

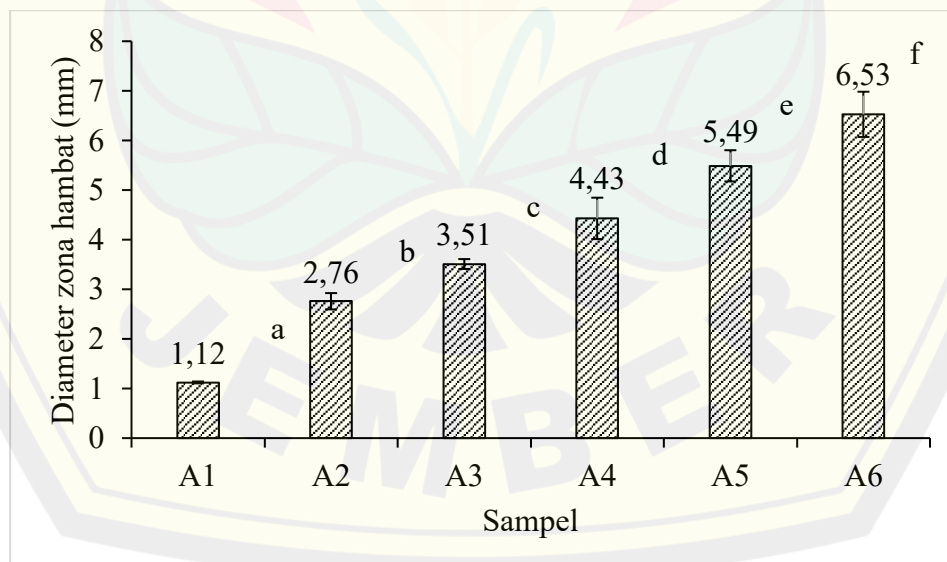
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas Antibakteri *Hard Candy* Pala Metode Difusi Agar terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*

Aktivitas zona hambat *hard candy* dengan penambahan minyak atsiri pala menggunakan metode difusi cakram. Pengujian ini terdiri dari 6 konsentrasi penambahan minyak atsiri pala yaitu 0%; 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; dan 2,5% yang menghasilkan zona hambat yang berbeda – beda dalam pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*. Hasil inkubasi kertas cakram dilihat dan diukur diameter zona bening di sekitar cakram sebagai nilai ada atau tidaknya senyawa antibakteri dalam menghambat organisme tertentu (Nuraina, 2015).

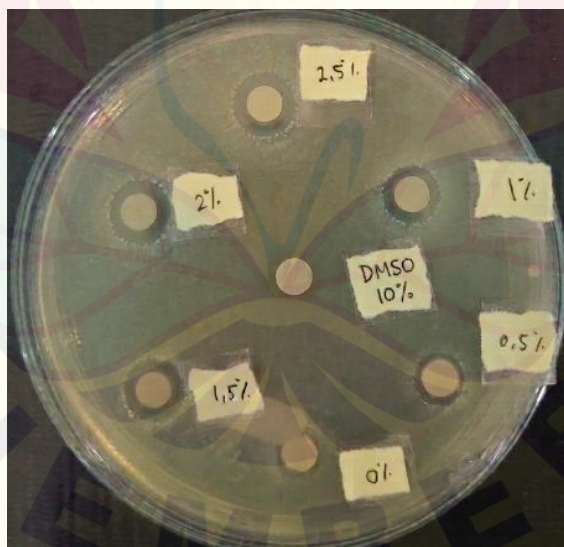
4.1.1 Aktivitas zona hambat permen *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*

Aktivitas zona hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* mengalami peningkatan luas diameter zona bening pada setiap kertas cakram yang diletakkan pada permukaan media. Hasil zona hambat *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* metode cakram dapat dilihat pada Gambar 4.1, Gambar 4.2, dan lampiran 4.1.



Gambar 4.1 Zona hambat *hard candy* pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan Gambar 4.1 diketahui zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada sampel A1; A2; A3; A4; A5; dan A6 berturut – turut sebesar 1,12 mm; 2,76 mm; 3,51 mm; 4,43 mm; 5,49 mm; dan 6,53 mm. Berdasarkan kriteria zona hambat dengan kategori lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (> 20 mm) (Ichwani, 2017). Sampel A1 hingga A4 termasuk kategori lemah dan sampel A5 hingga A6 termasuk kategori sedang, nilai yang diperoleh masih tergolong lemah hingga sedang. Hasil pengujian ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan nilai signifikan sebesar 0,05 menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi minyak atsiri pala memberikan pengaruh nyata terhadap diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Lampiran 4.1). Semakin besar diameter zona hambat yang dihasilkan maka semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan ke dalam *hard candy*. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa bioaktif pada minyak atsiri pala yang berdifusi ke media agar sehingga menghasilkan zona hambat yang lebih besar. Hasil diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* berdasarkan perbedaan konsentrasi minyak atsiri pala pada *hard candy* dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Zona hambat *hard candy* minyak atsiri pala *Streptococcus mutans*

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan peningkatan diameter zona hambat bakteri *Streptococcus mutans*, dimana ketika *hard candy* pala berkontak langsung dengan media uji, matriks sukrosa dan sirup glukosa mulai melarut dan melepaskan senyawa bioaktif, seperti *eugenol*, *myristicin*, β -*myrcene*, dan α -*pinene* yang berdifusi

secara bertahap kedalam media agar (Ashokkumar *et al.*, 2022). Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan, semakin banyak senyawa aktif yang dapat berdifusi menuju sel bakteri sehingga aktivitas penghambatan semakin meningkat. Namun, pelepasan senyawa aktif dari *hard candy* berlangsung lebih lambat dibandingkan minyak atsiri murni karena sebagian senyawa masih terperangkap di dalam matriks sukrosa dan sirup glukosa yang membentuk struktur *amorf*. Akibatnya, hanya sebagian senyawa aktif yang mampu berdifusi ke media agar selama pengujian difusi cakram, sehingga diameter zona hambat yang dihasilkan masih tergolong lemah hingga sedang (Flores dan Kong, 2017).

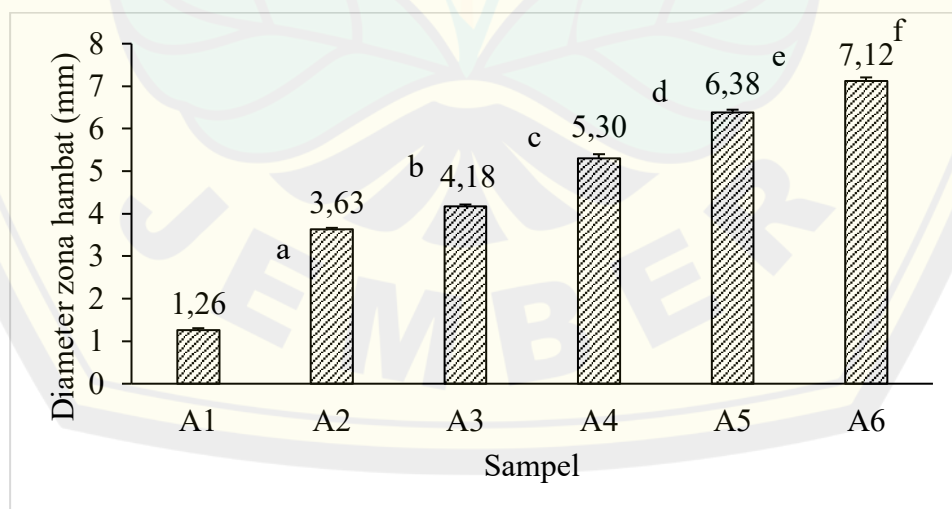
Bakteri *Streptococcus mutans* memiliki tiga faktor utama penyebab karies, yaitu kemampuan membentuk biofilm melalui sintesis glukukan dari sukrosa, kemampuan menghasilkan asam dari metabolisme karbohidrat (asidogenisitas), serta kemampuan bertahan hidup pada kondisi asam (asidurisitas) (Lemos *et al.*, 2019). Diantara senyawa aktif minyak atsiri pala, senyawa *eugenol* berperan dalam menghambat aktivitas enzim glukosiltransferase, sehingga pembentukan glukukan sebagai penyusun utama matriks biofilm berkurang. Akibatnya, kemampuan bakteri melekat pada permukaan gigi, membentuk biofilm, dan beragregasi menjadi menurun (Frengki *et al.*, 2019). Selain itu, senyawa *terpenoid* seperti α -pinene, dan β -myrcene serta senyawa *fenolik* seperti *eugenol* bersifat hidrofobik sehingga mampu menembus membran sel bakteri gram positif. Senyawa-senyawa tersebut berinteraksi dengan lapisan fosfolipid membran sitoplasma dan meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi kebocoran ion, protein, lipid, dan metabolit penting dari dalam sel. Kondisi ini mengganggu proses metabolisme sehingga menyebabkan membran kehilangan integritasnya dan akhirnya sel bakteri mengalami lisis atau kematian (Cui *et al.*, 2015). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Belgis *et al.*, (2021) pada penambahan minyak atsiri kencur pada *hard candy* dengan konsentrasi 1% menghasilkan zona hambat 5,44 mm pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dan 5,56 mm pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pelarut DMSO sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, yang menandakan bahwa DMSO tidak memiliki aktivitas antibakteri (Octaviani, *et al.*, 2019). Konsentrasi minyak atsiri pala

0% pada sampel A1 menunjukkan nilai zona hambat 1,12 mm. Hal ini disebabkan oleh kandungan sukrosa dan glukosa yang dominan pada formulasi *hard candy* yang dapat menurunkan nilai *Aw*. Penurunan nilai *Aw* disebabkan karena gula memiliki kemampuan mengikat air, sehingga semakin banyak gula yang ditambahkan maka semakin banyak air yang diikat dan aktivitas air semakin rendah (Plotnikova *et al.*, 2021). Produk *hard candy* dengan penambahan sukrosa 97,96% menunjukkan nilai *Aw hard candy* murni sebesar 0,80, yaitu dibawah ambang batas minimum pertumbuhan bakteri gram positif (Ozel *et al.*, 2024). Menurut Moral *et al.*, (2017) bakteri gram positif umumnya terhambat pada nilai *Aw* di bawah 0,86. Penurunan *Aw* hingga di bawah batas minimum pertumbuhan bakteri membuat bakteri tersebut mengalami penciutan atau *plasmolysis* sitoplasma, sehingga volume sel akan menyusut dan merusak membran *plasma* dan mengganggu fungsi fisiologis bakteri termasuk transportasi nutrisi dan pengeluaran metabolit (Lang *et al.*, 2018).

4.1.2 Aktivitas zona hambat permen *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*

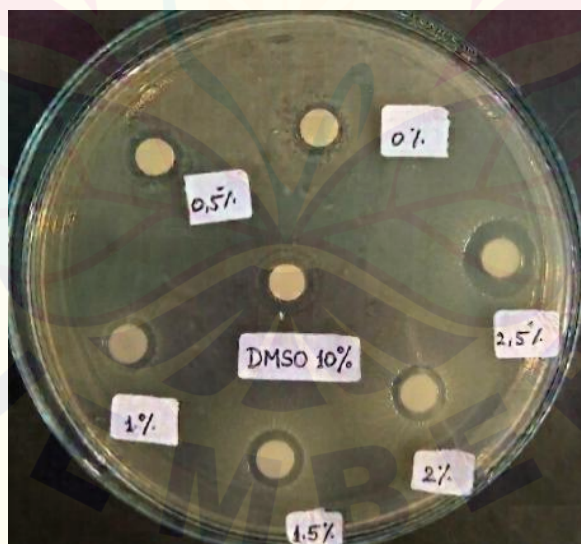
Aktivitas zona hambat terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* mengalami peningkatan luas diameter zona bening pada setiap konsentrasi minyak atsiri pala pada kertas cakram yang diletakkan pada permukaan media. Hasil zona hambat *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* metode cakram dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4, dan lampiran 4.2.



Gambar 4.3 Zona hambat *hard candy* pala terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan Gambar 4.3 diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan minyak atsiri pala, maka zona hambat semakin besar. Zona hambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* A1; A2; A3; A4; A5; dan A6 berturut – turut sebesar 1,26 mm; 3,63 mm; 4,18 mm; 5,30 mm; 6,38 mm; dan 7,12 mm. Kriteria zona hambat dengan kategori lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (> 20 mm) (Ichwani, 2017). Sampel A1 hingga A3 termasuk kategori zona hambat lemah dan sampel A4 hingga A6 termasuk kategori zona hambat sedang.

Pengujian ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan nilai signifikan sebesar 0,05 menunjukkan bahwa perbedaan penambahan konsentrasi minyak atsiri pala memberikan pengaruh nyata terhadap diameter zona hambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* (Lampiran 4.2). Semakin besar diameter zona hambat yang dihasilkan maka semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan ke dalam *hard candy*. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa bioaktif pada minyak atsiri pala akan berdifusi ke media agar, sehingga menghasilkan zona hambat yang lebih besar. Hasil diameter zona hambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* berdasarkan perbedaan konsentrasi minyak atsiri pala pada *hard candy* dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Zona hambat *hard candy* minyak atsiri pala pada *Enterococcus faecalis*

Berdasarkan Gambar 4.4 pada peningkatan aktivitas antibakteri zona hambat, berkaitan dengan semakin banyak nya senyawa bioaktif minyak atsiri pala yang dilepaskan dari *hard candy*. Ketika *hard candy* mulai larut, matriks sukrosa dan sirup

glukosa melepaskan senyawa aktif minyak atsiri pala. Minyak atsiri pala mengandung beberapa komponen utama seperti α -pinene, *eugenol*, *myristisin*, dan β -myrcene yang memiliki sifat hidrofobik dan dapat menyerap kedalam lapisan lemak membran sel bakteri. Penyerapan tersebut merusak dinding sel pertahanan bakteri dan memicu kebocoran komponen intraseluler, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Ashokkumar *et al.*, 2022).

Senyawa bioaktif minyak atsiri pala seperti α -pinene, dan β -myrcene serta senyawa fenolik seperti *eugenol* bersifat hidrofobik sehingga mampu menembus membran sel bakteri gram positif. Senyawa-senyawa tersebut berinteraksi dengan lapisan fosfolipid membran sitoplasma sehingga meningkatkan permeabilitas membran dan terjadi kebocoran ion, protein, lipid, serta metabolit penting dari dalam sel. Kondisi ini mengganggu proses metabolisme sehingga menyebabkan membran kehilangan integritasnya dan akhirnya sel bakteri mengalami lisis atau kematian (Cui *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, diameter zona hambat *Enterococcus faecalis* sedikit lebih besar dibandingkan dengan *Streptococcus mutans*. Perbedaan ini diduga karena karakteristik matriks ekstraseluler atau biofilm masing-masing bakteri. *Streptococcus mutans* membentuk biofilm yang kaya akan glukosa tidak larut, menghasilkan struktur matriks yang lebih padat sehingga menghambat penetrasi senyawa aktif minyak atsiri menuju membran sel. Sebaliknya, matriks biofilm *Enterococcus faecalis* tidak didominasi oleh glukosa, yang memungkinkan senyawa aktif berdifusi lebih mudah ke dalam sel dan menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan *Streptococcus mutans*.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Belgis *et al.*, (2022) yang menyatakan bahwa penambahan minyak atsiri kemangi sebesar 0,4% pada *soft candy* sudah cukup untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Selain kandungan senyawa yang terkandung pada minyak atsiri pala, cara mengonsumsi *hard candy* juga dapat membantu proses penghambatan bakteri pada rongga mulut. *Hard candy* yang dikonsumsi secara perlahan di dalam rongga mulut dapat membantu proses pelepasan senyawa aktif yang terkandung di dalam permen, sehingga senyawa aktif tersebut akan berkontak langsung dengan bakteri yang ada di rongga mulut (Tajudin *et al.*, 2022).

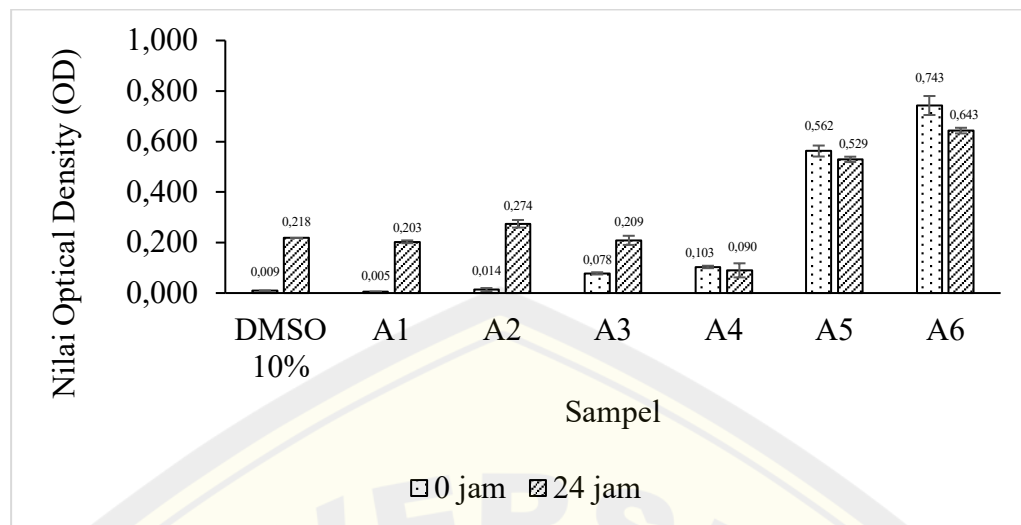
4.2 Aktivitas Antibakteri *Hard Candy* Pala Metode Dilusi Cair terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*

Aktivitas zona hambat *hard candy* dengan penambahan minyak atsiri pala menggunakan metode dilusi cair menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda – berbeda dalam pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*. Pengujian ini terdiri dari 6 formulasi dengan penambahan konsentrasi minyak atsiri yang berbeda yaitu 0% ; 0,5% ; 1% ; 1,5% ; 2% ; 2,5% dan DMSO 10% yang digunakan sebagai kontrol negatif. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari pertumbuhan bakteri tanpa pengaruh bahan uji (Bhavikatti *et al.*, 2024).

Metode dilusi cair pada bakteri *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis* menggunakan metode dilusi cair dengan mengukur nilai *optical density* (OD) dan melihat perbedaan tingkat kekeruhan sebelum dan sesudah 24 jam sampel pada masa inkubasi. Pengukuran *optical density* (OD) dilakukan secara *spektrofotometri* untuk mengukur tingkat kekeruhan sampel sebagai indikator tumbuh atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri setelah masa inkubasi (Mira *et al.*, 2022).

4.2.1 Aktivitas antibakteri *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*

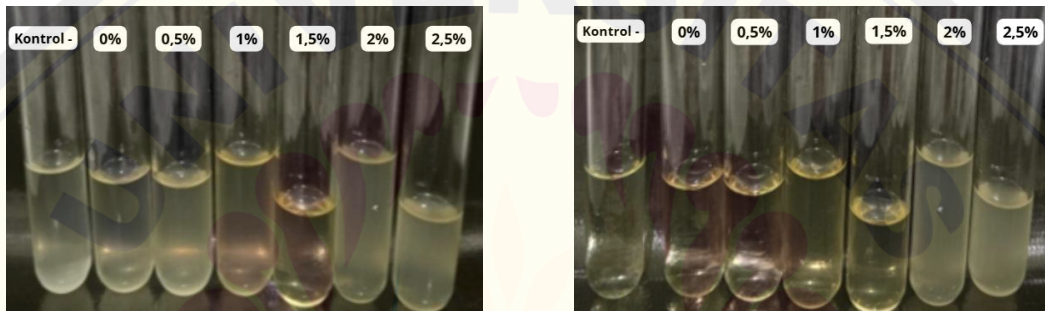
Aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* mengalami penurunan dan peningkatan nilai *optical density* (OD) dari ke enam sampel *hard candy* (A1-A6) setelah inkubasi 0 jam dan 24 jam. Hasil aktivitas antibakteri *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* metode dilusi cair dapat dilihat pada Gambar 4.5, Gambar 4.6 dan lampiran 4.3.



Gambar 4.5 Hasil uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Streptococcus mutans*. Nilai *optical density* (OD) pada masing – masing sampel (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan nilai *optical density* (OD) DMSO 10% pada 0 jam sebesar 0.009 dan 24 jam sebesar 0,218, yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada media tanpa perlakuan. Sampel A1 hingga A3 (konsentrasi rendah) mengalami peningkatan nilai *optical density* (OD) dari 0 jam ke 24 jam, berturut – turut menjadi 0,203; 0,274; dan 0,209, yang menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri karena konsentrasi senyawa antibakteri belum cukup untuk menghambat pertumbuhan secara optimal. Sebaliknya, sampel A4 hingga A6 mengalami penurunan *optical density* (OD) setelah inkubasi 24 jam, dengan nilai *optical density* (OD) berturut – turut sebesar 0,090; 0,529; dan 0,643, yang mengidentifikasi adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Nilai *optical density* (OD) menunjukkan tingkat kekeruhan media yang mencerminkan jumlah bakteri yang tumbuh. Semakin rendah nilai *optical density* (OD), semakin sedikit pertumbuhan bakteri. Penurunan nilai *optical density* (OD) pada perlakuan minyak atsiri pala menunjukkan bahwa senyawa hidrofobik, seperti monoterpen dan terpenoid, mampu merusak membran sel bakteri dengan meningkatkan permeabilitasnya. Akibatnya, terjadi kebocoran komponen sel, gangguan respirasi, dan terhambatnya pertumbuhan bakteri sehingga nilai absorbansi setelah inkubasi menjadi lebih rendah (Maurya *et al.*, 2021).

Semakin rendah nilai *optical density* (OD) sampel setelah inkubasi maka semakin besar kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga konsentrasi minyak atsiri pala yang lebih tinggi terbukti menghasilkan daya hambat yang lebih besar (Rollando *et al.*, 2019). Menurut penelitian Assauqi *et al* (2023) yang menyatakan apabila nilai absorbansi setelah inkubasi lebih tinggi dari nilai sebelum inkubasi maka bakteri tersebut masih tumbuh. Akan tetapi sebaliknya, apabila tidak terjadi perubahan nilai antara absorbansi sebelum dengan sesudah inkubasi atau nilai absorbansi setelah inkubasi lebih kecil dari nilai absorbansi sebelum inkubasi maka perkembangan bakteri terhambat. Hasil pengamatan visual uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Streptococcus mutans* dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Hasil uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Streptococcus mutans* pada masing-masing sampel (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan pengamatan secara visual pada 0 jam, seluruh konsentrasi sampel menunjukkan warna larutan yang relatif jernih hingga sedikit keruh karena bakteri belum mengalami pertumbuhan yang signifikan. Menurut Tiepo *et al* (2023), bakteri *Streptococcus mutans* yang tumbuh dalam media BHI broth pada suhu 37 °C akan mengalami fase lag selama 2-4 jam pertama sebelum memasuki fase pertumbuhan, sehingga perbedaan kekeruhan antar konsentrasi pada 0 jam lebih dominan dipengaruhi oleh karakteristik fisik sampel. Penambahan minyak atsiri pala yang bersifat hidrofobik dapat meningkatkan kekeruhan karena senyawa tersebut sulit terdispersi secara sempurna ke dalam media cair (Kaltschmidt *et al.*, 2017)

Pengamatan visual pada 0 jam digunakan sebagai acuan awal untuk membandingkan dengan kondisi setelah inkubasi. Menurut Zhang *et al.*, (2017) yang menyatakan bahwa pengukuran *optical density* (OD) awal digunakan sebagai nilai dasar (*baseline*) dalam menentukan perubahan pertumbuhan bakteri setelah proses

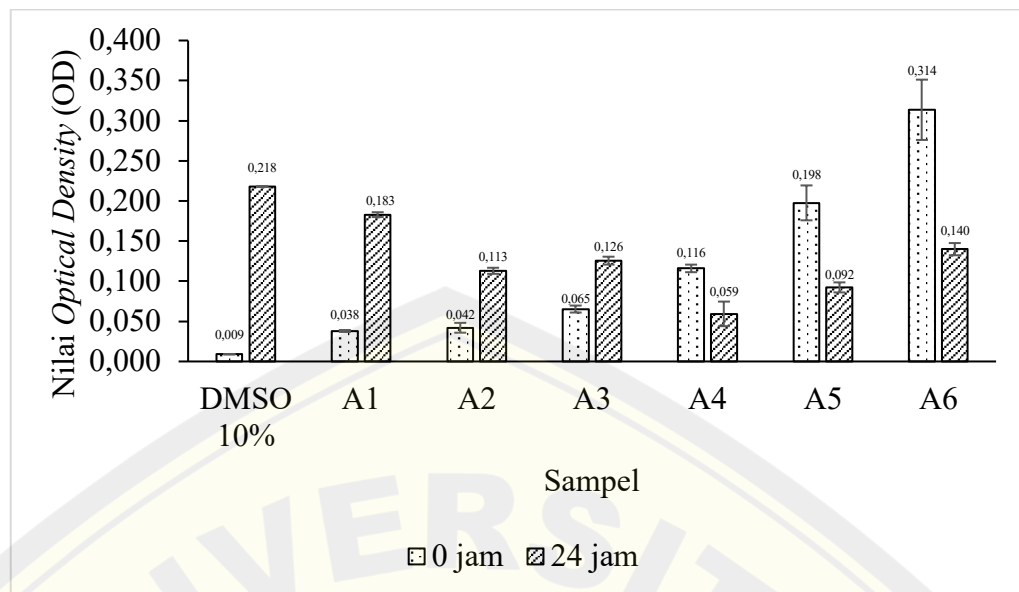
inkubasi. Setelah inkubasi 24 jam, sampel A1 hingga A3 menunjukkan peningkatan kekeruhan yang lebih jelas, sedangkan sampel A4 hingga A6 menunjukkan peningkatan perubahan warna menjadi tidak terlalu keruh. Hasil pengamatan visual ini sejalan dengan nilai *optical density* (OD), yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala maka pertumbuhan *Streptococcus mutans* semakin terhambat.

Aktivitas antibakteri dapat terjadi karena adanya pelepasan senyawa bioaktif seperti *eugenol*, *myristicin*, β -*myrcene*, dan α -*pinene* dari matriks *hard candy* selama proses pelarutan. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan, semakin banyak senyawa aktif yang dilepaskan sehingga jumlah senyawa yang berdifusi menuju sel bakteri juga meningkat. (Ashokkumar *et al.* , 2022).

Senyawa – senyawa bioaktif tersebut bekerja melalui dua mekanisme utama. Pertama, *eugenol* menghambat aktivitas enzim glukosiltransferase yang berperan dalam pembentukan glukosa sebagai penyusun utama biofilm *Streptococcus mutans*. Akibatnya, kemampuan bakteri untuk melekat pada permukaan dan membentuk biofilm menjadi berkurang (Frengki *et al.*, 2019). Kedua, senyawa *terpenoid* dan *fenolik* yang bersifat hidrofobik berinteraksi dengan lapisan fosfolipid membran sel sehingga meningkatkan permeabilitas membran. Kondisi ini menyebabkan kebocoran ion, protein, lipid, dan komponen intraseluler lainnya yang mengganggu metabolisme sel hingga menyebabkan lisis atau kematian bakteri (Cui *et al.*, 2015). Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan ke dalam *hard candy*, semakin besar kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, yang ditunjukkan oleh semakin rendahnya nilai *optical density* setelah inkubasi 24 jam.

4.2.2 Aktivitas antibakteri *Hard Candy* pala terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*

Aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* mengalami penurunan dan peningkatan nilai *optical density* (OD) dari enam sampel *hard candy* (A1-A6) setelah inkubasi 0 jam dan 24 jam. Hasil aktivitas antibakteri *hard candy* minyak atsiri pala terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* metode dilusi cair dapat dilihat pada Gambar 4.7, Gambar 4.8 dan lampiran 4.3.

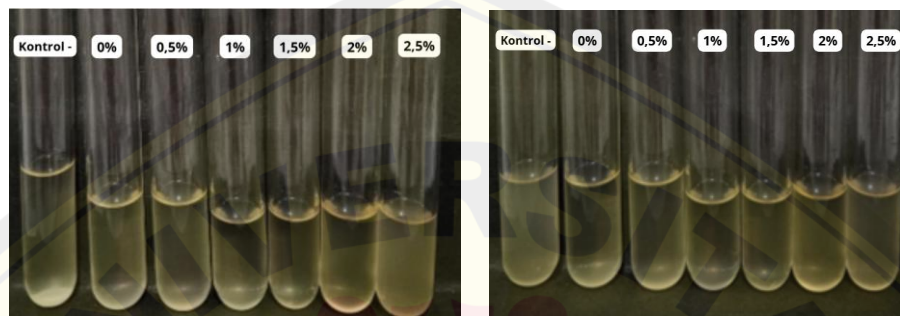


Gambar 4.7 Hasil uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Enterococcus faecalis*. Nilai *optical density* (OD) pada perlakuan (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan nilai *optical density* (OD) DMSO 10% pada 0 jam sebesar 0,009 dan 24 jam sebesar 0,218, yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media tanpa perlakuan. Sampel A1 hingga A3 (konsentrasi rendah) mengalami peningkatan nilai *optical density* (OD) dari 0 jam ke 24 jam, berturut – turut menjadi 0,183; 0,113; dan 0,126, yang menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri karena konsentrasi senyawa antibakteri belum cukup untuk menghambat pertumbuhan secara optimal. Sebaliknya, sampel A4 hingga A6 mengalami penurunan *optical density* (OD) setelah inkubasi 24 jam, dengan nilai *optical density* (OD) berturut – turut sebesar 0,059; 0,092; dan 0,140, yang mengidentifikasi adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

Sebagaimana pada bakteri *Streptococcus mutans*, peningkatan nilai *optical density* (OD) 0 jam tidak secara langsung menunjukkan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* melainkan dipengaruhi oleh sifat hidrofobik minyak atsiri yang sulit terdispersi secara homogen serta peningkatan viskositas dan konsentrasi larutan akibat penambahan gula yang memengaruhi pembiasan cahaya pada pembacaan absorbansi. Menurut Bubonja-Sonje *et al.*, (2020) penambahan minyak atsiri dapat

meningkatkan kekeruhan karena minyak atsiri memiliki sifat hidrofobik sehingga sulit terdispersi secara sempurna. Sedangkan gula dapat meningkatkan viskositas dan lebih pekat sehingga cahaya lebih lambat dibiaskan, sehingga dapat mempengaruhi dan meningkatkan nilai absorbansi awal (0 jam) (Stevenso *et al.*, 2016). Hasil pengamatan visual uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Streptococcus mutans* dapat dilihat pada Gambar 4.8



Gambar 4.8 Hasil uji MIC 0 jam dan 24 jam pada bakteri *Enterococcus faecalis* pada masing – masing sampel (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Berdasarkan gambar 4.9 menunjukkan seluruh perlakuan memiliki warna larutan yang relatif jernih hingga sedikit keruh setelah penambahan suspensi *Enterococcus faecalis* dan sampel uji. Pada pengamatan 0 jam belum terlihat adanya perbedaan tingkat kekeruhan antara konsentrasi sampel, karena bakteri belum menunjukkan pertumbuhan yang signifikan. Penambahan minyak atsiri pala yang bersifat hidrofobik dapat meningkatkan kekeruhan karena senyawa tersebut sulit terdispersi secara sempurna ke dalam media (Kaltschmidt *et al.*, 2017). Selain itu, semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan, larutan cenderung tampak lebih keruh sehingga menghasilkan nilai *optical density* (OD) awal yang lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan prinsip pengukuran absorbansi menggunakan *spektrofotometer* atau *microplate reader* pada panjang gelombang 600 nm, di mana semakin pekat atau keruh suatu larutan maka semakin besar nilai absorbansi yang terbaca (Mauerhofer *et al.*, 2019).

Setelah inkubasi selama 24 jam, mekanisme penghambatan minyak atsiri pala terhadap *Enterococcus faecalis* berlangsung lebih efektif karena seluruh senyawa bioaktif berada dalam media cair sehingga dapat berkontak langsung dengan sel bakteri tanpa dipengaruhi oleh proses difusi pada media agar. Ketika *hard candy* mulai

larut, senyawa aktif seperti *eugenol*, *myristicin*, α -*pinene*, dan β -*myrcene* dilepaskan secara bertahap dari matriks sukrosa dan sirup glukosa ke dalam media. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan, semakin banyak senyawa bioaktif yang tersedia untuk berinteraksi dengan sel bakteri (Ashokkumar *et al.*, 2022). Senyawa-senyawa tersebut bersifat hidrofobik sehingga dapat berpartisipasi ke dalam lapisan fosfolipid membran sitoplasma *Enterococcus faecalis*, menyebabkan peningkatan permeabilitas membran yang diikuti oleh kebocoran ion, protein, lipid, dan komponen intraseluler lainnya. Kerusakan membran tersebut mengganggu keseimbangan osmotik, menghambat metabolisme sel serta sintesis asam nukleat, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan sebagian sel mengalami kematian (Cui *et al.*, 2015).

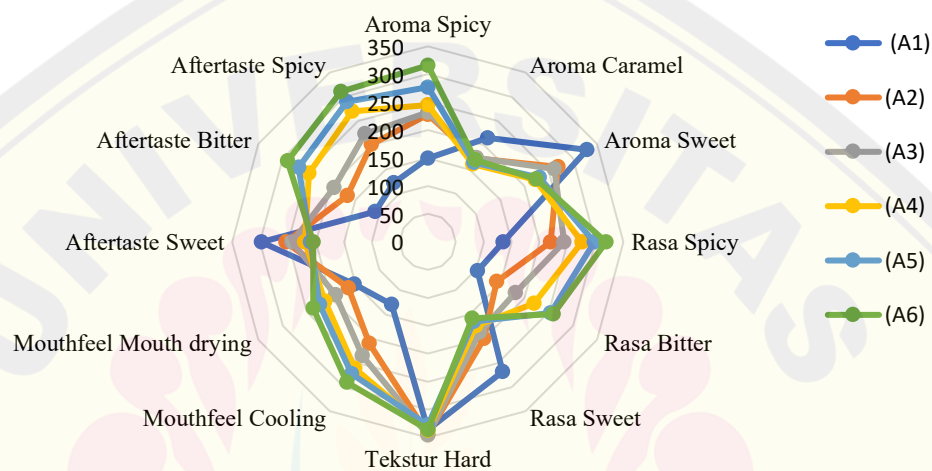
Meskipun *Enterococcus faecalis* memiliki ketahanan intrinsik terhadap berbagai agen antibakteri, mekanisme kerja minyak atsiri pala yang secara langsung berinteraksi dengan membran sel tetap mampu menghambat pertumbuhannya. Mekanisme ini sejalan dengan hasil pengukuran OD setelah inkubasi 24 jam, di mana perlakuan A4 hingga A6 menghasilkan nilai OD yang lebih rendah dibandingkan perlakuan A1 hingga A3. Penurunan nilai OD menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri yang tumbuh semakin sedikit akibat meningkatnya aktivitas antibakteri minyak atsiri pala. Dengan demikian, semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan ke dalam hard candy, semakin banyak senyawa bioaktif yang dilepaskan sehingga kemampuan menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* juga semakin besar.

4.3 Organoleptik *Hard Candy* Pala

4.3.1 RATA

Uji deskriptif memiliki beberapa metode salah satunya yaitu metode RATA (*Rate-All-that-Apply*). Metode RATA (*Rate-All-that-Apply*) merupakan suatu metode kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui persepsi konsumen dalam menentukan karakteristik suatu produk (Kim *et al.*, 2020). Melalui karakteristik tersebut dapat diketahui perbedaan antara sampel yang diujikan secara objektif. Penentuan atribut sensori pada metode RATA dilakukan melalui *Focus Group Discussion* (FGD). *Focus Group Discussion* (FGD) pada *hard candy* minyak atsiri pala yaitu dengan cara

berdiskusi sebanyak 8 orang. Atribut sensori yang dihasilkan *Focus Group Discussion* (FGD) terdiri dari aroma *caramel*, aroma *sweet*, aroma *spicy*, rasa *sweet*, rasa getir, rasa *spicy*, rasa *bitter*, rasa *caramel*, tekstur *hard*, *mouth feel colling*, *mouth feel mouth drying*, *after taste sweet*, *after taste bitter*, *after taste spicy*, *after taste* getir. Berikut merupakan *sprider web hard candy* minyak atsiri pala yang ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 *Sprider web hard candy* dengan penambahan konsentrasi minyak atsiri pala pada masing – masing sampel (A1 (0%); A2 (0,5%); A3 (1%); A4 (1,5%); A5 (2%) dan A6 (2,5%)).

Hasil analisis sensori RATA pada Gambar 4.9 menunjukkan bahwa *hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A1 memiliki karakteristik aroma *sweet*, intensitas rasa *caramel*, tekstur *hard*, *mouthfeel mouth drying*, dan *aftertaste sweet*. *Hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A2 memiliki karakteristik aroma *sweet*, intensitas rasa *spicy*, tekstur *hard*, *mouthfeel colling*, dan *aftertaste sweet*. *Hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A3 memiliki karakteristik aroma *sweet*, intensitas rasa *spicy*, tekstur *hard*, *mouthfeel colling*, dan *aftertaste sweet*. *Hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A4 memiliki karakteristik aroma *spicy*, intensitas rasa *spicy*, tekstur *hard*, *mouthfeel colling*, dan *aftertaste spicy*. *Hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A5 memiliki karakteristik aroma *spicy*, intensitas rasa *spicy*, tekstur *hard*, *mouthfeel colling*, dan *aftertaste spicy*. *Hard candy* minyak atsiri pala perlakuan A6 memiliki karakteristik

aroma *spicy*, intensitas rasa *spicy*, tekstur *hard*, *mouthfeel colling*, dan *aftertaste spicy* (Lampiran 4.4). Berdasarkan hasil pengujian sensori tersebut diketahui bahwa keenam sampel perlakuan *hard cady* pala memiliki beberapa atribut sensori yang sama yaitu, atribut tekstur yang *hard*. Hal ini terjadi karena penggunaan jenis dan jumlah bahan serta proses pembuatan produk yang sama. Menurut Maryati *et al.*, (2023) produk *hard candy* minyak atsiri pala memiliki karakteristik keras atau *hard* dan tidak mudah lengket saat proses penyimpanan pada produk *hard candy* buah pala.

Sampel A1 (tanpa penambahan minyak atsiri pala) memiliki aroma *sweet* yang lebih dominan dibanding atribut sensori aroma yang lain dan juga tidak menimbulkan rasa *aftertaste*. Hasil ini dapat disebabkan oleh tidak adanya penambahan minyak atsiri pala dalam pembuatan produk sehingga atribut sensori yang dimiliki hanya timbul dari penggunaan gula sebagai bahan utama produk *hard candy*. Pada perlakuan A2 dan A3 dengan penambahan masing – masing 0,5% dan 1% minyak atsiri pala memiliki karakteristik sensori aroma *sweet* yang masih dominan dibandingkan atribut aroma yang lain. Hal ini terjadi karena konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan tidak terlalu banyak dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Pada perlakuan A4, A5, dan A6 dengan penambahan masing – masing 1,5% ; 2% ; 2,5% minyak atsiri pala memiliki karakteristik sensori aroma *spicy* yang lebih dominan dibandingkan atribut aroma yang lain. Hal ini terjadi karena konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan semakin tinggi, sehingga menimbulkan rasa *spicy* dan sensasi *cooling* serta *aftertaste spicy* setelah *hard candy* dikonsumsi.

Peningkatan atribut aroma *spicy* pada perlakuan dengan konsentrasi minyak atsiri lebih tinggi diduga berasal dari meningkatnya kandungan senyawa volatil golongan *monoterpena* dan *fenilpropanoid* seperti *α-pinene*, *limonene*, *myristicin*, *eugenol*, dan *terpinolen*. *α-pinene* memberikan aroma *woody-pine*, *limonene* memberikan aroma citrus segar, sedangkan *myristicin* dan *eugenol* memberikan aroma rempah hangat (*warm spicy*) yang menjadi karakteristik khas pala (Ashokkumar *et al.*, 2022). Oleh karena itu semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri yang ditambahkan maka intensitas aroma *spicy* semakin mudah dikenali oleh panelis. Sehingga hasil uji RATA pada aroma *spicy* lebih tinggi pada konsentrasi penambahan minyak atsiri pala yang lebih tinggi. Menurut Maryati *et al.*, (2023) minyak atsiri pala memiliki senyawa

volatil yang dapat peningkatan aroma *spicy* pada produk. Senyawa volatil yang terkandung di dalam pala yaitu seperti *α -pinene*, dan *myristicin* yang dapat memberikan karakteristik aroma khas rempah pala pada produk *hard candy*.

4.3.2 Uji Hedonik (kesukaan)

Uji hedonik merupakan metode pengujian sensori yang bertujuan untuk mengetahui tingkat penerimaan konsumen terhadap suatu produk berdasarkan respon subjektif. Respon tersebut menggambarkan tingkat kesukaan konsumen terhadap suatu produk. Penilaian uji hedonik dilakukan terhadap setiap sampel tanpa membandingkan dengan sampel lain. Skala yang digunakan dalam uji rating hedonik adalah lima poin skala, tujuh poin skala, atau sembilan poin skala. Penilaian dilakukan konsumen terhadap sampel tanpa perlu membandingkan dengan sampel lain. Data dari uji rating hedonik dapat dianggap sebagai data interval dengan asumsi interval setiap poin sama (Civille *et al.*, 2016).

a. Aroma

Aroma merupakan atribut sensori yang dapat menentukan penerimaan konsumen terhadap suatu produk, baik produk pangan maupun non-pangan (Pu *et al.*, 2021). Aroma suatu produk dapat dideteksi oleh indra penciuman konsumen dalam memberikan respon menerima atau menolak suatu produk (Gou *et.al.*, 2023). Aroma yang segar dan tidak terlalu tajam cenderung meningkatkan preferensi konsumen dibandingkan aroma yang terlalu kuat atau kurang familiar yang dapat menurunkan tingkat penerimaan organoleptik (Maryati *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil uji *chi-square* pada sampel *hard candy*, penambahan minyak atsiri pala tidak terlalu berpengaruh nyata terhadap tingkat kesukaan aroma ($p>0,05$) (Lampiran 4.5).

Tabel 4.1 Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap aroma *hard candy* minyak atsiri pala

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Sangat suka	11,3	5,0	6,3	6,3	6,3	6,3
Suka	16,3	15,0	22,5	22,5	25,0	20,0
Agak suka	20,0	25,0	22,5	25,0	20,0	15,0
Netral	21,3	18,8	21,3	15,0	12,5	16,3

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Agak tidak suka	13,8	22,5	16,3	18,8	16,3	10,0
Tidak Suka	11,3	12,5	10,0	11,3	16,3	21,3
Sangat tidak suka	6,3	1,3	1,3	1,3	3,8	11,3
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% agak suka – sangat suka	47,5	45,0	51,3	53,8	51,3	41,3

Persentase tingkat penerimaan aroma dilakukan melalui uji hedonik, di mana panelis memberikan nilai skala berdasarkan preferensi pribadi masing – masing (Andersen *et al.*, 2019). Berdasarkan tabel 4.2 dapat diketahui persentase tingkat penerimaan panelis terhadap aroma (agak suka – sangat suka) dalam berbagai perlakuan konsentrasi minyak atsiri pala.

Sampel dengan konsentrasi 1,5% (A4) memiliki tingkat penerimaan tertinggi yaitu sebesar 57,5% dan sampel dengan konsentrasi 2,5% (A6) memiliki tingkat penerimaan terendah sebesar 41,3%. Hal ini menunjukkan bahwa sampel dengan konsentrasi minyak atsiri pala paling tinggi memiliki nilai penerimaan terendah, sedangkan sampel dengan konsentrasi sedang memiliki nilai penerimaan tertinggi. Hal ini menunjukkan pola inverted U (huruf U terbalik). Hal ini sejalan dengan penelitian Maryati *et al.*, (2023) yang menyatakan penambahan minyak atsiri biji pala pada produk *hard candy* memberikan skor aroma tertinggi pada konsentrasi menengah 2% (skor 6,30) dan jauh lebih disukai daripada konsentrasi rendah dan tinggi. Hal ini terjadi karena minyak atsiri pala memiliki profil aromatik yang sangat kuat dan kompleks seperti, *myristicin* dan *terpineol* (Vazquez-Fresno *et al.*, 2019). Tingginya konsentrasi senyawa seperti *myristicin* dan *terpinene* cenderung menghasilkan aroma yang sangat tajam dan menyengat sehingga kurang diminati oleh panelis (Sudradjat *et al.*, 2018).

b. Rasa

Rasa merupakan parameter organoleptik yang dapat menentukan tingkat penerimaan konsumen terhadap produk pangan, termasuk pada produk *hard candy*

(Layuk *et al.*, 2023). Minyak atsiri pala (*Myristica fragrans*) digunakan dalam industri permen sebagai bahan penambah cita rasa (*flavor*) karena memiliki karakteristik aromatik yang khas (Saeed *et al.*, 2024). Berdasarkan hasil uji *chi-square*, penambahan minyak atsiri pala berpengaruh nyata terhadap tingkat kesukaan rasa *hard candy* ($p < 0,05$) (Lampiran 4.6). Signifikansi ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi yang diberikan, berpengaruh nyata terhadap rasa yang dirasakan oleh panelis. Hal ini sejalan dengan Maryati *et al.*, (2023) yang menyatakan bahwa penambahan minyak atsiri berpengaruh nyata terhadap tingkat kesukaan rasa pada *hard candy*. Hasil persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa *hard candy* pala dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa *hard candy* minyak atsiri pala

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Sangat suka	22,5	6,3	11,3	7,5	5,0	3,8
Suka	22,5	28,8	18,8	13,8	15,0	13,8
Agak suka	10,0	22,5	21,3	23,8	18,8	15,0
Netral	23,8	12,5	20,0	15,0	8,8	12,5
Agak tidak suka	6,3	21,3	20,0	21,3	26,3	20,0
Tidak Suka	13,8	8,8	8,8	15,0	15,0	17,5
Sangat tidak suka	1,3	0,0	0,0	3,8	11,3	17,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% agak suka – sangat suka	55,0	57,5	51,3	45,0	38,8	32,5

Persentase tingkat penerimaan rasa pada tabel 4.3 menunjukkan persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa (agak suka – sangat suka) dalam berbagai perlakuan konsentrasi, dengan rentang persentase antara 32,5% hingga 57,5%. Sampel dengan konsentrasi 0,5% (A2) memiliki tingkat penerimaan tertinggi sebesar 57,5% dan sampel dengan konsentrasi 2,5% (A6) memiliki tingkat penerimaan terendah sebesar 32,5%. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan minyak atsiri pala yang terlalu tinggi dapat memberikan rasa yang *strong* pada permen *hard candy*, seperti rasa yang terlalu menyengat, tajam atau pedas sehingga kurang dapat diterima

oleh panelis. Rasa yang kuat pada *hard candy* disebabkan oleh kandungan senyawa kompleks dalam minyak atsiri pala, seperti *4-terpineol* (13,92%), dan *myristicin* (13,57%) (Vazquez-Fresno *et al.*, 2019).

c. *Mouthfeel*

Mouthfeel atau sensasi tekstur yang dirasakan di dalam mulut saat mengonsumsi suatu produk. Penambahan minyak atsiri pala tidak hanya memberikan aroma, tetapi juga berinteraksi dengan matriks gula untuk membentuk karakteristik permukaan dan kelarutan permen saat diemut (Layuk *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil uji *chi-square*, penambahan minyak atsiri pala berpengaruh nyata terhadap tingkat kesukaan *mouthfeel* ($p < 0,05$) (Lampiran 4.7). Signifikansi ini menunjukkan bahwa setiap penambahan minyak atsiri pala memberikan rasa *mouthfeel* yang berbeda – beda di setiap panelis. Hal ini sejalan dengan penelitian Maryati *et al.*, (2023) yang menyatakan bahwa minyak atsiri pala pada permen dapat mempengaruhi viskositas dan sifat permukaan produk pangan. Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *mouthfeel hard candy* pala dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *mouthfeel hard candy* minyak atsiri pala

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Sangat suka	17,5	5,0	5,0	5,0	2,5	6,3
Suka	26,3	17,5	23,8	15,0	18,8	13,8
Agak suka	7,5	25,0	18,8	21,3	15,0	15,0
Netral	25,0	22,5	21,3	20,0	18,8	15,0
Agak tidak suka	12,5	16,3	20,0	22,5	17,5	18,8
Tidak Suka	6,3	12,5	8,8	10,0	17,5	13,8
Sangat tidak suka	5,0	1,3	2,5	6,3	10,0	17,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% agak suka – sangat suka	51,3	47,5	47,5	41,3	36,3	35,0

Persentase tingkat penerimaan *mouthfeel* pada tabel 4.4 menunjukkan persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa (agak suka – sangat suka) dalam berbagai perlakuan konsentrasi, dengan rentang persentase antara 35,0,% hingga

51,3%. Sampel dengan konsentrasi 0,5% (A2) memiliki tingkat penerimaan tertinggi sebesar 51,3% dan sampel dengan konsentrasi 2,5% (A6) memiliki tingkat penerimaan terendah sebesar 35,0%. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi minyak atsiri yang terlalu tinggi dapat mengubah sensasi fisik permen di lidah, seperti munculnya rasa berminyak yang berlebihan atau perubahan pada kehalusan permukaan permen. Pada konsentrasi tinggi, senyawa-senyawa ini dapat menyebabkan sensasi "*greasy*" atau berminyak di rongga mulut karena minyak atsiri tidak terdispersi secara homogen dalam matriks gula keras (Zhang *et al.*, 2023). Selain itu, kandungan *eugenol* dan senyawa volatil lainnya dalam minyak atsiri pala (seperti *myristisin*, dan *α -pinene*) dapat memicu respon trigeminal berupa sensasi hangat atau sedikit menyengat di lidah (Ashokkumar *et al.*, 2022). Berdasarkan penelitian Maryati *et al.*, (2023) menyatakan pada konsentrasi minyak atsiri pala 2% menghasilkan atribut sensori *mouthfeel* pada *hard candy* dari dominan rasa '*sweet*' menjadi '*spicy*', dengan sensasi *cooling* serta *aftertaste spicy* yang dapat menurunkan tingkat kesukaan panelis.

d. *Aftertaste*

Aftertaste merupakan parameter sensori yang memberikan kesan rasa yang tertinggal di rongga mulut setelah produk ditelan dan menjadi salah satu faktor penentu dalam penerimaan akhir sebuah produk. Dalam pembuatan *hard candy*, minyak atsiri pala (*Myristica fragrans*) dimanfaatkan untuk memberikan sensasi aromatik dan kehangatan yang khas, namun konsentrasi yang ditambahkan harus terkontrol agar tidak mengganggu profil rasa keseluruhan (Layuk *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil uji *chi-square* pada sampel *hard candy*, penambahan minyak atsiri pala berpengaruh nyata terhadap tingkat kesukaan *aftertaste* ($p < 0,05$) (Lampiran 4.8). Signifikansi ini menunjukkan bahwa panelis mampu membedakan dengan jelas perubahan rasa yang tertinggal pada setiap perlakuan. Hasil persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *aftertaste hard candy* pala dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *aftertaste hard candy* minyak atsiri pala

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Sangat suka	18,8	5,0	5,0	6,3	3,8	5,0

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Suka	21,3	22,5	23,8	10,0	8,8	12,5
Agak suka	13,8	18,8	12,5	22,5	10,0	12,5
Netral	18,8	13,8	23,8	11,3	11,3	10,0
Agak tidak suka	12,5	26,3	26,3	32,5	35,0	17,5
Tidak Suka	11,3	10,0	6,3	12,5	16,3	20,0
Sangat tidak suka	3,8	3,8	2,5	5,0	15,0	22,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% agak suka – sangat suka	53,8	46,3	41,3	38,8	22,5	30,0

Persentase tingkat penerimaan *aftertaste* pada tabel 4.5 menunjukkan persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa (agak suka – sangat suka) dalam berbagai perlakuan konsentrasi, dengan rentang persentase antara 22,5% hingga 53,8%. Sampel dengan konsentrasi 0,5% (A2) memiliki tingkat penerimaan tertinggi sebesar 53,8% dan sampel dengan konsentrasi 2% (A5) memiliki tingkat penerimaan terendah sebesar 22,5%. Penurunan preferensi yang signifikan ini mengindikasikan bahwa penambahan minyak atsiri pala dalam jumlah besar meninggalkan kesan rasa yang terlalu tajam atau "getir" yang menetap lama setelah permen dikonsumsi (Saeed *et al.*, 2022).

e. Overall

Overall merupakan uji sensori yang digunakan untuk mengetahui tingkat penerimaan konsumen secara menyeluruh terhadap suatu produk pangan dengan mempertimbangkan keseluruhan atribut sensori (Blaak *et al.*, 2018). Uji ini tidak hanya menilai satu atribut seperti rasa, aroma, warna, dan tekstur secara terpisah, melainkan menilai secara keseluruhan saat konsumen mengonsumsi suatu produk tersebut (Deneulin *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil uji *chi-square*, penambahan minyak atsiri pala berpengaruh nyata terhadap tingkat *overall hard candy* ($p < 0,05$) (Lampiran 4.9). Signifikansi ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi yang ditambahkan pada *hard candy* pala, berpengaruh nyata terhadap *overall* yang dirasakan oleh panelis. Pengaruh signifikan ini terjadi karena minyak atsiri pala mengandung komponen

flavor seperti *miristisin*, *elemisin*, dan *safrol* yang memberikan aroma dan rasa khas pala (Benjemaa *et al.*, 2022). Ketika konsentrasi minyak atsiri pala terlalu tinggi, aroma dan rasa yang dihasilkan akan *strong* dan kurang diterima oleh konsumen, sehingga menurunkan tingkat kesukaan keseluruhan. Sebaliknya jika konsentrasi rendah, aroma dan rasa pala masih dapat diterima dengan baik oleh konsumen (Sipahelut *et al.*, 2026). Hasil persentase tingkat penerimaan panelis terhadap rasa *hard candy* minyak atsiri pala dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *overall hard candy* minyak atsiri pala

Skala hedonik	Sampel					
	A1 (MA 0%)	A2 (MA 0,5%)	A3 (MA 1%)	A4 (MA 1,5%)	A5 (MA 2%)	A6 (MA 2,5%)
Sangat suka	22,5	6,3	8,8	12,5	2,5	6,3
Suka	25,0	32,5	18,8	7,5	15,0	13,8
Agak suka	16,3	17,5	27,5	21,3	21,3	16,3
Netral	18,8	20,0	17,5	22,5	20,0	11,3
Agak tidak suka	7,5	15,0	18,8	22,5	17,5	20,0
Tidak Suka	8,8	5,0	6,3	10,0	12,5	12,5
Sangat tidak suka	1,3	3,8	2,5	3,8	11,3	20,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% agak suka – sangat suka	63,8	56,3	55,0	41,3	38,8	36,3

Persentase tingkat penerimaan *overall* pada tabel 4.6 menunjukkan persentase tingkat penerimaan panelis terhadap *overall* (agak suka – sangat suka) dalam berbagai perlakuan konsentrasi, dengan rentang persentase antara 36,3% hingga 63,8%. Sampel dengan konsentrasi 2,5% (A6) memiliki tingkat penerimaan tertinggi sebesar 63,8% dan sampel dengan konsentrasi 0,5% (A2) memiliki tingkat penerimaan terendah sebesar 36,3%. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi minyak atsiri pala yang terlalu tinggi dapat menurunkan tingkat kesukaan konsumen secara *overall* karena aroma dan rasa yang terlalu tajam. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Sipahelut *et al.*, (2026) tentang produk es krim yang diformulasi dengan variasi konsentrasi minyak atsiri daging buah pala, dimana semakin tinggi konsentrasi minyak

atsiri daging buah pala yang ditambahkan maka semakin rendah tingkat penerimaan konsumennya.

4.4 Nilai Efektivitas *Hard Candy* Pala

Pengujian efektivitas digunakan untuk mengetahui sampel terbaik dari parameter yang diuji. Hasil dari nilai efektivitas tertinggi menunjukkan sampel yang terbaik. *Hard candy* dengan berbagai konsentrasi dengan penambahan minyak atsiri pala dilihat berdasarkan uji hedonik dan uji zona hambat (metode cakram). Semakin tinggi tingkat kepentingan maka semakin tinggi pula nilai bobot variabel yang diberikan (Lampiran 4.10). Hasil nilai efektivitas *hard candy* minyak atsiri pala dengan berbagai konsentrasi minyak atsiri pala dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Nilai efektivitas perlakuan terbaik pada pembuatan *hard candy* minyak atsiri pala

Konsentrasi minyak atsiri pala	Nilai Efektivitas
A1 (0%)	0,09
A2 (0,5%)	0,08
A3 (1%)	0,10
A4 (1,5%)	0,51
A5 (2%)	0,07
A6 (2,5%)	0,06

Berdasarkan Tabel 4.7 diketahui bahwa perlakuan terbaik *hard candy* minyak atsiri pala diperoleh pada perlakuan A4 yaitu konsentrasi 1,5% minyak atsiri pala dengan nilai efektivitas sebesar 0,51. Tingkat penerimaan panelis terhadap aroma 53,8%, rasa 45,0%, *mouthfeel* 41,3%, *aftertaste* 38,8%, dan keseluruhan 41,3%. Aktivitas zona hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis* berturut – turut memiliki diameter zona hambat sebesar 4,43 mm (lemah) dan 5,30 mm (sedang). Meskipun perlakuan A6 menghasilkan aktivitas antimikroba tertinggi, peningkatan konsentrasi minyak atsiri menyebabkan aroma dan rasa rempah menjadi terlalu kuat sehingga menurunkan tingkat penerimaan panelis. Sebaliknya, perlakuan A4 mampu memberikan keseimbangan antara aktivitas antimikroba dan karakteristik sensori. Oleh karena itu, berdasarkan uji efektivitas menggunakan metode De Garmo, perlakuan A4 dipilih sebagai formulasi optimum karena memiliki kompromi terbaik antara fungsi antimikroba dan tingkat kesukaan konsumen

4.5 Profil Komponen Volatil *Hard Candy* Pala

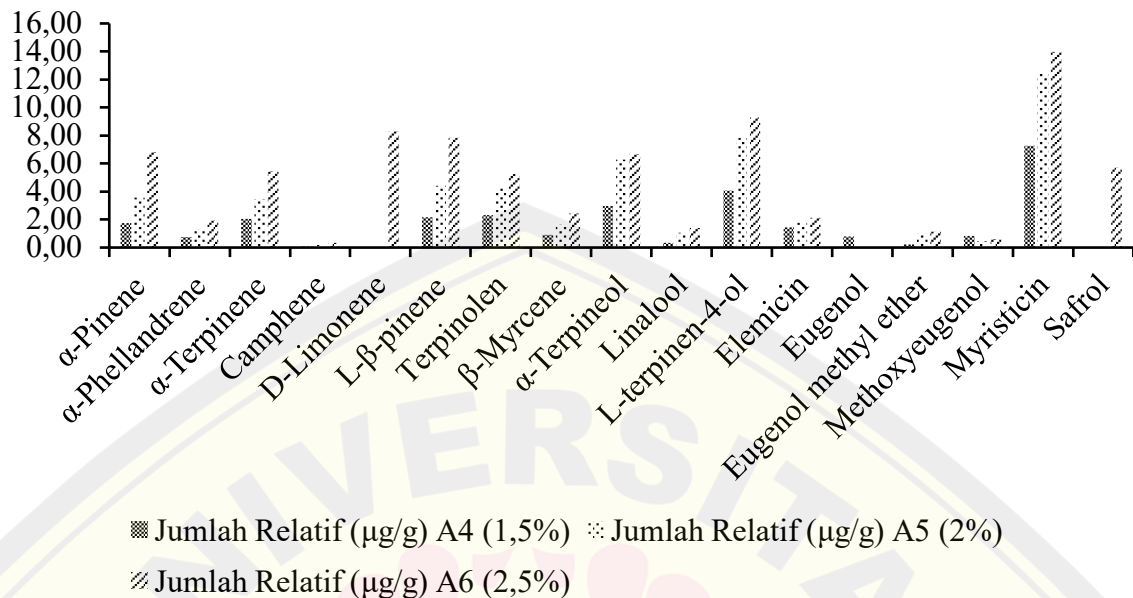
Hasil analisis senyawa volatil *hard candy* minyak atsiri pala menggunakan metode GC-MS pada ketiga sampel (A4 = 1,5%, A5 = 2%, dan A6 = 2,5%) memiliki profil senyawa volatil yang terdiri dari tiga golongan utama, yaitu *monoterpene hydrocarbon*, *oxygenated monoterpene*, dan *phenylpropanoid* yang dapat dilihat pada Tabel 4.7. Ketiga kelompok senyawa tersebut merupakan komponen utama penyusun minyak atsiri pala (*Myristica fragrans*) yang berperan penting dalam pembentukan aroma khas sekaligus memberikan aktivitas biologis, terutama sebagai antibakteri (Ashokkumar *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil analisis GC-MS Tabel 4.7 teridentifikasi sebanyak 18 senyawa volatil, terdiri dari 8 senyawa *monoterpene hydrocarbon*, 4 senyawa golongan *oxygenated monoterpene*, dan 6 senyawa golongan *phenylpropanoid*. Perbedaan konsentrasi minyak atsiri yang ditambahkan menghasilkan jumlah relatif senyawa volatil yang berbeda pada setiap perlakuan. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri yang digunakan, semakin besar jumlah senyawa volatil yang terdeteksi di dalam *hard candy*. Peningkatan jumlah senyawa ini menunjukkan bahwa semakin banyak komponen bioaktif minyak atsiri yang berhasil dipertahankan selama proses pembuatan *hard candy*, sehingga berpotensi meningkatkan aktivitas antibakteri sekaligus memperkuat karakteristik aroma produk.

Tabel 4.7 Jumlah relatif senyawa volatil teridentifikasi dalam *hard candy* minyak atsiri pala

		Jumlah Relatif (µg/g)		
No	Senyawa	A4 (1,5%) minyak atsiri pala	A5 (2%) minyak atsiri pala	A6 (2,5%) minyak atsiri pala
<i>Monoterpene hydrocarbon</i>				
6	<i>α-Pinene</i>	1,76	3,59	6,82
10	<i>α-Phellandrene</i>	0,77	1,30	1,92
12	<i>α-Terpinene</i>	2,05	3,47	5,43
7	<i>Camphene</i>	0,08	0,17	0,34
13	<i>D-Limonene</i>	nd	nd	8,29
8	<i>β-pinene</i>	2,15	4,42	7,84
19	<i>Terpinolen</i>	2,32	4,29	5,25
9	<i>β-myrcene</i>	0,90	1,62	2,41
Total		10,03	18,86	38,30

		Jumlah Relatif (µg/g)		
No	Senyawa	A4 (1,5%) minyak atsiri pala	A5 (2%) minyak atsiri pala	A6 (2,5%) minyak atsiri pala
<i>Oxygenated monoterpene</i>				
31	<i>α-Terpineol</i>	2,97	6,27	6,67
20	<i>Linalool</i>	0,35	1,07	1,41
30	<i>Terpinen-4-ol</i>	4,08	7,84	9,28
27	<i>β-Terpineol</i>	0,05	0,15	0,21
Total		7,45	15,33	17,57
<i>Phenylpropanoid</i>				
59	<i>Elemicin</i>	1,43	1,78	2,11
48	<i>Eugenol</i>	0,79	nd	nd
49	<i>Eugenol methyl ether</i>	0,23	0,97	1,14
63	<i>MethoxyEugenol</i>	0,84	0,46	0,58
58	<i>Myristicin</i>	7,27	12,42	13,98
40	<i>Safrol</i>	nd	nd	5,71
Total		10,56	15,64	23,54

Golongan *monoterpene hydrocarbon* merupakan senyawa volatil yang paling dominan ditemukan pada sample *hard candy* minyak atsiri pala A4, A5, dan A6. Golongan *monoterpene hidrokarbon* memiliki jumlah relatif total senyawa volatil yang semakin meningkat dengan seiring bertambahnya konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan ke dalam formulasi *hard candy*. Total senyawa *monoterpene hidrokarbon* meningkat dari 10,03 $\mu\text{g/g}$ pada perlakuan A4 (1,5%), menjadi 18,86 $\mu\text{g/g}$ pada A5 (2%), dan mencapai 38,30 $\mu\text{g/g}$ pada A6 (2,5%). Pada golongan *oxygenated monoterpene* mengalami peningkatan dari 7,45 $\mu\text{g/g}$ menjadi 15,33 $\mu\text{g/g}$ dan 17,57 $\mu\text{g/g}$, sedangkan kelompok *phenylpropanoid* meningkat dari 10,56 $\mu\text{g/g}$ menjadi 15,64 $\mu\text{g/g}$ dan 23,54 $\mu\text{g/g}$. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri pala yang ditambahkan maka semakin besar jumlah senyawa volatil yang dapat dipertahankan di dalam matriks *hard candy* sehingga jumlah relatif senyawa yang terdeteksi oleh GC-MS semakin tinggi. Kondisi ini sejalan dengan hasil uji antibakteri, dimana peningkatan konsentrasi minyak atsiri menghasilkan diameter zona hambat yang semakin besar serta nilai OD pada uji MIC yang semakin rendah. Dengan demikian, peningkatan kandungan senyawa volatil yang teridentifikasi melalui GC-MS mendukung meningkatnya aktivitas antibakteri *hard candy* terhadap *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*.

Senyawa volatil dalam *hard candy* minyak atsiri palaGambar 4.10 Senyawa volatil dalam *hard candy* minyak atsiri pala

Golongan *monoterpene hidrokarbon* terdiri dari α -pinene, α -phellandrene, α -terpinene, camphene, D-limonene, β -pinene, terpinolene, dan β -myrcene. Senyawa tersebut menunjukkan peningkatan jumlah relatif seiring meningkatnya konsentrasi minyak atsiri pala. Peningkatan jumlah relatif pada senyawa α -pinene (1,76 $\mu\text{g/g}$ menjadi 6,82 $\mu\text{g/g}$), β -pinene (2,15 $\mu\text{g/g}$ menjadi 7,84 $\mu\text{g/g}$), dan α -terpinene (2,05 $\mu\text{g/g}$ menjadi 5,43 $\mu\text{g/g}$) tidak hanya menunjukkan semakin banyaknya komponen volatil yang bertahan setelah proses pemanasan, tetapi juga berkontribusi terhadap meningkatnya aktivitas antibakteri *hard candy*. Senyawa α -pinene, β -pinene, dan α -terpinene diketahui mampu merusak integritas membran sel bakteri melalui peningkatan permeabilitas membran sehingga terjadi kebocoran komponen intraseluler dan terganggunya metabolisme sel. Mekanisme tersebut sejalan dengan peningkatan diameter zona hambat pada konsentrasi minyak atsiri yang lebih tinggi. Julacha *et al.*, (2021) menyatakan bahwa senyawa β -pinene efektif menghambat bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 500-2000 ppm, sedangkan menurut Moo *et al.*, (2021) menjelaskan senyawa α -pinene, α -terpinene dan linalool dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran dan peningkatan fluiditas pada bakteri gram positif. Selain berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri, golongan

monoterpene hydrocarbon juga berperan dalam pembentukan karakter aroma rempah pada *hard candy*. *α-pinene* memberikan aroma *woody* dan *pine*, sedangkan *D-limonene* memberikan aroma citrus segar yang mulai terdeteksi pada perlakuan A6 sebesar 8,29 µg/g. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi komponen volatil dengan threshold deteksi GC-MS tertentu memerlukan dosis minyak atsiri yang cukup tinggi agar dapat dideteksi. Selain itu, profil senyawa volatil juga dapat berubah secara signifikan seiring dengan variasi teknik ekstraksi dan suhu pemanasannya (Chatterjee *et al.*, 2015). Menurut Zheng *et al.* (2023), keberadaan *monoterpena hidrokarbon* pada produk akhir dipengaruhi oleh jumlah minyak atsiri yang ditambahkan dan kemampuan matriks pangan mempertahankan senyawa volatil selama pemanasan. Selain itu, matriks sukrosa yang membentuk fase amorf pada *hard candy* mampu mengenkapsulasi sebagian senyawa volatil sehingga kehilangan akibat evaporasi dapat diminimalkan (Souiy *et al.*, 2023). Kondisi ini menjelaskan mengapa atribut aroma *spicy* pada hasil uji RATA semakin meningkat seiring bertambahnya konsentrasi minyak atsiri.

Golongan senyawa *oxygenated monoterpene α-terpineol, linalool, terpinen-4-ol*, dan *β-terpineol* yang seluruhnya mengalami peningkatan jumlah relatif pada setiap perlakuan. Senyawa *terpinen-4-ol* merupakan senyawa dengan jumlah relatif tertinggi, meningkat dari 4,08 µg/g pada A4 menjadi 9,28 µg/g pada A6. Tingginya kandungan *terpinen-4-ol* menunjukkan bahwa senyawa *monoterpena teroksigenasi* relatif stabil terhadap proses pemanasan sehingga masih dapat dipertahankan di dalam *hard candy* (Ashokkumar *et al.*, 2022). Selain memberikan aktivitas antibakteri melalui kerusakan membran sel bakteri, golongan *oxygenated monoterpene* juga berkontribusi terhadap karakteristik sensori *hard candy*. Senyawa *α-terpineol, linalool*, dan *terpinen-4-ol* dapat memberikan aroma *floral*, manis, *woody*, dan sedikit *spicy* sehingga memperkuat aroma khas pala yang teridentifikasi pada uji RATA (Sharmeen *et al.*, 2021). Oleh karena itu, meningkatnya jumlah relatif golongan *oxygenated monoterpene* tidak hanya meningkatkan aktivitas antibakteri, tetapi juga meningkatkan intensitas atribut aroma rempah pada perlakuan dengan konsentrasi minyak atsiri yang lebih tinggi.

Golongan senyawa *phenylpropanoid* merupakan golongan senyawa dengan jumlah relatif terbesar kedua setelah *monoterpene hydrocarbon*, terdiri dari *elemicin*,

eugenol, *eugenol methyl ether*, *methoxyEugenol*, *myristicin*, dan safron. Senyawa tersebut menunjukkan peningkatan jumlah relatif seiring meningkatnya konsentrasi minyak atsiri pala. Senyawa *myristicin* meningkat dari 7,27 µg/g menjadi 13,98 µg/g, peningkatan kandungan *myristicin* dapat meningkatkan aktivitas antibakteri karena senyawa ini bersifat lipofilik dan mampu merusak integritas membran sel bakteri. Selain itu, senyawa *myristicin* dan *eugenol* serta turunannya memberikan karakter aroma rempah yang hangat (*warm spicy*) sehingga memperkuat atribut aroma *spicy*, rasa *spicy*, dan *aftertaste spicy* yang semakin dominan pada hasil uji RATA seiring meningkatnya konsentrasi minyak atsiri. Sedangkan senyawa *eugenol* hanya terdeteksi pada perlakuan A4 dengan jumlah 0,79 µg/g, sedangkan safrol baru teridentifikasi pada perlakuan A6 dengan jumlah relatif 5,71 µg/g. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap senyawa di dalam minyak atsiri memiliki volatilitas yang berbeda – beda selama proses pemasakan atau pembuatan. Senyawa seperti *eugenol* mudah menguap atau rusak, sehingga jumlahnya terus berkurang hingga akhirnya tidak terdeteksi lagi (Gotz *et al.*, 2022). Sedangkan pada senyawa safrol baru terdeteksi pada konsentrasi minyak atsiri yang lebih tinggi karena kadar safrol dalam minyak atsiri pala relatif rendah sehingga sering kali tidak bisa di deteksi oleh alat deteksi GC-MS (Khamnuan *et al.*, 2025). Secara keseluruhan, hasil GC-MS menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi minyak atsiri pala tidak hanya meningkatkan efektivitas antibakteri, tetapi juga memberikan karakteristik sensori khas pala pada *hard candy*. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian, dimana perlakuan dengan konsentrasi minyak atsiri pala yang lebih tinggi menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dan memberikan intensitas aroma dan cita rasa rempah yang semakin kuat.