

AKTIVITAS ANTIMIKROBA NANOEMULSI MINYAK BIJI PALA

Iceu Agustinisari, Endang Yuli Purwani, Niken Harimurti, Sri Yuliani

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No.12 Bogor

Email : iceu_ob@yahoo.com

Minyak biji pala mengandung senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antimikroba. Senyawa bioaktif umumnya bersifat tidak stabil sehingga mudah mengalami penurunan aktivitas biologisnya. Salah satu cara untuk meningkatkan stabilitasnya adalah dengan menggunakan teknologi nano. Penelitian ini bertujuan untuk (1) mendapatkan formulasi nanoemulsi minyak biji pala dengan ukuran droplet partikel <300 nm sebagai bahan antimikroba, (2) mendapatkan formulasi nanoemulsi yang memiliki aktivitas antimikroba terbaik terhadap mikroba *E.coli*, *S.aureus* dan *S.cerevisiae*. Proses nanoemulsi minyak biji pala dilakukan dengan menggunakan alat *High Pressure Homogenizer* pada tekanan 20000 psi atau 137,931 KPa dengan 5 siklus. Pengamatan dilakukan terhadap 12 formulasi yang diperoleh dari kombinasi antara tiga konsentrasi minyak (5%, 10% dan 15%) dan dua jenis surfaktan (tween 20 dan tween 80) dengan tiga tingkat konsentrasi (10%, 15% dan 20% dari massa minyak biji pala). Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi sumur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formulasi nanoemulsi minyak biji pala yang diperoleh memiliki ukuran droplet partikel 104,80-161,15 nm.. Konsentrasi minyak biji pala berpengaruh secara signifikan terhadap zona penghambatan pertumbuhan mikroba. Nanoemulsi minyak biji pala dengan formulasi konsentrasi minyak biji pala 15% dan jenis surfaktan Tween 80 dengan konsentrasi 20% dari massa minyak (M15S20T80) memberikan efek penghambatan terbaik pada *E.coli* (11,25 mm), *S.aureus* (13,06 mm) dan *S.cerevisiae* (11,4 mm).

Kata kunci: minyak biji pala, surfaktan, nanoemulsi, antimikroba, penghambatan

ABSTRACT. Iceu Agustinisari, Endang Yuli Purwani, Niken Harimurti and Sri Yuliani. 2013. Antimicrobial Activity of Nutmeg Oil Nanoemulsion. Nutmeg oil contained bioactive compounds which had antimicrobial activities. Generally, bioactive compounds have a limited stability, so that they undergo biological activity degradation easily. One of ways to increase its stability is using nanotechnology. This research was aimed (1) to obtain nutmeg oil nanoemulsion formulation which having particle size <300 nm as antimicrobial agent, (2) to obtain nanoemulsion formulation which having the best antimicrobial activity toward *E.coli*, *S.aureus* and *S.cerevisiae*. Processing of nanoemulsion was conducted using High Pressure Homogenizer at 20000 psi or 137,931 Kpa and 5 cycles. Observation was conducted to 12 nanoemulsion formulation which was gained from combination between concentration of nutmeg oil (5%, 10%, 15%) and types of surfactant (tween 20 and tween 80) with 3 level concentration (10%, 15% and 20% from nutmeg oil mass). Antimicrobial testing was conducted using agar well diffusion method. The result showed that formulation of nutmeg oil nanoemulsion having particle size 104,80-161,15 nm. Nutmeg oil concentration had significantly effect in inhibition zone of microbes growth. Formulation of nutmeg oil nanoemulsion with 15% nutmeg oil and surfactant tween 80 as much as 20% of nutmeg oil mass gave the best growth inhibition on *E.coli* (11,25 mm), *S.aureus* (13,06 mm) dan *S.cerevisiae* (11,4 mm).

Key words : nutmeg oil, nanoemulsion, antimicrobial, inhibition

PENDAHULUAN

Rempah-rempah dan tanaman aromatik dikenal sebagai bahan tambahan makanan untuk meningkatkan organoleptik dalam makanan yang juga memiliki beberapa sifat fungsional, diantaranya sebagai antimikroba. Aktivitas antimikroba dari minyak tanaman dan ekstraknya dapat diaplikasikan sebagai pengawet makanan, bahan baku farmasi dan obat tradisional. Antimikroba alami semakin berkembang dewasa ini seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan makanan yang aman dan sehat.

Salah satu jenis rempah asli Indonesia yang memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi adalah Pala (*Myristica*

fragrans Houtt)^{1,2}. Beberapa penelitian pernah dilakukan terkait dengan sifat antimikroba yang dimiliki oleh minyak biji pala. Minyak biji pala memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap *B.cereus*, *S. Epidermidis* dan *E.coli*³. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa minyak biji pala memiliki aktivitas antifungi terhadap *P.Chrysogenum* yang biasa ditemukan pada permukaan *rubberwood*⁴. Hasil penelitian lain menyebutkan bahwa minyak atsiri biji *M.fragrans*, minyak atsiri biji *M.fattua* dan ekstrak kasar biji *M.fragrans* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *X.campestris* yang berasal dari brokoli⁵. Lebih lanjut dijelaskan bahwa minyak atsiri biji *M.fragrans* memiliki aktivitas yang lebih baik daripada ekstrak kasar biji *M.fragrans*⁵. Aktivitas bakterisidal yang dimiliki oleh biji pala

terutama karena adanya kandungan senyawa miristisin, senyawa hidrokarbon terpena dan turunan fenilpropana⁶.

Antimikroba alami biasanya merupakan senyawa bioaktif yang pada umumnya bersifat reaktif secara kimiawi, yang dapat menyebabkan sejumlah masalah berkaitan dengan sistem pangan yang sangat kompleks. Beberapa pengaruh yang ditimbulkan diantaranya pada stabilitas fisik atau integritas kimia pangan, juga degradasi aktivitas biologi dari senyawa bioaktif tersebut⁷.

Salah satu upaya untuk meningkatkan stabilitas senyawa aktif dan melindunginya dari degradasi karena pengaruh lingkungan adalah dengan menggunakan teknologi nanoenkapsulasi/ nanoemulsi. Penggunaan teknologi nanoenkapsulasi/ nanoemulsi terhadap komponen bioaktif merupakan alternatif efektif beberapa tahun terakhir ini⁸. Beberapa kelebihan teknologi ini diantaranya adalah dapat meningkatkan stabilitas fisik komponen bioaktif tersebut, melindungi dari kerusakan kimiawi, melindunginya dari interaksi dengan bahan tambahan makanan (*food ingredient*), dan dapat terdispersi dengan baik dalam sistem tirtawi (*aqueous*). Sistem penghantaran dalam ukuran nano dapat meningkatkan mekanisme absorpsi seluler pasif, yang kemudian mengurangi resistensi transfer massa dan meningkatkan aktivitas antimikroba. Hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian yang menyatakan bahwa enkapsulasi eugenol dan carvacrol dalam misel surfaktan berukuran nano (*nanometric*) dapat meningkatkan aktivitas antimikroba⁹. Peningkatan aktivitas antimikroba yang dihasilkan tergantung pada formulasi dan ukuran sistem penghantarannya, juga kelas mikroorganismenya.

Beberapa penelitian telah dilakukan terkait dengan sifat antimikroba yang dimiliki oleh nanoemulsi. Penelitian berupa nanoemulsi air dalam minyak menghasilkan formulasi yang memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas¹⁰. Nanoemulsi tersebut menunjukkan generasi baru disinfektan yang merusak membran sel prokariotik dan virus secara selektif, tetapi tidak berpengaruh terhadap sel eukariotik yang terdapat pada jaringan. Laporan penelitian lainnya menyebutkan aktivitas bakterisidal nanoemulsi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*¹¹ serta *Listeria monocytogenes*¹². Aplikasi inkorporasi enkapsulasi minyak esensial (terpene dan D-limonen) sebagai antimikroba dalam jus buah telah dilakukan dengan metode enkapsulasi dalam sistem nanoemulsi¹³.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan formulasi nanoemulsi minyak biji pala dan mengetahui aktivitas antimikrobanya. Penelitian nanoemulsi minyak biji pala sebagai bahan antimikroba ini akan memperkaya kegunaan minyak biji pala.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Penelitian dilaksanakan mulai Januari-Desember 2012 bertempat di Laboratorium Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian, Pusat Teknologi Bahan Industri Nuklir- Badan Tenaga Atom Nasional, dan Laboratorium Pusat Teknologi Farmasi dan Medika BPPT

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji pala (*food grade*) yang diperoleh dari PT. Djasula Wangi, Jakarta, surfaktan Tween 20 (Sigma), Tween 80 (Sigma), aquades, kultur mikroba *S.aureus*, *E.coli* dan *S. cerevisiae*, *Plate Count Agar* (Merck), *Nutrient Broth* (Merck), NaCl (Sigma). Peralatan yang digunakan adalah *High Pressure Homogenizer* (NanoDebee Laboratory Homogenizer, USA), *High Shear Homogenizer* (Micra Ultraturax Homogenizer, Germany), *Particle Size Analyzer* (Corduan Technologies) alat-alat gelas dan peralatan pembantu lainnya.

Metode

Proses nanoemulsifikasi minyak biji pala

Proses nanoemulsi minyak biji pala dalam air (o/w) dilakukan dengan teknik HPH (*High Pressure Homogenization*). Emulsi dibuat dengan basis 100 g, terdiri dari minyak biji pala 5%, 10%, 15% ditambahkan dengan 10-20% (dari berat minyak) surfaktan dan 80-90% akuades. Formulasi secara lengkap ditampilkan dalam Tabel 1.

Proses emulsifikasi diawali dengan pembuatan emulsi kasar. Mula-mula surfaktan dilarutkan dalam air (akuades) dengan menggunakan HSH (*High Shear Homogenization*) selama 1 menit. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan minyak biji pala. Larutan dihomogenisasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 16000 rpm. Proses pengecilan ukuran droplet emulsi dilakukan dengan menggunakan alat *High Pressure Homogenizer* (HPH) pada tekanan 20000 psi atau 137931 KPa, yang berulang sebanyak 5 siklus. Proses nanoemulsi dengan HPH diawali dengan memasukkan emulsi kasar ke dalam bagian penampung sampel di alat HPH. Hasil emulsi keluar melalui selang dan ditampung dalam gelas piala yang dikondisikan dingin dengan es batu di sekelilingnya. Pada saat keluar dari alat HPH, emulsi tersebut memiliki suhu sekitar 40-50°C. Emulsi yang akan mengalami siklus homogenisasi berikutnya harus memiliki suhu ruang. Oleh karena itu diperlukan pendinginan.

Penentuan Ukuran Droplet Emulsi

Ukuran droplet emulsi ditentukan dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* Corduan

Tabel.1. Formulasi nanoemulsi minyak pala

Table 1. Formulation of nutmeg oil nanoemulsion

Nomor Formulasi/ Formulation number	Konsentrasi Minyak Pala dalam Formula (%)/ Concentration of nutmeg oil in formula	Jenis Surfaktan/ Type of surfactant	Konsentrasi Surfaktan dari Minyak Pala (%)/ Concentration of surfactant from nutmeg oil	Konsentrasi aquades dalam formula (%)/ Concentration of aquades in formula
1	5	T80	10	94,5
2	10	T80	10	89
3	5	T80	20	94
4	10	T80	20	88
5	15	T80	15	82,75
6	15	T80	20	82
7	5	T20	10	94,5
8	10	T20	10	89
9	5	T20	20	94
10	10	T20	20	88
11	15	T20	15	82,75
12	15	T20	20	82

Technologies. Alat tersebut bekerja dengan prinsip *Dynamic Light Scattering*. Suspensi sampel diradiasi oleh laser dan *scattered light* pada arah tertentu. Dari fluktuasi dan intensitas *scattered light*, mobilitas partikel dapat dihitung dan kemudian dengan menggunakan formula Stokes-Einstein, ukuran partikel dapat diketahui. Kondisi pengukuran sampel dilakukan pada suhu 25°C. Penentuan ukuran partikel ini dilakukan sebanyak 3 ulangan.

Aktivitas antimikroba¹⁴

Kultur mikroba yang diuji adalah *E.coli*, *S.aureus* dan *S.cerevisiae*. Kultur disegarkan secara berkala di dalam media *Nutrient Broth*. Untuk pengujian, kultur disegarkan selama 24 jam dan kepadatannya mencapai 10¹⁰ CFU/ml. Skrining menggunakan metode sumur (*well cut diffusion*). Kultur (1 ml) ditransfer ke media PCA (*Plate Count Agar*) yang ditambah indikator TTC (*2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chlorid*) secara aseptis. Agar plate dibiarkan mengering, kemudian dibuat *hole* (lubang) berdiameter 6 mm menggunakan *cork borer*. Minyak pala atau nanoemulsi minyak pala (50 ul) dimasukkan kedalam lubang (*hole/sumur*) dan dibiarkan selama 1 jam (difusi) dan diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. Di akhir masa inkubasi, diameter zona hambatan (*clear zone*) diukur. Sebagai kontrol negatif digunakan agar plate tanpa penambahan minyak pala dan aquades sebagai kontrol positif. Zona penghambatan dihitung berdasarkan dari diameter (mm) Zona bening: <9mm inaktif; 9-12mm aktif parsial; 13-18mm aktif;>18 mm sangat aktif. Pengujian aktivitas antimikroba ini

dilakukan dengan dua ulangan. Data hasil pengamatan diolah dengan menggunakan Design Expert 7.1.5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil emulsifikasi minyak biji pala dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengukuran ukuran droplet emulsi dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) menunjukkan pengaruh konsentrasi surfaktan dan jenis surfaktan terhadap ukuran droplet emulsi yang dihasilkan. Jenis dan konsentrasi emulsifier atau surfaktan memberikan pengaruh terhadap ukuran droplet. Hasil penelitian menyebutkan bahwa surfaktan berberat molekul rendah seperti SDS dan Tween lebih efektif dalam membentuk droplet yang kecil dibandingkan biopolimer (*caseinat* dan *β-lactoglobulin*) dengan kondisi proses homogenisasi yang sama menggunakan HPH¹⁵. Dalam penelitian ini, jenis surfaktan yang digunakan sama yaitu tween yang merupakan surfaktan non ionik, tetapi berbeda dalam nilai HLB-nya. Penggunaan tween 20 cenderung meningkatkan ukuran droplet. Tween 20 memiliki nilai HLB lebih tinggi daripada tween 80. Semakin tinggi nilai HLB menunjukkan sifatnya yang lebih larut air. Kemungkinan penggunaan tween 20 akan lebih baik bila dikombinasikan dengan surfaktan jenis surfaktan yang bersifat lipofilik.

Pengaruh surfaktan terlihat pada hasil pengukuran droplet emulsi formula 1 dan formula 3 (Tabel 2). Emulsi formula 3 dengan konsentrasi surfaktan 20% memiliki ukuran droplet yang lebih kecil (104,8nm) daripada emulsi formula 1 dengan konsentrasi 10% (148,15 nm).

Tabel 2. Ukuran Droplet Emulsi Minyak Pala
Table 2. Droplet size of nutmeg oil emulsion

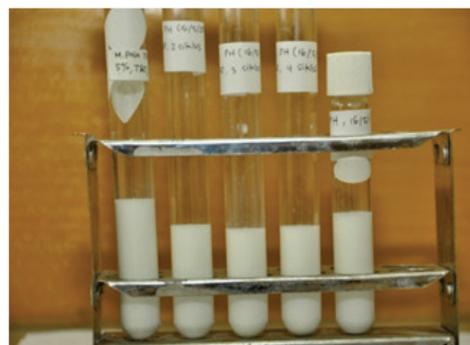
Formula/ Formula	Ukuran Droplet Emulsi (nm)/Droplet Size (nm)	Indeks Polidispersitas/ Polydispersitas index
1	148,15± 23,69	0,171±0,058
2	161,15±0,07	0,219±0,009
3	104,80±2,83	0,118±0,003
4	127,65±1,77	0,189±0,019
5	147,80±3,68	0,230±0,014
6	153,10±4,31	0,2405±0,005
7	125,40±11,46	0,1825±0,008
8	144,22±0,02	0,226±0,004
9	123,90±11,17	0,196±0,028
10	141,50±7,64	0,259±0,021
11	156,55±5,16	0,278±0,005
12	149,65±1,91	0,272±0,011

Ukuran droplet emulsi yang lebih kecil ditemui pada formula emulsi yang memiliki konsentrasi surfaktan yang lebih besar. Dengan meningkatnya konsentrasi surfaktan maka semakin banyak surfaktan yang tersedia untuk menutupi/melindungi permukaan droplet yang terbentuk selama homogenisasi. Data yang diperoleh pada Tabel 2 juga menunjukkan peningkatan konsentrasi minyak biji pala cenderung meningkatkan ukuran droplet partikel emulsi. Hal ini terlihat dari ukuran droplet emulsi pada formula 1 dan 2, dimana formula 2 (161,15 nm) memiliki ukuran droplet emulsi yang lebih tinggi dari pada formula 1 (148,15 nm). Formulasi nanoemulsi minyak biji pala dengan ukuran droplet terkecil adalah yang mengandung konsentrasi minyak biji pala 5% dengan konsentrasi surfaktan 20% dari massa minyak, baik pada jenis surfaktan tween 20 maupun tween 80 (F3 dan F9).

Nilai indeks polidispersitas (PDI) memberikan informasi mengenai kestabilan emulsi. Kecilnya nilai PDI menunjukkan distribusi ukuran partikel yang sempit yang berarti pula ukuran partikel relatif seragam. Nanoemulsi dikatakan terbentuk jika ukuran diameter partikel < 200 nm dengan nilai indeks polidispersitas $0,2 < PDI < 0,6$ yang akan stabil dari kemungkinan terjadinya pertumbuhan partikel dan pemisahan gravitasi¹⁶. Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa semua formulasi nanoemulsi yang dihasilkan dari penelitian ini memiliki nilai indeks polidispersitas antara 0,118 hingga 0,278, sehingga tergolong stabil.

Uji Antimikroba emulsi minyak pala

Data hasil pengamatan uji antimikroba yang diperoleh dari percobaan ini berupa diameter zona penghambatan pada kultur mikroba *E.coli*, *S.aureus*

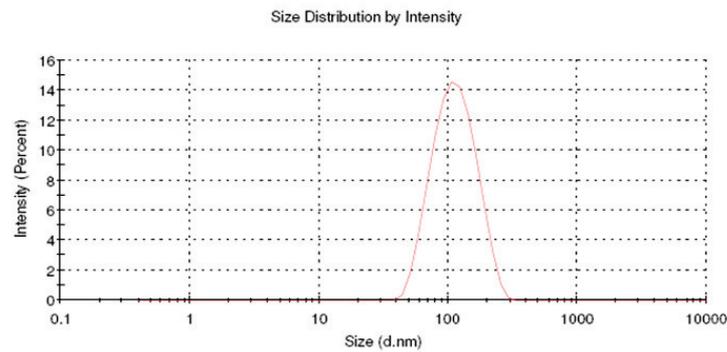


Gambar 1. Nanoemulsi minyak pala
Figure 1. Nanoemulsion of nutmeg oil

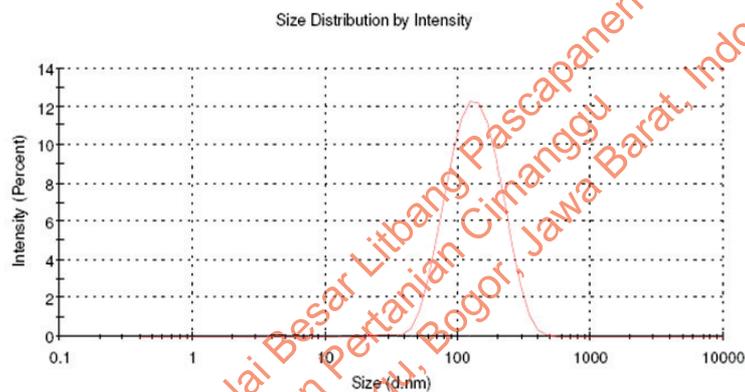
dan *S.cerevisiae* yang diberi nanoemulsi minyak biji pala. Dalam percobaan ini terdapat enam formulasi nanoemulsi dengan menggunakan jenis surfaktan tween 20 dan enam formulasi nanoemulsi yang menggunakan jenis surfaktan tween 80. Dari pengamatan hasil uji ingin diketahui formulasi nanoemulsi terbaik dengan faktor konsentrasi minyak biji pala dan konsentrasi surfaktan dari dua jenis surfaktan yang digunakan dalam penelitian ini. Rata-rata diameter zona hambat nanoemulsi minyak biji pala terhadap tiga kultur mikroba ditunjukkan pada Tabel 3.

Data hasil pengamatan diolah dengan menggunakan Design Expert 7.1.5. Hasil analisis statistik pada masing-masing variabel respon, menunjukkan bahwa konsentrasi minyak pala dalam formula memberikan pengaruh nyata terhadap diameter zona penghambatan pada *E.coli*, *S.aureus* dan *S.cerevisiae*. Sementara itu, konsentrasi surfaktan tidak berpengaruh nyata terhadap besarnya zona penghambatan pertumbuhan mikroba yang diujikan.

Semakin tinggi konsentrasi minyak pala dalam emulsi minyak pala semakin luas zona penghambatan terhadap mikroba yang diujikan. Nanoemulsi minyak pala dengan formula emulsi konsentrasi minyak 5% dan jenis surfaktan tween 20 dapat dikategorikan inaktif karena zona penghambatannya kurang dari 9 mm. Sedangkan nanoemulsi minyak pala dengan konsentrasi minyak pala 10% dan 15% dengan jenis surfaktan tween 20 maupun tween 80 memiliki aktivitas antimikroba dengan kategori aktif parsial (9-12 mm). Emulsi minyak pala dengan formula minyak pala 15% dengan jenis surfaktan Tween 20 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli* (10,51 mm) dan *S.aureus* (10,35 mm) sama dan lebih baik daripada minyak pala (10,19 mm). Hal berbeda dengan hasil yang diperoleh dari *screening* antimikroba emulsi minyak pala yang menggunakan Tween 80. Emulsi minyak pala dengan formula konsentrasi minyak 15% cenderung menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih baik dibanding minyak palanya terhadap jenis mikroba *S.aureus* dan *S. cereviceae*.



Gambar 2. Kurva distribusi ukuran droplet emulsi pada formula 3
 Figure 2. Droplet size distribution curve for formula 3



Gambar 3. Kurva distribusi ukuran droplet emulsi formula 9
 Figure 3. Droplet size distribution for formula 9

Tabel 3. Hasil Screening Aktivitas Antimikroba Nanoemulsi Minyak Pala
 Table 3. Result of antimicrobial activity screening of nutmeg oil nanoemulsion

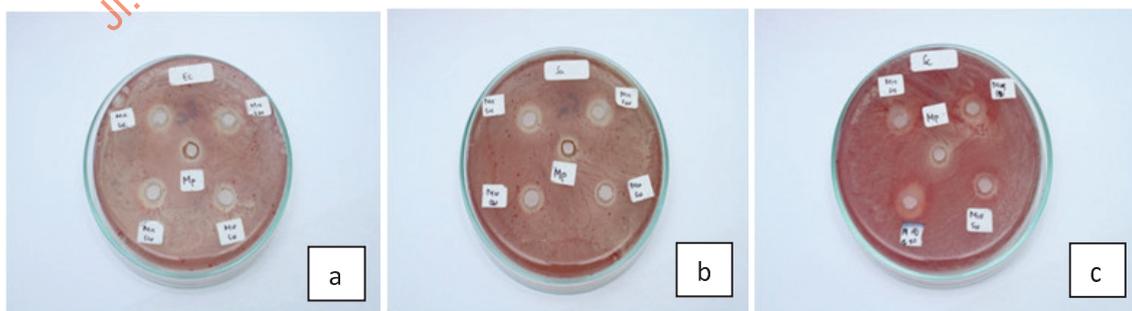
Sampel/Sample	Diameter zona bening (mm)/Diameter of clear zone (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cereviceae</i>
Surfaktan Tween 20			
M5S10T20 (minyak pala 5%, surfaktan 10%)	8,12±0,23	7,64±0,90	6,85±0,23
M5S20T20 (minyak pala 5%, surfaktan 20%)	8,92±0,45	8,60±0,90	9,39±0,23
M10S10T20 (minyak pala 10%, surfaktan 10%)	9,08±0,23	9,39±0,23	7,64±1,35
M10S20T20 (minyak pala 10%, surfaktan 20%)	7,96±1,35	10,19±0,45	8,12±2,03
M15S15T20 (minyak pala 15%, surfaktan 15%)	10,51±0,00	10,35±0,23	11,78±1,35
M15S20T20 (minyak pala 15%, surfaktan 20%)	12,10±0,90	11,62±1,58	10,83±0,90
Minyak Pala	10,51±0,90	10,19±0,45	13,22±1,13
Surfaktan Tween 80			
M5S10T80 (minyak pala 5%, surfaktan 10%)	9,55±0,45	8,76±1,58	9,39±0,90
M5S20T80 (minyak pala 5%, surfaktan 20%)	9,24±0,00	10,19±0,45	9,71±0,23
M10S10T80 (minyak pala 10%, surfaktan 10%)	9,39±0,23	10,03±0,23	10,99±0,23
M10S20T80 (minyak pala 10%, surfaktan 20%)	10,19±0,45	10,19±0,90	12,10±0,00
M15S15T80 (minyak pala 15%, surfaktan 15%)	11,46±0,00	10,83±1,35	10,99±0,68
M15S20T80 (minyak pala 15%, surfaktan 20%)	11,31±1,13	13,22±0,23	11,94±0,23
Minyak Pala	11,62±0,23	10,35±0,23	9,87±0,45

Minyak esensial memiliki kemampuan aktivitas antimikroba terhadap ketiga jenis mikroba yang diuji dengan tingkat penghambatan yang berbeda-beda. Perbedaan tingkat sensitivitas jenis mikroba ini berkaitan dengan toleransi intrinsik mikroba terhadap minyak esensial¹⁷. Pada beberapa literatur disebutkan bahwa mikroorganisme gram positif lebih sensitif daripada gram negatif terhadap minyak esensial². Akan tetapi penelitian lain menyebutkan bahwa bakteri gram positif kurang sensitif bahkan sama sensitivitasnya dengan bakteri gram negatif⁸. *E. coli* termasuk jenis mikroba gram negatif, sedangkan *S.aureus* merupakan jenis bakteri gram positif. Data hasil pengamatan pada penelitian ini menunjukkan pada formula tertentu zona hambat pada *S.aureus* lebih besar daripada zona hambat pada *E.coli*. Akan tetapi pada formula lain pengaruh yang ditimbulkan kebalikannya. Dari percobaan ini diketahui bahwa nanoemulsi minyak pala memiliki aktivitas antimikroba. Formula nanoemulsi yang terdiri dari konsentrasi minyak pala 15% dan konsentrasi surfaktan 20% dari massa minyak pala menghasilkan zona penghambatan yang lebih baik daripada formulasi lainnya. Zona hambat yang dihasilkan dari formulasi tersebut menyamai, bahkan lebih baik daripada aktivitas antimikroba minyak pala. Penggunaan jenis surfaktan tween 80 pada formulasi nanoemulsi cenderung menghasilkan zona hambat yang lebih baik dibanding formulasi dengan tween 20. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan tingkat kelarutan senyawa fitokimia minyak pala dalam sistem emulsi. Nilai HLB tween 20 yang lebih tinggi daripada tween 80 menyebabkan sifatnya yang lebih larut air. Kemungkinan hal ini mengakibatkan berpengaruh terhadap tingkat solubilitas senyawa fitokimia antimikroba yang bersifat lipofilik dalam minyak pala.

Aktivitas antimikroba pada minyak pala maupun nanoemulsi minyak pala terutama disebabkan oleh senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya.

Senyawa fitokimia yang terdapat dalam minyak pala yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri adalah trimyristin dan asam miristat¹⁹. Beberapa konstituen yang terkandung dalam minyak pala seperti α -pinene, β -pinene, *p*-cymene, limonene, α -terpinene, α -terpinolene, *caryophyllene oxide* dan *camphene* telah dipelajari aktivitas antimikrobanya^{20,21}. Senyawa α -pinene dan β -pinene dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dengan mekanisme pengrusakan membrane sel oleh senyawa lipofilik tersebut²². Berdasarkan laporan hasil penelitian lainnya diketahui bahwa hidrokarbon monoterpen tipe pinene (α pinene dan β pinene) memiliki aktivitas antimikroba terhadap sejumlah mikroba^{20,23}. Hasil identifikasi senyawa fitokimia minyak biji pala yang digunakan dalam penelitian menunjukkan bahwa γ -terpinene merupakan senyawa dengan konsentrasi tertinggi, diikuti oleh *myristicin*, α -pinene, dan *terpinolene* (Tabel 4). Senyawa β -pinene tidak terdeteksi dalam analisis ini. Kandungan senyawa fitokimia ini tidak berubah selama proses nanoemulsifikasi. Akan tetapi konsentrasi jauh lebih kecil mengingat konsentrasi minyak biji pala yang diformulasikan dalam nanoemulsi tersebut juga kecil.

Smegistik dan atau antagonistik senyawa fitokimia dalam minyak esensial berpengaruh terhadap variasi efek antibakteri atau sensitivitas bakteri terhadap minyak esensial tersebut. Partikel nanoemulsi secara termodinamik didorong untuk berfusi dengan organisme yang mengandung lipid. Dorongan berfusi ini ditambah dengan adanya atraksi elektrostatis antara muatan kationik dari emulsi dan muatan anionik pada mikroba patogen. Ketika fusi nanopartikel dengan mikroba telah cukup. Mereka melepaskan sebagian energi yang terperangkap dalam emulsi. Kedua faktor, yaitu senyawa aktif dalam emulsi dan energi yang dilepaskan tersebut membuat membrane mikroba tidak stabil, sehingga terjadi lisis dan kematian sel¹.



Gambar 4. Zona hambat terhadap *E.coli* (a), *S.aureus* (b) dan *S.cerevisiae* (c) oleh minyak biji pala dan nanoemulsi minyak biji pala

Figure 4. Inhibition zone of *E.coli* (a), *S.aureus* (b) and *S.cerevisiae* by nutmeg oil and nutmeg oil nanoemulsion

Tabel 4. Hasil identifikasi senyawa fitokimia dalam minyak biji pala dan nanoemulsi minyak biji pala formula ¹²
 Table 4. Result of phytochemical substances identification of nutmeg oil and nutmeg oil nanoemulsion

No.	Senyawa	Konsentrasi dalam minyak biji pala (%)	Konsentrasi dalam nanoemulsi minyak biji pala formula 12 (%)
1.	α -pinene	7,17	0,997
2.	Camphene	0,3	0,021
3.	γ -terpinene	19,08	0,027
4.	Terpinolene	2,06	0,112
5.	Linalool	0,06	0,000
6.	α -terpineol	0,63	0,013
7.	Bornyl acetic ether	0,07	0,001
8.	Safrole	1,26	0,032
9.	Methyl eugenol	0,14	0,003
10.	Myristicin	7,33	0,078
11.	Asarone	0,15	0,002

KESIMPULAN

1. Proses nanoemulsi dengan formulasi yang berbeda dalam konsentrasi minyak, surfaktan dan jenis surfaktan yang berbeda menghasilkan nanoemulsi dengan ukuran partikel berkisar antara 104,80 nm hingga 161,15 nm.
2. Konsentrasi minyak pala dalam emulsi berpengaruh signifikan terhadap aktivitas antimikroba nanoemulsi.
3. Nanoemulsi minyak pala dengan formula emulsi konsentrasi minyak 5% dan jenis surfaktan tween 20 memiliki aktivitas antimikroba terendah dengan zona penghambatan kurang dari 9 mm.
4. Nanoemulsi minyak pala dengan konsentrasi minyak pala 10% dan 15% dengan jenis surfaktan tween 20 maupun tween 80 memiliki aktivitas antimikroba dengan zona penghambatan 9-12 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singh G, Mahimuthu P, De Heluani CS, Catalan C. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. J. Food Sci. 2005; 70: 141-148.
2. Piaru SP, Mahmud R, Perumal S. Determination of antibacterial activity of essential oil of *myristica fragrans* houtt. Using tetrazolium microplate assay and its cytotoxic activity against vero cell line. Intl J of Pharmacology. 2012; 8 (6):572-576.
3. Gupta C, Garg AR, Uniyal RC, Kumariz A. Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. African J of Microbiological Research. 2008; 2:258-261.
4. Matan N, Matan N. Biocontrol of *penicillium chrysogenum* using nutmeg oil and turmeric oil. Kmitl Sci. Tech. J. 2007; 7(2):192-196.
5. Kusumaningrum GS, Suranto, Setyaningsih R. Aktivitas penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji pala (*Myristica fragrans* Houtt dan *Myristica fatua* Houtt) terhadap pertumbuhan bakteri *xanthomonas campestris* oammel asal tanaman brokoli (*brassica oleracea* var. *italica*). Biofarmasi. 2003; 1(1): 20-24.
6. Praptosuwiryo T. Tantangan Pengembangan dan Fakta Jenis Tanaman Rempah. Bogor: Yayasan Prosea Indonesia. 2001.
7. McClements DJ. Food emulsions: Principle, practices and techniques (2nd ed). Boca Raton, Florida: CRC Press. 1999.
8. Cho Y, Kim C, Kim N, Park B. Some cases in applications of nanotechnology to food and agricultural systems. Biochip, J. 2008; 2 (3): 183-185.
9. Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugeunol encapsulated in surfactant micelles. Journal of Food Protection. 2005; 68(12): 2559-2566.
10. Paula C, Goncalo T, Ricardo L, Joana Silva D, Gibbs P, Ferreira JP. Antimicrobial effect of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. Intl J of Food Microbiology. 2007; 118:15-19.
11. Al-Adham ISI, Khalil E, Al-Hmoud ND, Kierans M, Collier PJ. Microemulsion are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. J of Applied Microbiology. 2000; 89:67-70.
12. Ferreira JP, Alves D, Neves O, Silva J, Gibbs PA, Teixeira PC. Effects of the components of two antimicrobial emulsion on food-borne pathogen. Food Control. 2010; 21:27-30.

13. Donsi F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. 2001.
14. Okeke MI, Iroegbu CU, Eze EN, Okoli AS, Esimone CO. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 78:119-127.
15. Qian C, McClements DJ. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids.* 2001; xxx: 1- 9.
16. Ahmed K, Li Y, Mc Clements DJ, Xiao H. Nanoemulsion and emulsion based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. *Food Chem.* 2012; 132:799-807.
17. Nanasombat S, Lohasupthawee P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *KMITL Sci. Tech. K.* 2005; 5(3) : 53-58.
18. Narasimhan B, Dhake AS. Antibacterial principles for *Myristica fragrans* seed. *J. Med. Food.* 2006; 9: 395–399.
19. Piaru SP, Mahmud R, Perumal S. Determination of antibacterial activity of essential oil *Myristica fragrans* Houtt using Tetrazolium microplate assay and its cytotoxic activity against vero cell line. *Intl J of Pharmacology.* 2012; 8 (6):572-576.
20. Sokmen AM, Gulluce HA, Akpulat D, Daferera B, Tepe M, Polissiou. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathullifolius*. *Food Contry.* 2004; 15:627-634.
21. Dorman HJD, Deans SJ. Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var *citriodora*, *Myristica fragrans*, *origanum vulgare* ssp, *Hirsulum*, *Pelarginum* species and *Thymus zygis* oils. *J. of Essential Oil Research.* 2004; 16:145-150.
22. Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG, Deans SG. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *J. Flavour Fragrance.* 2000; 15:12-16.

Hak cipta ©2014 Balai Besar Litbang Pascapasar
Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu
Jl. Tentara Pelajar no 12A, Cimanggu, Bogor, Jawa Barat 16013