatan ekstrak daun pala

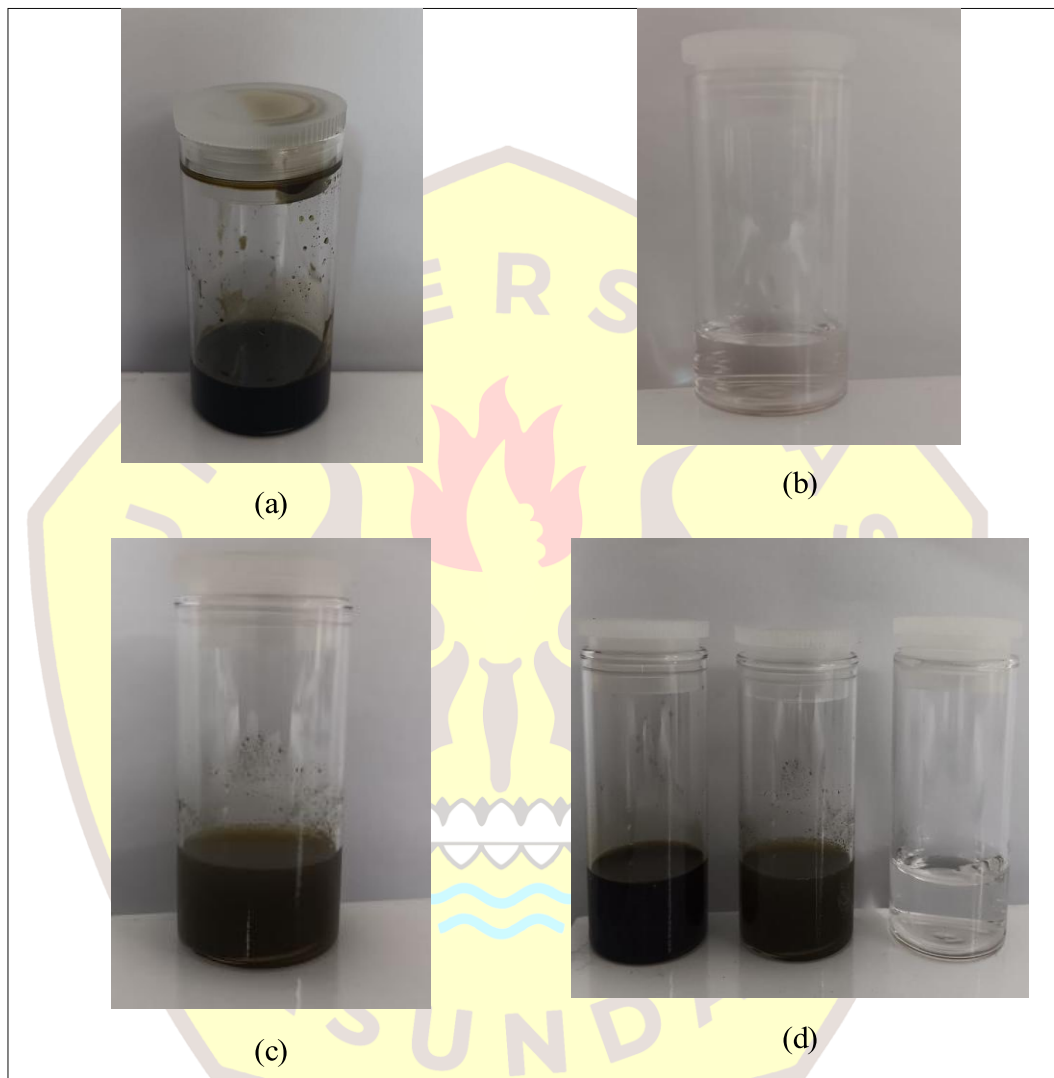


Keterangan :

- (1) Penimbangan bubuk daun
- (2) Pencampuran dengan etanol *absolute* (99,5%) (1:3)
- (3) Ekstraksi dengan menggunakan *incubator shaker* C24
- (4) Pengambilan filtrat hasil ekstraksi
- (5) Filtrat ekstraksi

- (6) Evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator*
- (7) Penimbangan hasil evaporasi
- (8) Ekstrak daun pala

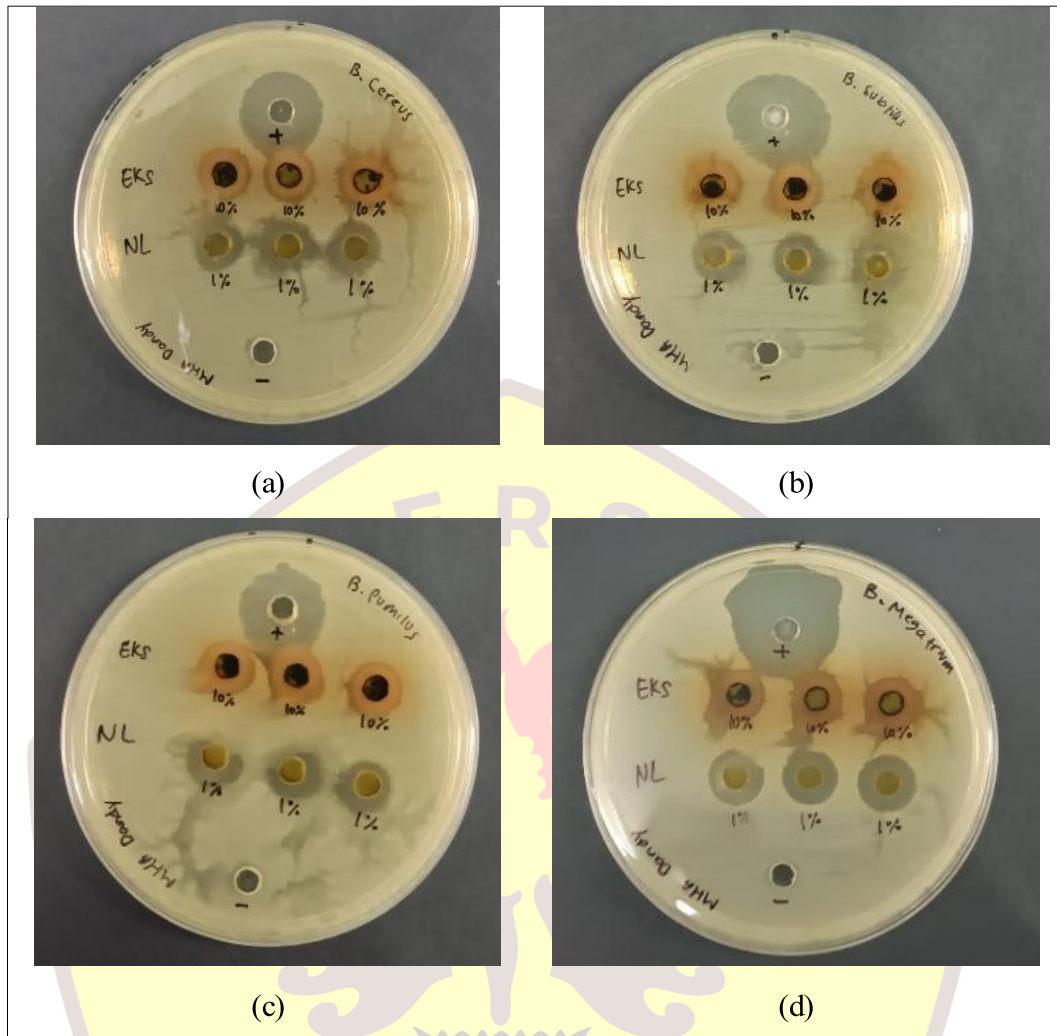
#### Lampiran 6. Dokumentasi Pembuatan NL-AgNPs dengan ekstrak daun pala



Keterangan :

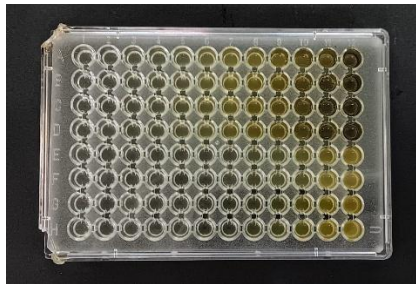
- (a) Ekstrak daun pala 10%
- (b) DMSO 10%
- (c) NL-AgNPs 1%
- (d) Perbandingan warna antara ekstrak daun pala, NL-AgNPs serta DMSO.

### Lampiran 7. Dokumentasi hasil uji WDA

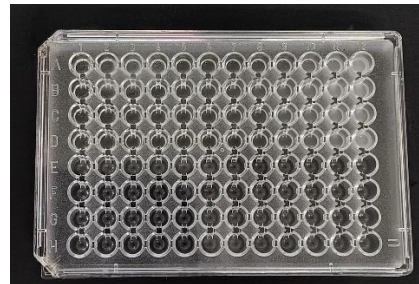


Keterangan :

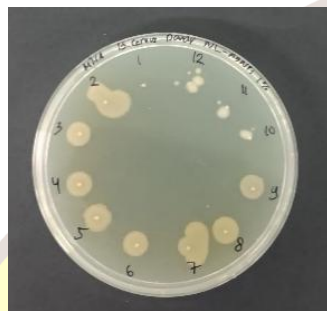
- (a) *B. cereus*
- (b) *B. subtilis*
- (c) *B. pumilus*
- (d) *B. megaterium*

**Lampiran 8. Dokumentasi hasil uji MIC dan MBC**

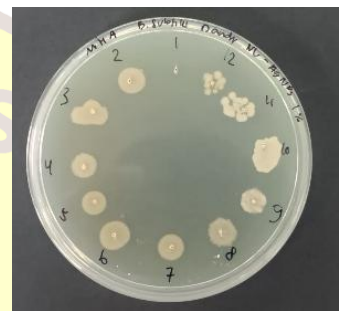
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



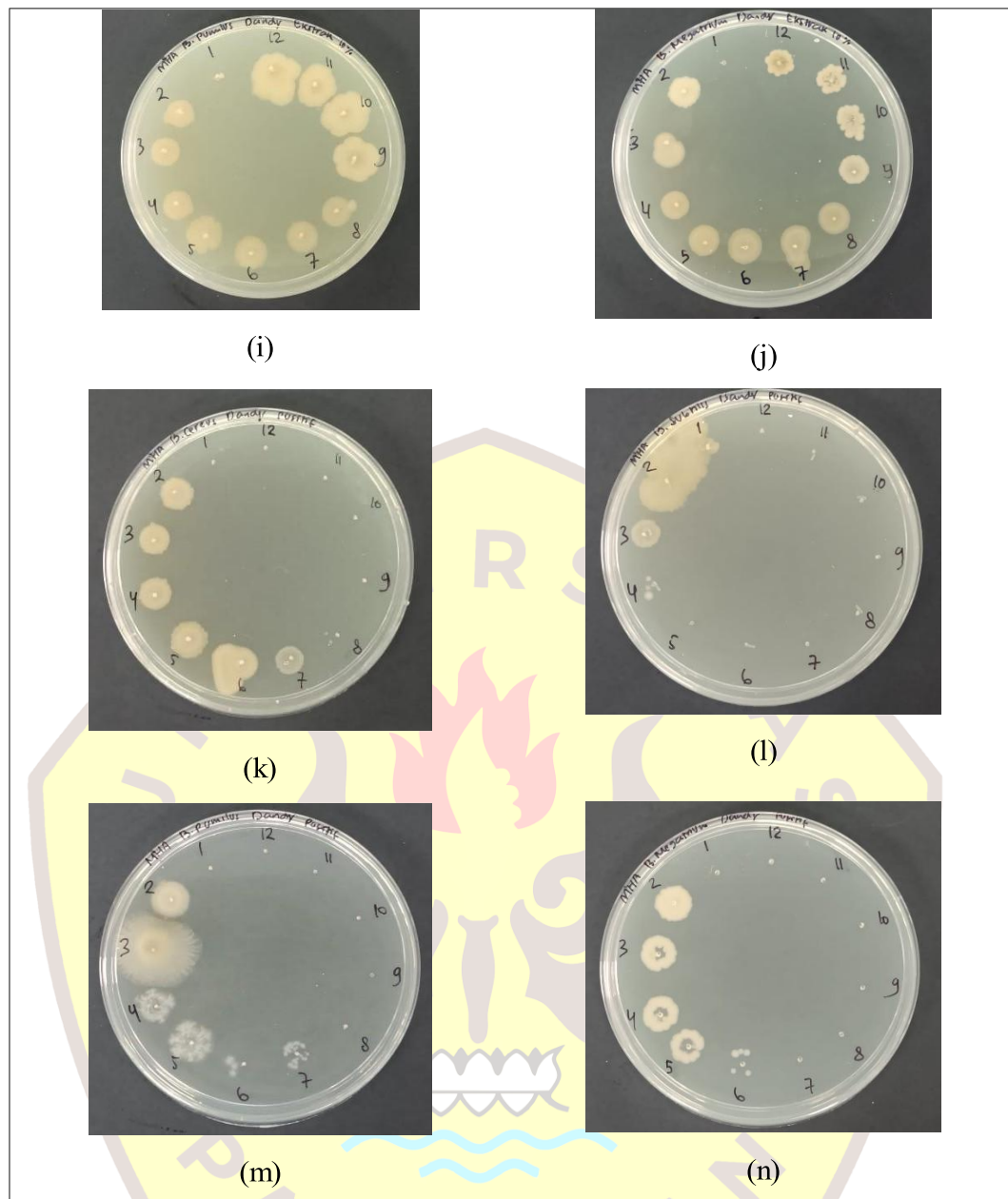
(f)



(g)



(h)



Keterangan :

(a) 96 well plate terhadap ekstrak daun pala dan NL-AgNPs.

(b) 96 well plate terhadap CHX.

(c) MIC dan MBC *B.cereus* NL-AgNPs.

(d) MIC dan MBC *B.subtilis* NL-AgNPs.

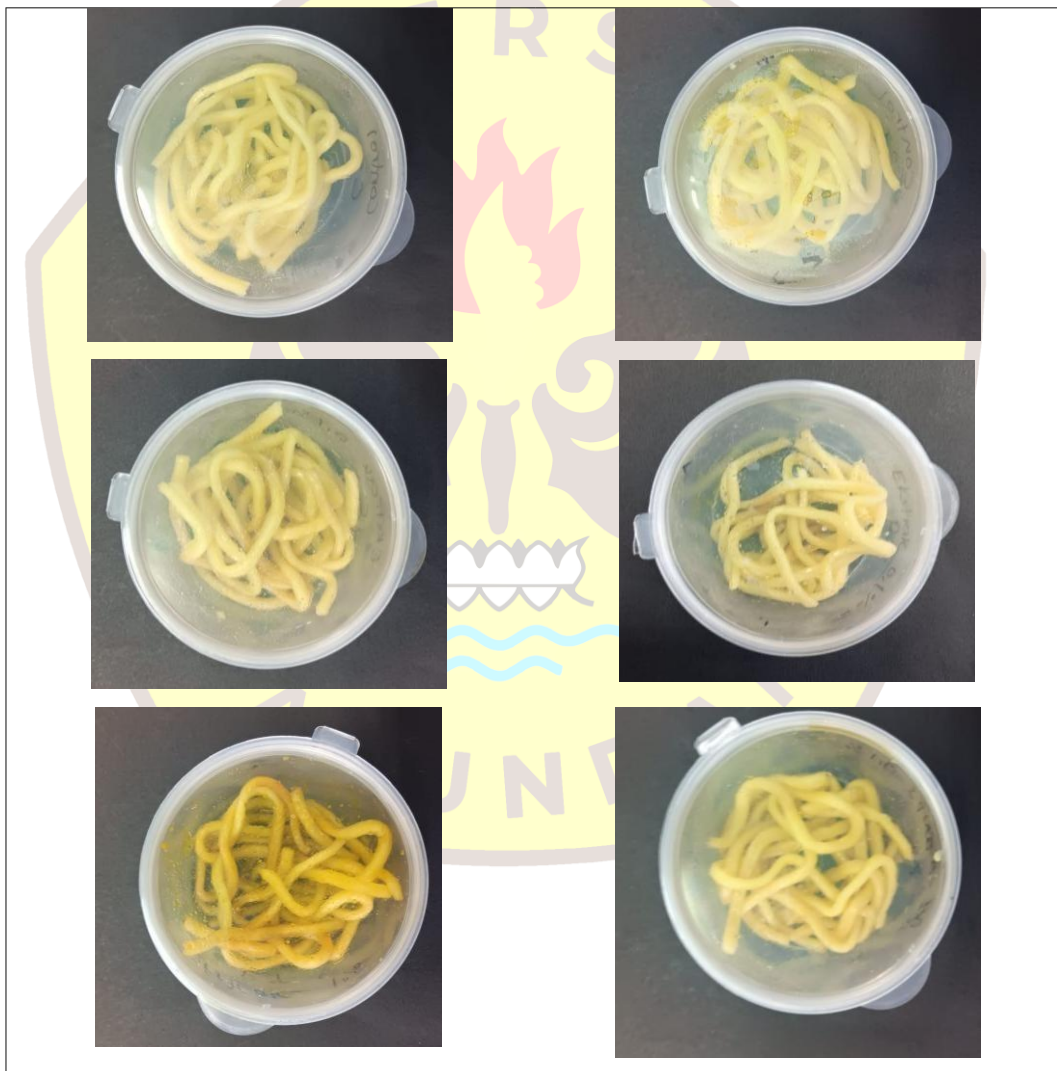
(e) MIC dan MBC *B.pumilus* NL-AgNPs.

(f) MIC dan MBC *B.megaterium* NL-AgNPs.

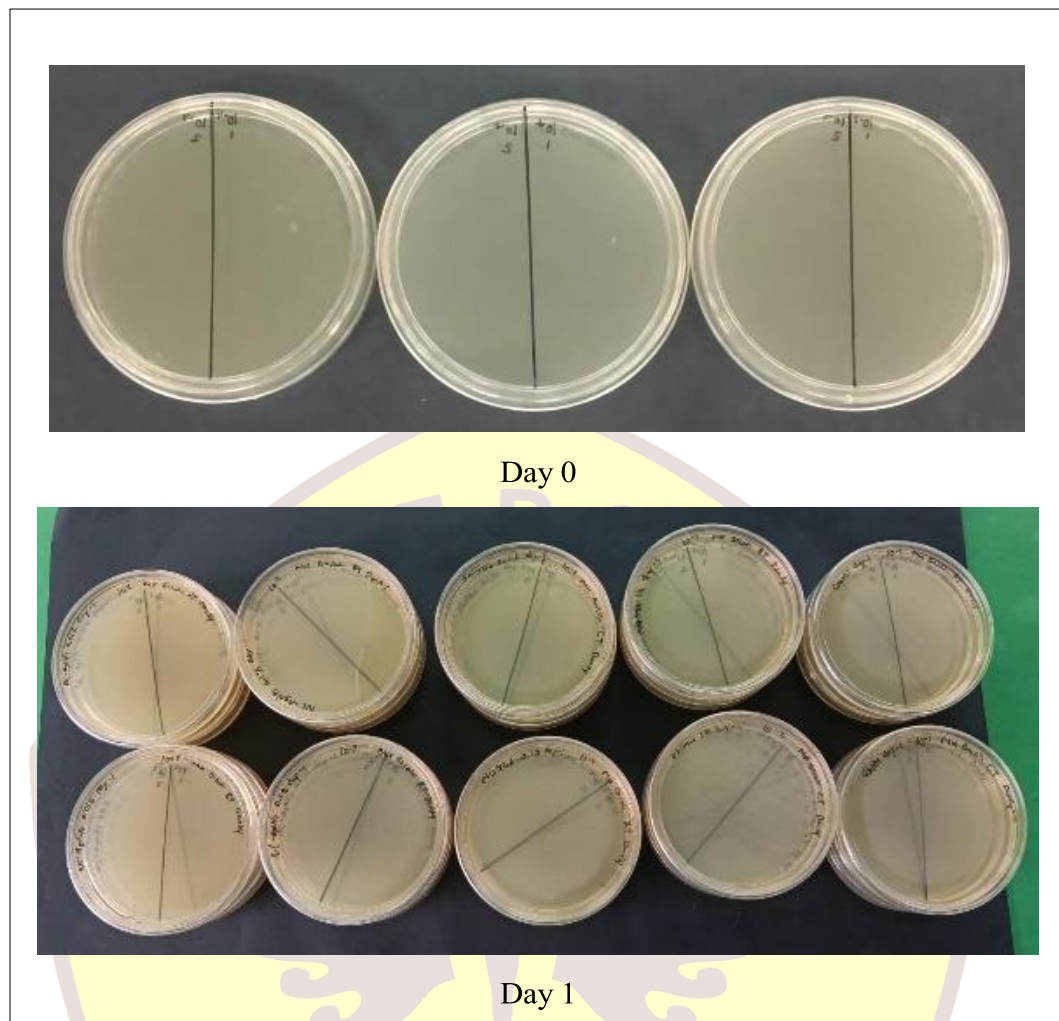
(g) MIC dan MBC *B.cereus* Ekstrak.

- (h) MIC dan MBC *B.subtilis* ekstrak.
- (i) MIC dan MBC *B.pumilus* ekstrak.
- (j) MIC dan MBC *B.megaterium* ekstrak.
- (k) MIC dan MBC *B.cereus* CHX.
- (l) MIC dan MBC *B.subtilis* CHX.
- (m) MIC dan MBC *B. pumilus* CHX.
- (n) MIC dan MBC *B. megaterium* CHX.

**Lampiran 9. Dokumentasi aplikasi ekstrak dan NL-AgNPs terhadap mie basah**





**Lampiran 10. Dokumentasi TPC**

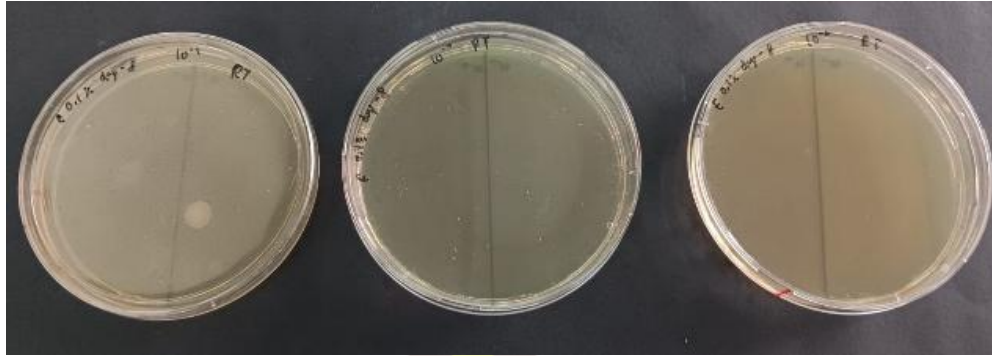


Day 3

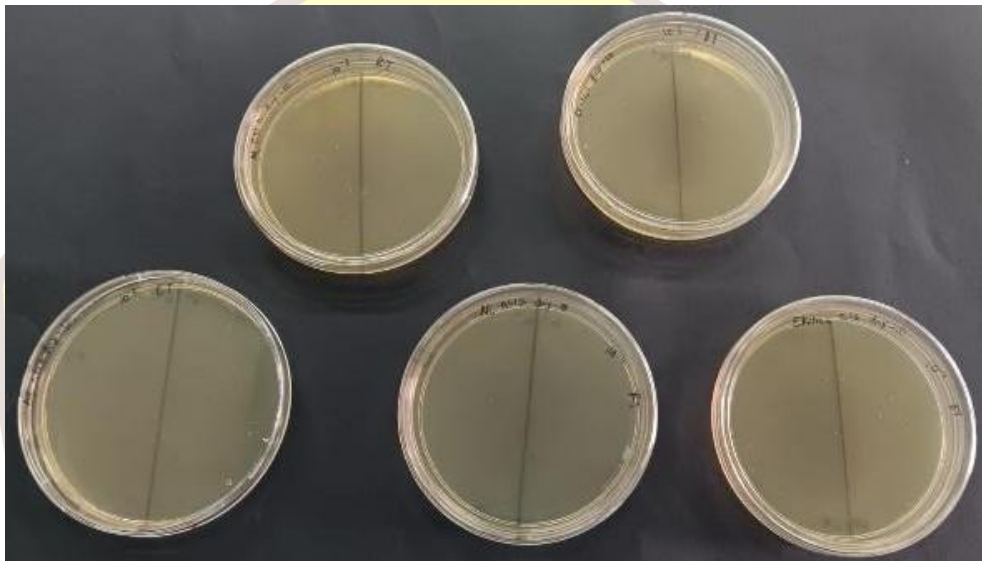


Day 4

PASUNDAN








Day 8



Day 10

PASUNDAN

## Lampiran 11. Persetujuan Proyek Penelitian

			
<p><b>FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI MAKANAN</b>  <i>FACULTY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY</i>      فاکولتي ساءين س دان تيکنولوگي ماکنن</p>			
<p>Serdang, Selangor, Malaysia, 5 August 2025</p>			
<p><b>TO WHOM IT MAY CONCERN</b></p>			
<p>Mr. Dandy Tiara Putra (Matrix No.: 223020087) is a students from Department of Food Technology, Faculty of Engineering, The Pasundan University, Bandung, Indonesia, intends to do inbound activity [Research attachment: <i>Anti-Bacillus</i> Activity of Green Synthesis of Nutmeg [<i>Myristica fragrans</i> Houtt.] Leaf Extract-Mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) and Its Effect on Microbial population in Wet Mie] at Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia (UPM), from August 11th to September 10th 2025, under supervision Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi from Department of Food Science, Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia (UPM).</p>			
<p>Thank you very much for your kind consideration.</p>			
<p>Best Regard</p>			
 <p>ASSOC. PROF. DR. YAYA RUKAYADI      LECTURER      Department of Food Science      Faculty of Food Science and Technology      Universiti Putra Malaysia      43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia</p>			
<p><b>YAYA RUKAYADI, PhD.</b>      Associate Professor      Department of Food Science, Faculty of Food Science and Technology      Universiti Putra Malaysia – UPM      43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia      Mobile Phone: +601112307964      Fax.: +60-3-89423552</p>			
<p>✉ Fakulti Sains dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia      ☎ 603-9769 8367 🌐 <a href="http://food.upm.edu.my">http://food.upm.edu.my</a></p>			