

**AKTIVITAS ANTI-*Candida* NANOPARTIKEL PERAK HASIL
SINTESIS HIJAU MENGGUNAKAN EKSTRAK DAUN
MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN APLIKASINYA SEBAGAI
PENGAWET ALAMI PADA KEJU**

TUGAS AKHIR

*Karya Tulis sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik Program Studi Teknologi Pangan*



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

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTI-*Candida* NANOPARTIKEL PERAK HASIL SINTESIS HIJAU MENGGUNAKAN EKSTRAK DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN APLIKASINYA SEBAGAI PENGAWET ALAMI PADA KEJU

Oleh
Azriel David Budiman
NPM: 223020104
(Program Studi Teknologi Pangan)

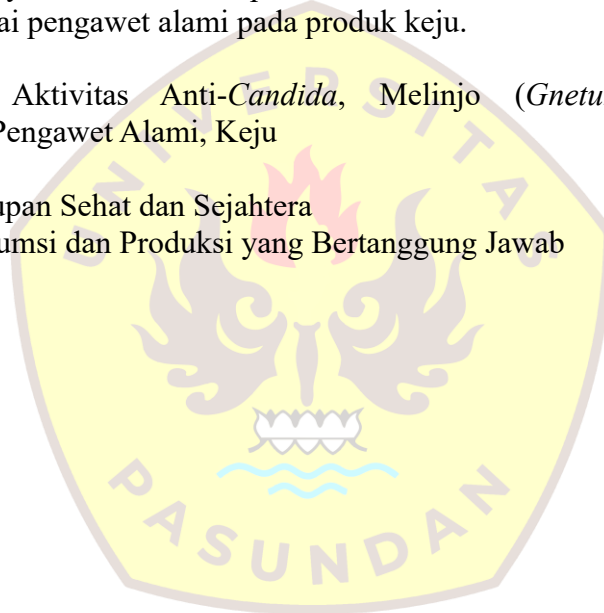
Kontaminasi jamur, khususnya dari genus *Candida*, merupakan tantangan serius dalam industri pangan karena dapat memicu kerusakan produk secara masif dan membahayakan kesehatan konsumen. Kondisi ini mendorong tingginya kebutuhan agen pengawet alami yang lebih aman. Namun, penggunaan ekstrak tanaman secara konvensional sering kali dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba yang lebih rendah dibandingkan pengawet buatan. Oleh karena itu, efektivitas pengawet alami ini perlu ditingkatkan, salah satunya melalui pendekatan nanobioteknologi yakni sintesis nanopartikel yang dimediasi ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo meliputi warna, kadar air, pH, dan aktivitas air (a_w) beserta ekstraksinya, menentukan aktivitas anti-*Candida* dari ekstrak dan *Melinjo Leaf-mediated Silver Nanoparticles* (ML-AgNPs), serta mengevaluasi pengaruh penambahan ekstrak dan ML-AgNPs terhadap populasi jamur pada produk keju. Metode penelitian diawali dengan proses pengeringan daun melinjo segar yang kemudian dihaluskan menjadi bubuk, dilanjutkan dengan ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol sehingga menghasilkan ekstrak kasar. ML-AgNPs kemudian disintesis menggunakan ekstrak sebagai agen bioreduktor dengan melarutkan ekstrak konsentrasi 10% dalam 1mM $AgNO_3$. Pengujian aktivitas anti-*Candida* secara *in vitro* pada ekstrak dan ML-AgNPs dilakukan sesuai dengan metode *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) menggunakan metode *Well Diffusion Assay* (WDA), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC). Pengujian dilakukan terhadap *Candida* dengan spesies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, dan *C. parapsilosis*. Pada tahap akhir, pengaruh ekstrak dan ML-AgNPs dievaluasi dengan mengaplikasikannya pada konsentrasi 0,10% dan 1,00% sebagai pengawet pada matriks keju yang diinkubasi pada suhu ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ C$) dan suhu pendinginan ($4,00 \pm 2,00^\circ C$) selama 10 hari masa penyimpanan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bubuk daun melinjo memiliki nilai warna $L^* 41,40 \pm 0,95$, $a^* -3,39 \pm 0,02$, dan $b^* 10,09 \pm 0,61$, kadar air $7,73 \pm 0,32\%$, pH $5,94 \pm 0,01$, dan $a_w 0,58 \pm 0,00$. Rendemen ekstrak kasar yang diperoleh sebesar 8,82%. Uji WDA menunjukkan ekstrak 10% memiliki nilai rata-rata zona hambat $6,67 \pm 0,76$ hingga $8,00 \pm 1,50$ mm, sedangkan ML-AgNPs 1% memiliki nilai rata-rata zona hambat $6,33 \pm 0,58$ hingga $7,67 \pm 0,76$

mm. Pertumbuhan *Candida* spp. dapat dihambat dan dibunuh menggunakan ekstrak dengan masing-masing nilai MIC 6,25–12,50 mg/mL dan MFC 12,50–25,00 mg/mL. Dengan menggunakan ML-AgNPs, pertumbuhan *Candida* dapat dihambat dan dibunuh dengan masing-masing nilai MIC 1,25 hingga 2,50 mg/mL dan MFC 2,50 hingga >5,00 mg/mL. Pada aplikasi keju di suhu ruang, ekstrak dengan konsentrasi 1,00% mampu membunuh *Candida* secara total (0,00 log₁₀ CFU/mL) pada hari ke-8, sedangkan ML-AgNPs menunjukkan kemampuan yang sama pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,10% di hari ke-8. Pada penyimpanan suhu pendinginan, terjadi akselerasi efektivitas di mana penggunaan ekstrak 0,10% sudah mampu mencapai efek fungisida pada hari ke-3. Sementara itu, ML-AgNPs pada suhu pendinginan menunjukkan efisiensi yang sangat tinggi, di mana konsentrasi sangat rendah (0,01%) mampu memusnahkan mikroba secara total pada hari ke-8. Kesimpulan dari penelitian ini adalah modifikasi ekstrak daun melinjo menjadi ML-AgNPs serta kombinasinya dengan suhu rendah terbukti secara nyata meningkatkan daya hambat terhadap kontaminasi *Candida* dan sangat potensial digunakan sebagai pengawet alami pada produk keju.

Kata Kunci: Aktivitas Anti-*Candida*, Melinjo (*Gnetum gnemon* L.), Nanoteknologi, Pengawet Alami, Keju

SDG: 3 – Kehidupan Sehat dan Sejahtera

SDG: 12 – Konsumsi dan Produksi yang Bertanggung Jawab



ABSTRACT

ANTI-Candida ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES FROM GREEN SYNTHESIS USING MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) LEAF EXTRACT AND ITS APPLICATION AS A NATURAL PRESERVATIVE IN CHEESE

By

Azriel David Budiman

NPM: 223020104

(Department of Food Technology)

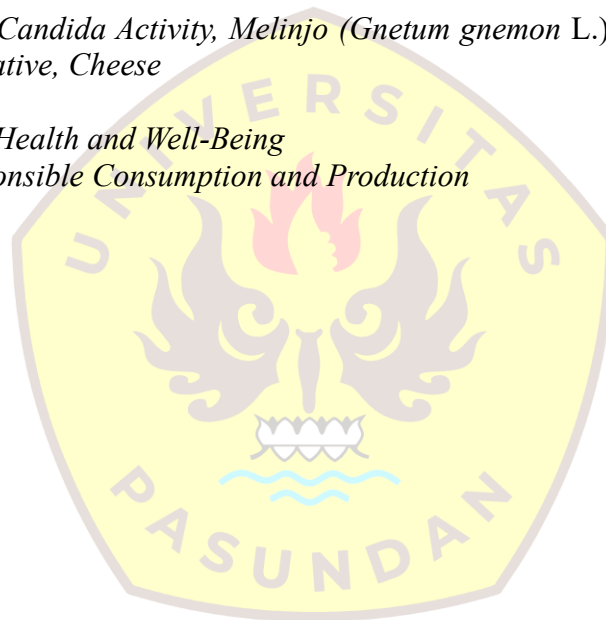
*Fungal contamination, particularly from the genus *Candida*, poses a serious challenge in the food industry as it can induce extensive product spoilage and endanger consumer health. This condition drives a high demand for safer natural preservative agents. However, conventional plant extracts are often reported to have lower antimicrobial activity compared to synthetic preservatives. Therefore, the effectiveness of natural preservatives needs to be enhanced, such as through a nanobiotechnology approach involving the synthesis of silver nanoparticles mediated by melinjo leaf extract (*Gnetum gnemon* L.). This study aims to determine the physicochemical characteristics of melinjo leaf powder, including color, moisture content, pH, and water activity (a_w), along with its extraction; to determine the anti-*Candida* activity of the extract and Melinjo Leaf-mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs); and to evaluate the effect of adding the extract and ML-AgNPs on fungal populations in cheese products. The research method began with drying fresh melinjo leaves, followed by grinding them into powder and conducting maceration extraction with ethanol to produce a crude extract. ML-AgNPs were then synthesized using the extract as a bioreducing agent by dissolving 10% concentration extract in 1mM $AgNO_3$. In vitro anti-*Candida* activity testing of the extract and ML-AgNPs was conducted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines using the Well Diffusion Assay (WDA), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) methods. The tests were performed against *Candida* species, including *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis*. In the final stage, the effect of the extract and ML-AgNPs was evaluated by applying them at concentrations of 0.10% and 1.00% as preservatives in a cheese matrix incubated at room temperature ($25.00 \pm 2.00^\circ C$) and chilling temperature ($4.00 \pm 2.00^\circ C$) over a 10-day storage period. The results showed that the melinjo leaf powder had color values of $L^* 41.40 \pm 0.95$, $a^* -3.39 \pm 0.02$, and $b^* 10.09 \pm 0.61$; a moisture content of $7.73 \pm 0.32\%$; a pH of 5.94 ± 0.01 ; and an a_w of 0.58 ± 0.00 . The crude extract yield obtained was 8.82%. WDA testing indicated that the 10% extract had mean inhibition zones ranging from 6.67 ± 0.76 to 8.00 ± 1.50 mm, while 1% ML-AgNPs had mean inhibition zones ranging from 6.33 ± 0.58 to 7.67 ± 0.76 mm. The*

growth of Candida spp. was inhibited and killed by the extract with MIC values of 6.25–12.50 mg/mL and MFC values of 12.50–25.00 mg/mL. With ML-AgNPs, Candida growth was inhibited and killed with MIC values of 1.25 to 2.50 mg/mL and MFC values of 2.50 to >5.00 mg/mL. In the cheese application at room temperature, the 1.00% extract was able to completely killed Candida (0.00 log₁₀ CFU/mL) by day 8, while ML-AgNPs achieved the same result at a lower concentration of 0.10% by day 8. Under chilled storage, effectiveness was accelerated, with 0.10% extract achieving a fungicidal effect by day 3. Meanwhile, ML-AgNPs at chilling temperature demonstrated very high efficiency, where a very low concentration (0.01%) was able to completely eliminate the microbes by day 8. In conclusion, the modification of melinjo leaf extract into ML-AgNPs and its combination with low temperatures significantly enhances inhibitory power against Candida contamination and holds great potential as a natural preservative for cheese products.

Keywords: *Anti-Candida Activity, Melinjo (Gnetum gnemon L.), Nanotechnology, Natural Preservative, Cheese*

SDG: 3 – Good Health and Well-Being

SDG: 12 – Responsible Consumption and Production



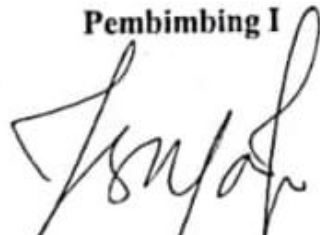
**AKTIVITAS ANTI-*Candida* NANOPARTIKEL PERAK HASIL
SINTESIS HIJAU MENGGUNAKAN EKSTRAK DAUN
MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN APLIKASINYA SEBAGAI
PENGAWET ALAMI PADA KEJU**

Oleh
Azriel David Budiman
NPM: 223020104
(Program Studi Teknologi Pangan)

Fakultas Teknik
Universitas Pasundan

Menyetujui
Tim Pembimbing

Pembimbing I



Dr. Istiyati Inayah, S.Si., M.Si.

Pembimbing II



Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi

**AKTIVITAS ANTI-*Candida* NANOPARTIKEL PERAK HASIL
SINTESIS HIJAU MENGGUNAKAN EKSTRAK DAUN
MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN APLIKASINYA SEBAGAI
PENGAWET ALAMI PADA KEJU**

LEMBAR PENGESAHAN

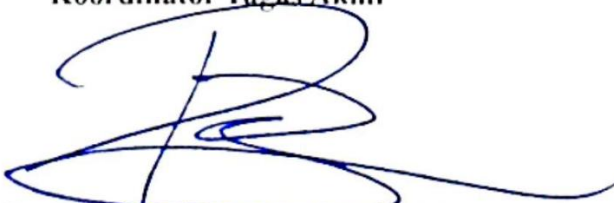
TUGAS AKHIR

**Karya Tulis sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik Program Studi Teknologi Pangan**

Oleh:
Azriel David Budiman
NPM: 223020104
(Program Studi Teknologi Pangan)

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 diperkenankan 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 ditulis dalam Bahasa Indonesia sebagai berikut:

Budiman, A. D. (2026): *Aktivitas Anti-Candida Nanopartikel Perak Hasil Sintesis Hijau Menggunakan Ekstrak Daun Melinjo (Gnetum gnemon L.) dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Keju*. Tugas Akhir Program Sarjana, Universitas Pasundan.

Dan dalam Bahasa Inggris sebagai berikut:

Budiman, A. D. (2026): *Anti-Candida Activity of Silver Nanoparticles from Green Synthesis Using Melinjo (Gnetum gnemon L.) Leaf Extract and Its Application as a Natural Preservative in Cheese*. Bachelor's Thesis, Universitas Pasundan.

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

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus, yang oleh karena kasih karunia dan penyertaan-Nya telah memberikan penulis kekuatan, hikmat, dan kemudahan untuk melewati setiap tantangan dalam proses penyusunan hingga dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul “**Aktivitas Anti-Candida Nanopartikel Perak Hasil Sintesis Hijau Menggunakan Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Keju**” ini dengan baik dan tepat pada waktunya.

Dalam proses penyusunan laporan tugas akhir ini, penulis menyadari bahwa keberhasilan ini tidak akan pernah terwujud tanpa adanya bantuan, bimbingan yang tulus, dan dukungan moril yang tak ternilai dari berbagai pihak. Penulis percaya bahwa karya ilmiah ini adalah hasil dari kolaborasi dan kebaikan banyak orang. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus dan setinggi-tingginya kepada:

1. Dr. Istiyati Inayah, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing. Terima kasih atas ilmu, waktu, dan kesabaran yang telah diluangkan untuk memberikan bimbingan, arahan, serta motivasi yang tak henti-hentinya sejak awal hingga tugas akhir ini terbentuk.
2. Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi, selaku Dosen Pembimbing. Penulis menghaturkan terima kasih secara khusus atas kesempatan berharga yang telah diberikan untuk dapat melaksanakan penelitian di UPM, serta atas segala bimbingan dan masukan yang diberikan.
3. Jaka Rukmana, S.T., M.T. selaku Ketua Program Studi Teknologi Pangan yang telah memberikan dukungan serta menciptakan atmosfer akademik yang kondusif sehingga proses administrasi dan akademis dapat berjalan lancar.
4. Rizal Maulana Ghaffar, S.T., M.T. selaku Koordinator Tugas Akhir Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.

5. Keluarga tercinta, terutama Papa, Mama, Ko Alvian, Ko Andrew, dan Audrey yang menjadi sumber kekuatan utama. Terima kasih atas doa yang tiada putus, dukungan moril yang menguatkan, kepercayaan yang diberikan, serta pengorbanan materiil yang tak ternilai.
6. Sahabat dan rekan-rekan seperjuangan, Leonardus Calvin Wicaksana, Dandy Tiara Putra, Irma Faustina Faizal, dan Dzakhirah Asma Nurullah yang telah menjadi teman bertukar pikiran, berbagi keluh kesah, dan saling menguatkan di setiap langkah. Diskusi dan semangat dari kalian sangat berarti bagi penulis.
7. Teman-teman seperjuangan di UPM, Putri, Mia, Kung Wan Yuen, Hoi Yuan Xin, Haikal, Hayat, Elisya, dan Aisyah yang telah menerima dan membantu penulis dalam melakukan penelitian ini.
8. Teman-teman Kos Berkah, Muhammad Virgie Ambiya Munajat, Gilang Ramadan Saputra, Renata Rifa Danisworo, Muhammad Pandu Munaadiyullah Asy-Syauqi, Dani Muhammad Sagala, Ismail Ahmad Danial Nur Anbiya, dan Dava Aprilian Lampah yang turut membersamai penulis selama perkuliahan hingga penulisan tugas akhir.
9. Nazwa Nurhalija selaku *support system* yang senantiasa menemani dalam suka dan duka selama perkuliahan dan penulisan laporan.
10. Rekan-rekan, abang dan kakak PMK UNPAS, Kak Lia, Kak Lenny, Kak Yunita, Bang Hendro, Febrian, Oddyseus, Suprpto, Syelomita, Margareth, Lani, Ocha, Shoma, dan rekan-rekan lain yang tidak bisa saya sebut satu persatu. Terima kasih atas dukungan, motivasi, dan doa yang telah diberikan.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberikan kontribusi dan bantuan dalam penyusunan laporan tugas akhir ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna, mengingat keterbatasan pengetahuan, wawasan, dan pengalaman yang dimiliki. Ini adalah sebuah langkah awal yang tentunya masih memiliki banyak ruang untuk

perbaikan. Oleh karena itu, segala bentuk kritik, masukan, dan saran yang membangun akan penulis terima.

Akhir kata, besar harapan penulis agar tugas akhir ini dapat memberikan manfaat, baik secara teoretis bagi pengembangan ilmu pengetahuan maupun secara praktis bagi masyarakat dan pihak-pihak yang berkepentingan.



DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
LEMBAR PENGESAHAN	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xviii
Bab I Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Identifikasi Masalah	5
I.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	5
I.4 Manfaat Penelitian.....	6
I.5 Kerangka Pemikiran	6
I.6 Hipotesis Penelitian.....	8
I.7 Waktu dan Tempat Penelitian	8
Bab II Tinjauan Pustaka	10
II.1 Keju.....	10
II.1.1 Tinjauan Keju.....	10
II.1.2 Kontaminan Pada Keju	12
II.2 <i>Candida</i> spp.	13
II.2.1 <i>Candida albicans</i>	14
II.2.2 <i>Candida glabrata</i>	16
II.2.3 <i>Candida krusei</i>	17
II.2.4 <i>Candida parapsilosis</i>	18
II.3 Pengawet Pada Keju	20
II.4 Melinjo	22
II.4.1 Morfologi Melinjo	22
II.4.2 Fisikokimia Melinjo.....	25
II.4.3 Fitokimia Melinjo	26
II.4.4 Bioaktivitas Melinjo	28
II.5 Nanoteknologi.....	31
II.5.1 Nanopartikel Perak	31
II.5.2 ML-AgNPs.....	34
Bab III Metodologi Penelitian	39
III.1 Bahan dan Alat.....	39
III.1.1 Bahan-Bahan Penelitian	39
III.1.2 Alat-Alat Penelitian	40

III.2 Metode Penelitian	40
III.2.1 Rancangan Percobaan	40
III.2.2 Respon Pengujian.....	41
III.2.3 Analisis Data	42
III.3 Prosedur Penelitian	43
III.3.1 Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo.....	43
III.3.2 Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo.....	52
III.3.3 Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo	54
III.3.4 Prosedur Well Difussion Assay (WDA).....	56
III.3.5 Prosedur <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC).....	58
III.3.6 Prosedur <i>Minimum Fungicidal Concentration</i> (MFC)	60
III.3.7 Prosedur Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) Terhadap Keju	62
III.4 Jadwal Penelitian	64
Bab IV Hasil dan Pembahasan	65
IV.1 Penelitian Tahap I “Karakterisasi dan Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo”	65
IV.1.1 Karakteristik Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo	65
IV.1.2 Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	72
IV.2 Penelitian Tahap II “Sintesis ML-AgNPs dan Menentukan Aktivitas Anti- <i>Candida</i> dari Ekstrak Daun Melinjo dan ML- AgNPs”	73
IV.2.1 Sintesis ML-AgNPs.....	74
IV.2.2 Well Diffusion Assay (WDA).....	75
IV.2.3 Penentuan <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) dan <i>Minimum Fungicidal Concentration</i> (MFC).....	78
IV.3 Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) dan ML-AgNPs Terhadap Keju Selama Penyimpanan”	83
IV.3.1 Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	84
IV.3.2 Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm$ $2,00^{\circ}\text{C}$).....	87
IV.3.3 Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) terhadap Populasi Jamur pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	90
IV.3.4 Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00$ $\pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	93
Bab V Kesimpulan dan Saran.....	97
V.1 Kesimpulan	97

V.2 Saran.....	98
DAFTAR PUSTAKA.....	99
LAMPIRAN.....	108



DAFTAR TABEL

Tabel II.1 Komposisi Gizi Keju	11
Tabel II.2. Taksonomi <i>Candida</i>	14
Tabel II.3. Taksonomi Melinjo	23
Tabel II.4. Komposisi Gizi Daun Melinjo Segar.....	25
Tabel III.1. Jadwal Penelitian.....	64
Tabel IV.1. Hasil Karakterisasi Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo.....	65
Tabel IV.2. Hasil Ekstrak Daun Melinjo	72
Tabel IV.3. Zona Penghambatan Ekstrak Daun Melinjo 10% dan ML-AgNPs 1% Terhadap <i>Candida</i>	76
Tabel IV.4. MIC dan MFC Ekstrak Daun Melinjo 10% Terhadap <i>Candida</i>	79
Tabel IV.5. MIC dan MFC ML-AgNPs 1% Terhadap <i>Candida</i>	80
Tabel IV.6. Peningkatan MIC dan MFC dari Ekstrak Daun Melinjo ke ML- AgNPs	82
Tabel IV.7. Jumlah Jamur (TFC) pada Keju Setelah Penyimpanan selama 10 Hari yang Diberi Ekstrak Daun Melinjo dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	85
Tabel IV.8. Jumlah Jamur (TFC) pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi ML-AgNPs dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	88
Tabel IV.9. Jumlah Jamur (TFC) Pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi Ekstrak Daun Melinjo dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$).....	91
Tabel IV.10. Jumlah Jamur (TFC) Pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi ML-AgNPs dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	94

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1 Keju	10
Gambar II.2. Pertumbuhan Jamur pada Keju	12
Gambar II.3. Koloni <i>Candida</i> pada CHROMagar <i>Candida</i>	13
Gambar II.4. <i>Candida albicans</i>	15
Gambar II.5. <i>Candida glabrata</i>	16
Gambar II.6. <i>Candida krusei</i>	17
Gambar II.7. <i>Candida parapsilosis</i>	19
Gambar II.8. Kalium Sorbat.....	21
Gambar II.9. Pohon Melinjo	23
Gambar II.10. Daun Melinjo	24
Gambar II.11. Struktur Kimia <i>Gnetin C</i>	27
Gambar II.12. Cara Kerja Antioksidan	30
Gambar II.13. Metode Sintesis Nanopartikel Perak secara Kimia, Fisik, dan Biologi	32
Gambar II.14. Spektrum Absorpsi UV-Vis ML-AgNPs	36
Gambar II.15. Pola FTIR ML-AgNPs	37
Gambar III.1. Diagram Alir Analisis Warna	45
Gambar III.2. Diagram Alir Penentuan Kadar Air	47
Gambar III.3. Diagram Alir Penentuan pH	49
Gambar III.4. Diagram Alir Penentuan Aktivitas Air	51
Gambar III.5. Diagram Alir Prosedur Ekstraksi Daun Melinjo	53
Gambar III.6. Diagram Alir Prosedur Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (ML-AgNPs)	55
Gambar III.7. Diagram Alir Metode <i>Well Diffusion Assay</i> (WDA).....	57
Gambar III.8. Diagram Alir Metode <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC). 59	
Gambar III.9. Diagram Alir Metode <i>Minimum Fungicidal Concentration</i> (MFC).....	61
Gambar III.10. Diagram Alir Prosedur Aplikasi Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) Terhadap Keju	63
Gambar IV.1. Bubuk Daun Melinjo	66
Gambar IV.2. Kadar Air Bubuk Daun Melinjo	68
Gambar IV.3. pH Bubuk Daun Melinjo	69
Gambar IV.4. Aktivitas Air Bubuk Daun Melinjo.....	71
Gambar IV.5. Ekstrak Daun Melinjo.....	72
Gambar IV.6. Perbandingan antara Ekstrak 10%, DMSO, dan ML-AgNPs 1% .. 74	
Gambar IV.7. Zona Hambat Kontrol Positif (<i>Amphotericin B</i> 0,1%), Ekstrak Daun Melinjo 10%, ML-AgNPs 1%, dan Kontrol Negatif (DMSO 10%) pada <i>Candida albicans</i>	77
Gambar IV.8. Hasil Uji MIC dan MFC pada <i>C. glabrata</i> dengan (a) Ekstrak Daun Melinjo 10% dan (b) ML-AgNPs	81
Gambar IV.9. Grafik Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$).....	85

Gambar IV.10. Grafik Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)	88
Gambar IV.11. Grafik Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$).....	91
Gambar IV.12. Grafik Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$).....	94



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. <i>Layout 96 Well Plate</i>	108
Lampiran B. <i>Two-way ANOVA: Inhibition Zone versus Candida strands, Concentration</i>	109
Lampiran C. <i>Analysis of Variance (Aplikasi)</i>	110
Lampiran D. Dokumentasi Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo	116
Lampiran E. Dokumentasi Proses Pembuatan Ekstrak Daun Melinjo.....	117
Lampiran F. Dokumentasi Proses Pembuatan ML-AgNPs.....	118
Lampiran G. Dokumentasi Hasil Uji WDA	118
Lampiran H. Dokumentasi Hasil Uji MIC dan MFC.....	119
Lampiran I. Dokumentasi Aplikasi pada Keju.....	120
Lampiran J. Dokumentasi Perhitungan TFC.....	121



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	Nama	Pemakaian pertama kali pada halaman
AgNPs	Nanopartikel Perak	4
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	42
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	39
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>	42
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	39
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	34
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>	35
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration 50</i>	38
MFC	<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>	41
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	41
ML-AgNPs	<i>Melinjo Leaf-mediated Silver Nanoparticles</i>	5
pH	<i>potential of Hydrogen</i>	7
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	29
rpm	<i>Revolutions per minute</i>	52
SD	Standar Deviasi	42
SDA	<i>Saboraud Dextrose Agar</i>	39
SDB	<i>Saboraud Dextrose Broth</i>	39
sp.	<i>species</i>	2
spp.	<i>species pluralis</i>	1
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>	32
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	35
TFC	<i>Total Fungal Count</i>	41
TNTC	<i>Too Numerous to Count</i>	84
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>	35
WDA	<i>Well Difussion Assay</i>	41
LAMBANG		
<i>a</i> *	derajat warna kemerahan/kehijauan	40
<i>a</i> _w	aktivitas air	20
Ag ⁺	Ion perak	4
Ag ⁰	Ion perak netral	34
<i>b</i> *	derajat warna kekuningan/kebiruan	40
°C	derajat Celcius	15
<i>L</i> *	tingkat kecerahan	40
log	logaritma	42
mg/mL	miligram per mililiter	38
mL	mililiter	38
mM	mikromolar	54

mm	milimeter	40
nm	nanometer	31
p	<i>probability value</i>	42
μL	Mikroliter	40
%	Persen	4
<	Lebih kecil dari	42
>	Lebih besar dari	79
\pm	Kurang lebih	42



Bab 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, serta (1.7) Waktu dan Tempat Penelitian.

I.1 Latar Belakang

Keamanan pangan menjadi isu utama dalam industri makanan global karena kontaminasi mikroorganisme dapat menyebabkan kerusakan mutu dan membahayakan kesehatan konsumen. Adanya mikroorganisme yang ditularkan melalui makanan menjadi salah satu penyebab banyaknya kasus penyakit setiap tahunnya, salah satunya adalah keracunan makanan. Penyakit akibat makanan adalah penyakit infeksi seperti diare, disentri, kolera, hingga kanker, yang diakibatkan oleh kontaminasi makanan oleh mikroorganisme yang dapat terjadi pada setiap tahapan, baik mulai dari proses produksi, distribusi, hingga konsumsi. Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, jamur, parasit, dan virus yang menyerang tubuh manusia dan menyebabkan kerusakan (Ramadhan, 2024).

Infeksi jamur dapat menyebabkan berbagai gangguan invasif dan sistemik, serta menjadikannya faktor yang sangat signifikan, terutama bagi individu dengan gangguan terkait imun dan wanita hamil. Beberapa obat antijamur digunakan secara luas untuk mengobati infeksi ini, namun efektivitasnya semakin terbatas karena toksisitas, resistensi obat, dan masalah lingkungan. Jamur patogen seperti *Aspergillus niger*, *Microsporium canis*, dan *Candida albicans* menimbulkan ancaman serius bagi kesehatan manusia, terutama pada individu dengan gangguan imun (Pirbalouti dkk., 2024). Spesies *Candida* merupakan mikroorganisme patogen oportunistik eukariotik yang hidup di mukosa rongga mulut, saluran pencernaan, dan kulit. Keberadaan *Candida* spp. tidak hanya menurunkan kualitas sensoris dan nilai gizi produk, tetapi juga dapat menjadi sumber infeksi jika dikonsumsi dalam jumlah berlebih oleh individu dengan sistem imun lemah. Dalam lingkungan

pangan, mikroba ini sering lolos dari sistem pengawetan konvensional karena memiliki daya tahan kuat terhadap perubahan suhu, tekanan osmotik, juga bahkan beberapa jenis pengawet sintetis (Gemal dkk., 2023). Studi *in vitro* menunjukkan bahwa *C. albicans*, salah satu spesies paling patogen dalam genus ini, memiliki resistensi relatif tinggi terhadap beberapa bahan pengawet kimia, seperti asam sorbat dan benzoat, jika digunakan dalam konsentrasi rendah atau bila kondisi penyimpanan tidak ideal (Jangid dkk., 2025).

Spesies *Candida* mampu memanfaatkan sumber karbon yang berbeda kemudian menghasilkan enzim, asam, dan produk sampingan lainnya. Beberapa studi juga telah mengkonfirmasi keberadaan *Candida* sp. dalam fermentasi alami, tetapi jarang dominan. Itu karena kelompok mikroba lain, termasuk *Saccharomyces cerevisiae* dan bakteri asam laktat, memulai pertumbuhan dan mengakumulasi produk sampingan yang menghambat pertumbuhan *Candida* (de Melo Pereira dkk., 2022). Dalam beberapa tahun terakhir, terjadi peningkatan angka infeksi yang diakibatkan oleh jamur. Infeksi ini disebabkan oleh beragam jenis jamur dan khamir yang sebelumnya tidak dikategorikan sebagai patogen bagi hewan maupun manusia. Keju menyediakan substrat yang ideal untuk kolonisasi jamur dan khamir apabila kondisi suhu dan kelembapannya mendukung. Jamur, sebagai mikroorganisme saprofit, merupakan agen utama yang menyebabkan pembusukan pada produk susu, terutama keju yang belum melalui proses pematangan. Spesies khamir sering kali ditemukan dari lingkungan seperti tanah, fasilitas medis, dan bahan pangan yang terkontaminasi. Spesies ini dikenal sebagai mikroorganisme perusak makanan dan patogen oportunistik. Meskipun merupakan komponen mikrobiota usus, dalam keadaan tertentu khamir dapat menyebabkan mikosis sistemik. Walaupun *C. albicans* masih menjadi spesies patogenik utama pada manusia, spesies lain seperti *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. kefir*, dan *C. inconspicua* juga menunjukkan peningkatan frekuensi sebagai agen penyebab kandidiasis invasif (Y1bar dkk., 2024).

Kekhawatiran terhadap bahan tambahan sintetis memunculkan perubahan perilaku konsumen yang kini lebih selektif terhadap komposisi produk makanan yang dikonsumsi. Industri pangan selama ini mengandalkan penggunaan pengawet sintetis seperti natrium benzoat, kalium sorbat, atau nitrit yang meskipun efektif, namun penggunaan bahan-bahan ini mulai menimbulkan kekhawatiran di kalangan konsumen karena potensi efek sampingnya terhadap kesehatan. Beberapa studi menunjukkan bahwa konsumsi pengawet sintetis dalam jangka panjang dapat memicu reaksi alergi, iritasi saluran pencernaan, hingga berpotensi karsinogenik jika dikombinasikan dengan senyawa lain dalam tubuh. Risiko inilah yang mendorong perlunya pencarian alternatif pengawet yang lebih aman dan alami. Salah satu sumber pengawet alami yang potensial adalah tumbuhan. Indonesia, dengan keanekaragaman hayatinya, memiliki banyak tumbuhan berpotensi, salah satunya adalah melinjo.

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan salah satu jenis dari tanaman berbiji terbuka yang tumbuh di daerah tropis, dimana dagingnya terbungkus oleh kulit luar. Tanaman melinjo merupakan komoditas pangan yang melimpah di Indonesia dan memiliki banyak manfaat baik dari daun, bunga, biji, serta kulitnya (Rachmawati, 2017). Melinjo banyak digunakan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai jenis penyakit, seperti nyeri buang air kecil, penyakit mata, anemia, gigitan anjing, dan kekurangan gizi. Melinjo mengandung senyawa aktif, seperti alkaloid, flavonoid, steroid, dan tanin (Kining dkk., 2022). Daun melinjo memiliki berbagai kandungan zat gizi, seperti karbohidrat, protein, vitamin C, zat besi, magnesium, potasium, dan fosfor (Andasari dkk., 2020). Daun melinjo, yang secara tradisional telah dikonsumsi sebagai sayuran, memiliki berbagai kandungan zat gizi dan senyawa fitokimia yang menjadikannya kandidat potensial untuk aplikasi pangan fungsional.

Aktivitas antimikroba dari daun melinjo telah dibuktikan melalui berbagai penelitian. Ekstrak etanol daun melinjo menunjukkan efektivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, dan *Escherichia coli*. Pada penelitian yang dilakukan oleh

Rachmawati (2015), secara spesifik menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun melinjo memiliki efek antifungi terhadap *C. albicans* dengan Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada konsentrasi 37,5%. Potensi ini diatribusikan pada kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid dan tanin. Untuk meningkatkan efektivitasnya, aktivitas antimikroba ini dapat dikombinasikan dengan nanoteknologi, khususnya nanopartikel perak (AgNPs). Perak dipilih karena telah lama dikenal memiliki aktivitas antimikroba berspektrum luas yang efisien melawan ratusan jenis bakteri, virus, dan jamur (Handayani dkk., 2009). Proses sintesis AgNPs dapat dilakukan secara ramah lingkungan melalui metode sintesis hijau, di mana senyawa fitokimia dari daun melinjo berperan ganda. Senyawa polifenol seperti flavonoid dan tanin, yang kaya akan gugus hidroksil (-OH), bertindak sebagai bioreduktor dengan mendonorkan elektron untuk mereduksi ion perak (Ag^+) menjadi atom perak netral (Ag^0). Gugus fungsi yang sama kemudian berikatan dengan permukaan nanopartikel perak yang terbentuk, berfungsi sebagai agen penudung (*capping agent*) yang mencegah aglomerasi dan menjaga stabilitas partikel (Bere dkk., 2019).

Aplikasi nanoteknologi dalam industri pangan menawarkan solusi inovatif untuk pengawetan makanan, terutama melalui penggunaan aditif nano (*nanoadditives*) dan pelapis nano (*nanocoatings*). Bahan-bahan fungsional seperti antimikroba dan antioksidan dapat direkayasa dalam skala nano untuk meningkatkan efektivitasnya dalam melindungi makanan dari kerusakan. Secara spesifik, partikel nano dari perak, seng oksida, dan titanium dioksida sering dimasukkan ke dalam bahan pelapis atau kemasan sebagai agen antimikroba yang kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri, ragi, dan jamur yang dapat menyebabkan pembusukan. Nanoteknologi memungkinkan pengembangan kemasan aktif dan cerdas yang tidak hanya memperpanjang masa simpan dengan mencegah oksidasi dan kontaminasi mikroba, tetapi juga dapat merespons kondisi lingkungan dan mendeteksi kebusukan (Ariningsih, 2016).

Di sisi lain, penggunaan daun melinjo sebagai agen reduksi dalam biosintesis AgNPs masih minim diteliti dari aspek aktivitas terhadap jamur, khususnya genus

Candida. Sebagian besar penelitian hanya berhenti pada karakterisasi fisikokimia dan uji aktivitas antibakteri dasar (Honga dkk., 2019). Hingga saat ini belum ditemukan studi yang secara eksplisit mengevaluasi aktivitas anti-*Candida* dari AgNPs berbasis ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs), baik secara *in vitro* maupun dalam sistem makanan yang sesungguhnya. Lebih jauh, aplikasi AgNPs dalam pangan masih didominasi oleh studi eksperimental di laboratorium, tanpa banyak data tentang efektivitas pengawetan langsung pada makanan seperti minuman, buah olahan, atau produk fermentasi. Studi *in vivo* atau dalam kondisi penyimpanan riil masih sangat terbatas (Abdallah & Ali, 2022). Oleh karena itu, terdapat celah penelitian penting untuk mengeksplorasi apakah AgNPs dari ekstrak daun melinjo tidak hanya aktif terhadap *Candida* spp., tetapi juga layak digunakan sebagai pengawet pangan berbasis nanopartikel yang aman dan berkelanjutan.

I.2 Identifikasi Masalah

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

1. Bagaimana karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo dan bagaimana efisiensi rendemen yang dihasilkan melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol *absolute* (99,5%)?
2. Bagaimana proses sintesis hijau nanopartikel perak dengan menggunakan ekstrak daun melinjo serta bagaimana aktivitas anti-*Candida* dari ekstrak dan ML-AgNPs?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs dalam menekan pertumbuhan jamur pada keju dengan berbagai konsentrasi dan kondisi penyimpanan yang berbeda?

I.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan dan memvalidasi metode sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak daun melinjo dan mengevaluasi pengaruhnya sebagai agen antijamur terhadap pertumbuhan *Candida* spp. melalui aplikasi sebagai pengawet alami pada keju.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Menganalisis karakteristik fisikokimia dan menentukan rendemen hasil ekstraksi bubuk daun melinjo.
2. Mensintesis nanopartikel perak yang dimediasi oleh ekstrak daun melinjo, dan menentukan aktivitas anti-*Candida* dari ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs.
3. Mengevaluasi pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak dan ML-AgNPs terhadap pertumbuhan jamur pada keju dengan berbagai konsentrasi dan kondisi penyimpanan yang berbeda.

I.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang penulis harapkan dari penelitian ini adalah:

- Memberikan data ilmiah komprehensif mengenai karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.) serta efisiensi rendemen yang dihasilkan melalui metode ekstraksi menggunakan etanol *absolute*.
- Memperkaya literatur dalam bidang nanobioteknologi pangan mengenai proses sintesis hijau nanopartikel perak (ML-AgNPs) yang dimediasi oleh ekstrak bahan alam lokal, serta memberikan bukti ilmiah bahwa ML-AgNPs secara signifikan meningkatkan efektivitas aktivitas anti-*Candida* dibandingkan dengan penggunaan ekstrak murni.
- Memberikan informasi dan inovasi bagi industri pangan mengenai pemanfaatan ML-AgNPs sebagai alternatif pengawet alami yang efektif dalam menghambat kontaminasi jamur pada produk keju.

I.5 Kerangka Pemikiran

Kontaminasi mikroba, khususnya oleh jamur dari genus *Candida*, merupakan salah satu permasalahan utama dalam industri pangan karena dapat menyebabkan kerusakan produk, menurunkan umur simpan, dan membahayakan kesehatan konsumen (Abdallah & Ali, 2022). Spesies *Candida* sering ditemukan sebagai kontaminan pada produk susu seperti keju, di mana pertumbuhannya dapat menyebabkan perubahan rasa, aroma, dan tekstur yang tidak diinginkan. Dampak dari kontaminasi ini tidak hanya merugikan secara ekonomi, tetapi juga berpotensi

menjadi sumber infeksi oportunistik jika dikonsumsi oleh individu dengan sistem imun yang lemah. Dalam upaya mengatasi permasalahan tersebut, penggunaan pengawet sintetis masih menjadi pilihan utama, namun meningkatnya kesadaran konsumen terhadap risiko kesehatan telah mendorong pencarian bahan alami yang aman dan ramah lingkungan (Jangid dkk., 2025).

Salah satu inovasi yang menjanjikan dalam bidang ini adalah penerapan nanoteknologi, khususnya penggunaan AgNPs. AgNPs telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba yang luas, termasuk terhadap jamur patogen seperti *Candida* spp., melalui mekanisme merusak dinding sel, menghambat enzim, dan memicu stres oksidatif. Namun, metode sintesis konvensional AgNPs sering kali menggunakan bahan kimia berbahaya dan tidak ramah lingkungan, sehingga tidak sesuai dengan prinsip *green chemistry* dan standar keamanan pangan.

Untuk menjawab tantangan tersebut, pendekatan sintesis hijau (*green synthesis*) muncul sebagai solusi berkelanjutan. Sintesis hijau memanfaatkan senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan sebagai agen reduktor dan penstabil dalam proses pembentukan nanopartikel. Berbagai penelitian telah membuktikan keberhasilan penggunaan ekstrak tanaman, seperti sintesis AgNPs menggunakan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) berhasil menghasilkan nanopartikel berbentuk batang dengan aktivitas antioksidan (Taba dkk., 2019), ekstrak daun serai (*Cymbopogon citratus*) terbukti mampu membentuk AgNPs yang stabil dalam kondisi pH basa (Qurratayun dkk., 2022), serta ekstrak kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) juga berhasil digunakan sebagai bioreduktor untuk menghasilkan AgNPs dengan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* (Nuryanti dkk., 2024).

Salah satu sumber hayati yang potensial dalam sintesis hijau AgNPs adalah melinjo (*G. gnemon* L.), tanaman khas Indonesia yang dikenal mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin dengan aktivitas antioksidan dan antimikroba. Studi sebelumnya membuktikan bahwa ekstrak daun maupun kulit buah melinjo memiliki

efek antibakteri terhadap *S. aureus* dan *Salmonella typhi* (Honga dkk., 2019), serta berpotensi dalam pembentukan nanopartikel perak yang stabil (Ely dkk., 2025). Namun, efektivitas anti-*Candida* dari AgNPs yang disintesis menggunakan daun melinjo, terutama dalam konteks aplikasi sebagai pengawet makanan, masih sangat terbatas dan belum banyak dieksplorasi.

Berdasarkan landasan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengisi celah ilmiah dengan mengkaji proses sintesis hijau AgNPs berbasis ekstrak daun melinjo, mengevaluasi aktivitas anti-*Candida*-nya, serta menilai potensi aplikasinya sebagai pengawet makanan yang alami dan aman. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan bahan pengawet inovatif berbasis nanoteknologi berkelanjutan.

I.6 Hipotesis Penelitian

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

- Diduga bubuk daun melinjo dapat dikarakterisasi dan dapat diekstraksi menggunakan etanol *absolute*.
- Diduga ekstrak daun melinjo dapat disintesis menjadi ML-AgNPs dan memiliki aktivitas anti-*Candida*.
- Diduga ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs dapat mereduksi aktivitas pertumbuhan jamur pada keju.

I.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari tanggal 12 Agustus 2025 hingga 9 September 2025.

Penelitian dilakukan di Laboratorium-Laboratorium Fakultas Ilmu dan Teknologi Pangan, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia dengan rincian:

- Laboratorium Pemrosesan Makanan untuk pembuatan dan karakterisasi bubuk daun melinjo,
- Laboratorium Kimia Makanan untuk proses ekstraksi bubuk daun melinjo,

- Laboratorium Mikrobiologi Makanan untuk pengujian anti-*Candida* dan evaluasi aplikasi pada bahan makanan.



Bab II Tinjauan Pustaka

Bab ini menguraikan mengenai: (2.1) Keju, (2.2) *Candida* spp., (2.3) Pengawet Pada Keju, (2.4) Melinjo, dan (2.5) Nanoteknologi

II.1 Keju

II.1.1 Tinjauan Keju

Keju (Gambar II.1) adalah produk pangan yang diperoleh dari proses koagulasi protein susu, terutama kasein, yang dipisahkan dari bagian cairnya (*whey*). Proses ini dapat diinduksi oleh penambahan enzim rennet atau melalui pengasaman oleh bakteri asam laktat. Setelah pemisahan, dadih (*curd*) yang terbentuk kemudian diproses lebih lanjut melalui berbagai tahapan seperti pencetakan, penggaraman, dan pematangan (*ripening* atau *aging*) untuk menghasilkan ratusan jenis keju dengan karakteristik rasa, aroma, tekstur, dan penampilan yang berbeda-beda (Dewi, 2007).



Gambar II.1 Keju

Sebagai produk turunan susu, keju memiliki komposisi gizi yang kaya, meliputi protein, lemak, mineral (terutama kalsium), dan vitamin (Anggraeni, 2017). Menurut TKPI (2020), komposisi gizi pada keju disajikan pada Tabel II.1.

Tabel II.1. Komposisi Gizi Keju

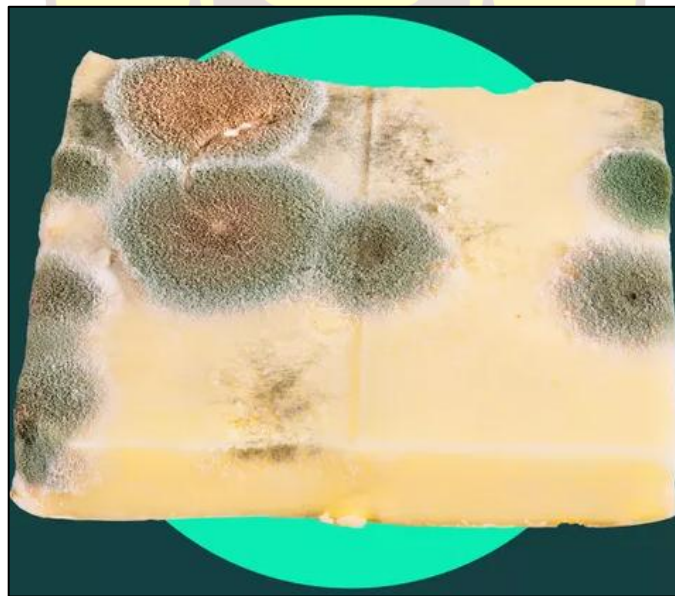
Komposisi Gizi	Jumlah/100 gram
Air	38,5 g
Protein	22,8 g
Lemak	20,3 g
Karbohidrat	13,1 g
Abu	5,3 g
Kalsium	777 mg
Fosfor	338 mg
Natrium	1410 mg
Vitamin C	1 mg

Di antara berbagai jenis keju yang ada di pasaran, keju segar (*fresh cheese*) atau keju asli (*natural cheese*) merupakan salah satu varian yang paling diminati oleh konsumen. Keju jenis ini diproduksi langsung dari susu murni tanpa melalui proses pematangan (fermentasi lanjutan) dan diformulasikan tanpa penambahan bahan tambahan pangan (BTP) sintetik yang kompleks (Losito dkk., 2014). Konsep keju alami tanpa pengawet ini sejalan dengan tren kesehatan modern (*clean label trend*), di mana konsumen semakin kritis dan cenderung menghindari penggunaan pengawet kimia sintetik seperti kalium sorbat, natrium benzoat, atau nisin buatan karena kekhawatiran akan potensi efek samping iritasi dan risiko karsinogenik dalam jangka panjang (Fadhlorrohman dkk., 2023a). Namun demikian, ketiadaan pengawet sintetik pada keju segar menghadirkan tantangan besar bagi industri pangan. Keju asli tanpa pengawet memiliki aktivitas air (a_w) dan kadar air yang relatif tinggi, sehingga menjadikannya media yang sangat ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme perusak, terutama kapang dan khamir (Srikandi, 2012). Umur simpan keju jenis ini cenderung sangat singkat jika hanya mengandalkan suhu

pendinginan. Oleh karena itu, industri saat ini terdorong untuk mengeksplorasi pendekatan pengawetan alternatif alami yang mampu mempertahankan umur simpan dan keamanan mikrobiologis keju asli tanpa menghilangkan persepsi alaminya di mata konsumen.

II.1.2 Kontaminan Pada Keju

Selain mikroorganisme yang sengaja ditambahkan dan berperan dalam proses pematangan (kultur starter), keju juga rentan terhadap kontaminasi oleh mikroorganisme pembusuk (Aisyah dkk., 2024). *Fresh cheese* memiliki kelembaban yang cukup tinggi sehingga khamir dapat ditemukan di dalamnya, salah satunya yaitu khamir genus *Candida* pada keju Halloumi (Aliifah dkk., 2023). Pertumbuhan khamir yang melimpah pada permukaan keju dapat menyebabkan masalah sensoris dan fisik, seperti kulit keju yang menjadi berlendir serta mengalami perubahan warna menjadi kehijauan atau kehitaman (Gambar II.2).



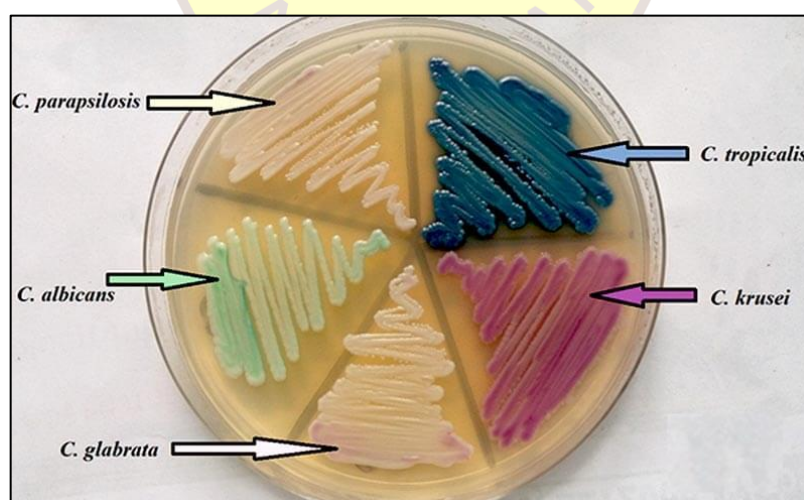
Gambar II.2. Pertumbuhan Jamur pada Keju (foodandwine.com)

Secara lebih spesifik, spesies khamir seperti *C. albicans*, *C. intermedia*, dan *C. parapsilosis* sangat adaptif dan mampu memetabolisme asam laktat serta sitrat, sehingga mereka dapat bertahan hidup dengan baik pada lingkungan keju yang

memiliki pH rendah, kadar garam tinggi, maupun pada suhu penyimpanan dingin (Ahmed dkk., 2025a). Kontaminasi *Candida* pada keju umumnya memicu pembentukan gas yang berlebihan, serta menghasilkan aroma dan rasa yang menyimpang akibat tingginya aktivitas enzim proteolitik dan lipolitik ekstraseluler yang mendegradasi matriks keju (Garnier dkk., 2017a). Selain merugikan secara ekonomi akibat kerusakan mutu produk yang menurunkan umur simpan, beberapa spesies *Candida* dikenal sebagai patogen oportunistik yang berpotensi menimbulkan infeksi atau risiko kesehatan bagi konsumen, sehingga pengendalian kontaminasi khamir ini sangat krusial dalam industri pengolahan pangan (Yibar dkk., 2024b).

II.2 *Candida* spp.

Genus *Candida* (Gambar II.3) adalah kelompok khamir yang secara alami merupakan bagian dari mikrobiota normal pada kulit, mulut, serta saluran pencernaan dan genital manusia. *Candida* spp. juga dapat dijumpai di lingkungan, terutama pada daun, bunga, air, dan tanah. Namun, dalam kondisi tertentu seperti penurunan imunitas inang, *Candida* dapat berubah menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi yang dikenal sebagai kandidiasis (Mutiawati, 2016).



Gambar II.3. Koloni *Candida* pada CHROMagar *Candida* (Mokobi, 2022)

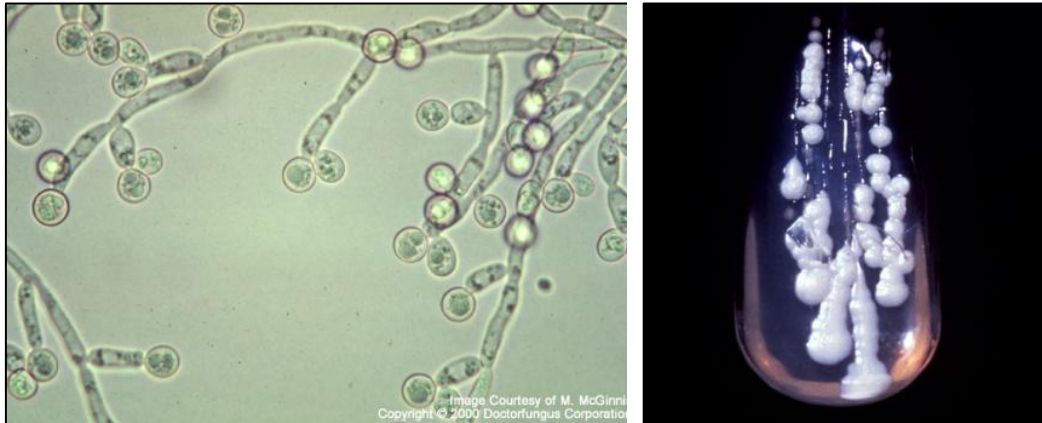
Genus *Candida* mencakup sekitar 154 spesies. Di antara spesies-spesies ini, enam spesies paling sering diisolasi pada infeksi manusia. Meskipun *C. albicans* adalah spesies yang paling banyak ditemui dan signifikan, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, dan *C. lusitaniae* juga diisolasi sebagai agen penyebab infeksi *Candida*. Klasifikasi taksonomi *Candida* secara lengkap disajikan pada Tabel II.2.

Tabel II.2. Taksonomi *Candida*

Level Taksonomi	Nama Taksonomi
Kingdom	Fungi
Divisi	Ascomycota
Subdivisi	Ascomycotina
Kelas	Ascomycetes
Ordo	Saccharomycetales
Famili	Saccharomycetaceae
Genus	<i>Candida</i>

II.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans (Gambar II.4) merupakan spesies yang paling umum diisolasi dan menjadi penyebab utama kandidiasis di seluruh dunia. Secara morfologis, mikroorganisme ini memiliki kemampuan unik untuk berubah bentuk antara sel ragi (oval), pseudohifa, dan hifa sejati tergantung pada kondisi lingkungan, yang dikenal sebagai kemampuan dimorfisme (Mayer dkk., 2013).



Gambar II.4. *Candida albicans* (drfungus.org)

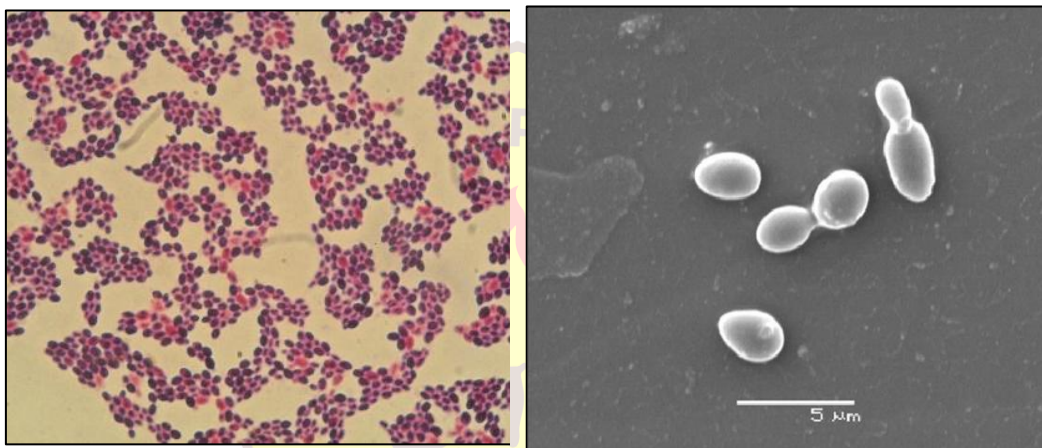
C. albicans memiliki berbagai faktor virulensi, termasuk kemampuan adhesi pada permukaan biotik maupun abiotik, sekresi enzim hidrolitik seperti protease dan lipase, serta pembentukan biofilm yang sangat terorganisir (Talapko dkk., 2021). Pertumbuhan optimalnya biasanya terjadi pada suhu 37°C, namun memiliki plastisitas metabolik yang tinggi sehingga mampu beradaptasi pada berbagai rentang suhu dan kondisi pH yang berubah-ubah (Nobile & Johnson, 2015).

Dalam industri pangan, *C. albicans* sering diidentifikasi sebagai mikroorganisme kontaminan yang signifikan, terutama pada produk olahan susu seperti keju. Kandungan nutrisi yang tinggi pada susu, terutama glukosa pada susu formula, dapat mendukung pertumbuhan *C. albicans* secara signifikan (Padang dkk., 2020). Kehadiran khamir ini pada keju umumnya berasal dari sanitasi yang kurang maksimal selama proses produksi atau kontaminasi pasca pengolahan dari lingkungan pabrik. *C. albicans* mampu memanfaatkan residu laktosa dan asam laktat dalam keju sebagai sumber karbon, yang mengakibatkan perubahan karakteristik biokimia keju melalui aktivitas proteolitik dan lipolitik (Ahmed dkk., 2025a). Aktivitas metabolik ini secara langsung menyebabkan kerusakan sensoris berupa perubahan warna, pelunakan tekstur, serta timbulnya aroma tajam yang menyimpang (*off flavor*). Mengingat statusnya sebagai patogen manusia, keberadaan *C. albicans* pada keju asli tanpa pengawet tidak hanya menurunkan nilai ekonomi produk akibat kerusakan mutu, tetapi juga menjadi ancaman serius

bagi keamanan pangan karena potensi risiko infeksi bagi konsumen dengan sistem imun rendah (Garnier dkk., 2017a).

II.2.2 *Candida glabrata*

Candida glabrata (Gambar II.5) merupakan khamir haploid non-dimorfik yang menempati posisi sebagai penyebab kandidiasis manusia kedua atau ketiga paling umum di seluruh dunia setelah *C. albicans*. Berbeda dengan *C. albicans*, mikroorganisme ini hanya tumbuh dalam bentuk ragi (blastospora) berukuran kecil (1–4 μm) dan tidak membentuk hifa atau pseudohifa sejati (Mokobi, 2022).



Gambar II.5. *Candida glabrata* (gbif.org dan Mokobi, 2022)

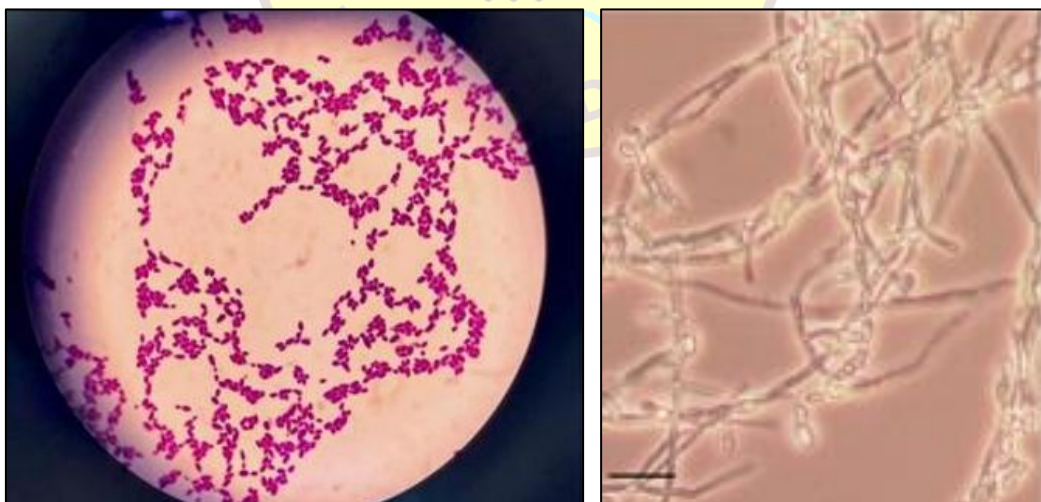
Secara genetik, *C. glabrata* memiliki kedekatan filogenetik yang lebih erat dengan *S. cerevisiae* dibandingkan dengan spesies *Candida* lainnya, namun ia telah berevolusi menjadi patogen oportunistik yang sangat tangguh melalui strategi pemanfaatan nutrisi yang efisien dan mekanisme pertahanan terhadap stres oksidatif (Ahmad dkk., 2014). Salah satu karakteristik klinis yang paling menonjol dari *C. glabrata* adalah tingkat resistensi intrinsik yang tinggi terhadap berbagai agen antifungal golongan azol, yang menjadikannya tantangan besar dalam pengendalian mikroba (Uçak & Şatana, 2021).

Dalam sistem pangan, *C. glabrata* dikenal sebagai kontaminan yang memiliki ketahanan luar biasa terhadap kondisi lingkungan ekstrem, termasuk paparan asam

organik dan tekanan osmotik tinggi yang sering ditemukan pada keju. Khamir ini mampu beradaptasi pada produk turunan susu dengan cara meregulasi ekspresi genetiknya untuk memanfaatkan sumber karbon alternatif saat glukosa terbatas, yang sering kali memicu degradasi komponen lemak dan protein pada keju (Ahmad dkk., 2014). Kontaminasi *C. glabrata* pada keju asli tanpa pengawet sering kali berujung pada kerusakan kualitas berupa pembentukan tekstur yang lembek dan aroma fermentasi yang tidak diinginkan akibat produksi metabolit sekunder. Selain merusak mutu fisik, keberadaannya pada produk pangan segar menjadi perhatian serius bagi keamanan pangan karena sifatnya yang sulit dieliminasi dengan metode pengawetan konvensional serta risiko kesehatan yang ditimbulkannya bagi konsumen dengan gangguan sistem imun (Ahmed dkk., 2025a).

II.2.3 *Candida krusei*

Berbeda dengan sebagian besar spesies *Candida* pada umumnya, *Candida krusei* (Gambar II.6) yang dalam taksonomi modern juga diklasifikasikan dengan nama *Pichia kudriavzevii*, menunjukkan karakteristik genetik dan struktural yang cukup berbeda.



Gambar II.6. *Candida krusei* (Xu dkk., 2025 dan Gaviria & Mora, 2020)

Tingkat kekerabatan *C. krusei* dianggap lebih jauh dari spesies *Candida* lainnya. Hal ini dibuktikan oleh adanya perbedaan komposisi penyusun dinding sel serta jumlah kromosomnya yang hanya terdiri dari 8 kromosom, separuh dari jumlah yang dimiliki oleh *C. albicans* (Fatril & Adawiyah, 2025). Hal mencolok dari spesies ini terletak pada tingkat ketahanannya yang luar biasa. *C. krusei* diketahui memiliki resistensi bawaan (intrinsik) terhadap terapi antijamur standar seperti flukonazol, dan infeksi sistemik yang dipicunya memiliki persentase mortalitas yang sangat memprihatinkan, yakni menyentuh angka 40% hingga 58% pada individu dengan sistem imun yang rentan (Fatril & Adawiyah, 2025).

Dalam ekosistem pengolahan pangan, ketahanan *C. krusei* membuatnya mampu bertahan di lingkungan yang tidak ramah bagi mikroorganisme lain, termasuk pada produk keju segar. Khamir ini dibekali daya adaptasi yang cukup untuk menoleransi kondisi stres lingkungan seperti tingkat salinitas (kadar garam) yang pekat dan suasana asam yang merupakan karakteristik inheren dari produk fermentasi susu (Pereira dkk., 2022b). Walaupun dalam beberapa kasus fermentasi tradisional keberadaannya dapat ditoleransi, lonjakan populasi *C. krusei* yang tidak terkendali akan memicu proses pembusukan secara masif. Aktivitas enzim ekstraselulernya akan merombak struktur protein dan lemak pada keju secara berlebihan, merusak tekstur fisik produk, dan menghasilkan profil aroma serta rasa yang menyimpang. Kombinasi antara daya tahannya yang tinggi di fasilitas pengolahan serta resistensi alaminya terhadap agen antimikroba konvensional menjadikan khamir ini sebagai kontaminan yang sulit diberantas, sekaligus menghadirkan ancaman nyata bagi keamanan pangan produk keju tanpa pengawet tambahan (Garnier dkk., 2017a).

II.2.4 *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis (Gambar II.7) merupakan spesies yang unik di antara kelompok *Non-Albicans Candida* (NAC) karena ekologi alaminya yang sangat lekat dengan aktivitas keseharian manusia.



Gambar II.7. *Candida parapsilosis* (Sumber: Mokobi, 2022)

Berbeda dari *C. albicans* yang umumnya berkolonisasi di mukosa saluran pencernaan, spesies ini lebih sering diisolasi dari lingkungan eksternal dan secara alami mendiami permukaan kulit manusia, terutama pada area tangan. Karakteristik biologis utama yang membuat *C. parapsilosis* patut diwaspadai adalah kemampuannya yang sangat tangguh dalam membentuk struktur biofilm pada berbagai permukaan benda mati. Kemampuan adhesi seluler dan formasi biofilm ini tidak hanya melindunginya dari fluktuasi lingkungan yang ekstrem, tetapi juga memungkinkannya bertahan dari paparan bahan pembersih sanitasi maupun agen antimikroba standar, menjadikannya salah satu agen infeksi nosokomial yang paling persisten (Trofa dkk., 2008). Dalam ranah industri pengolahan susu dan keju, sifat komensal *C. parapsilosis* pada tangan pekerja menjadikannya ancaman nyata sebagai sumber utama kontaminasi silang. Perpindahan mikroorganisme ini ke dalam produk pangan sangat rentan terjadi pada tahapan produksi konvensional yang melibatkan kontak fisik secara langsung, seperti pada saat proses pencetakan dadih, penggaraman, maupun pengemasan akhir keju. Setelah berhasil menginfiltrasi matriks keju, *C. parapsilosis* mampu mengekskresikan enzim lipolitik dan proteolitik ekstraseluler yang secara aktif mendegradasi komponen makronutrien produk (Pereira dkk., 2022b). Aktivitas perombakan enzimatik tersebut pada akhirnya memicu ketengikan, pelunakan tekstur yang berlebihan, serta penurunan drastis pada kualitas organoleptik keju segar, sehingga umur

simpannya di pasaran menjadi sangat terbatas tanpa adanya intervensi pengawet alami yang memadai (Garnier dkk., 2017a).

II.3 Pengawet Pada Keju

Pengawetan pada keju merupakan tahapan krusial dalam industri pengolahan susu yang bertujuan untuk memperpanjang umur simpan, mempertahankan kualitas organoleptik, serta menjamin keamanan mikrobiologis produk dari kontaminasi bakteri patogen maupun agen pembusuk seperti kapang dan khamir (Srikandi, 2012). Fungsi utama pengawet adalah menciptakan kondisi lingkungan yang tidak mendukung pertumbuhan mikroorganisme perusak, baik melalui penghambatan aktivitas enzimatik seluler maupun kerusakan permeabilitas membran sel mikroba. Sebagai gambaran, keju segar atau keju asli yang diproduksi murni tanpa tambahan bahan pengawet umumnya memiliki daya tahan yang sangat singkat, yakni hanya berkisar dari beberapa hari hingga maksimal beberapa minggu pada suhu pendinginan. Hal ini disebabkan oleh tingginya aktivitas air (a_w) dan kepadatan nutrisi di dalamnya. Sebaliknya, produk keju yang telah diberi perlakuan pengawet komersial dapat bertahan hingga beberapa bulan tanpa mengalami degradasi mutu fisik maupun biologis yang signifikan (Losito dkk., 2014).

Untuk mengatasi keterbatasan umur simpan tersebut, industri pangan secara konvensional sangat bergantung pada penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) berupa pengawet buatan atau sintetik. Beberapa jenis pengawet sintetik yang paling umum diaplikasikan pada produk keju antara lain kalium sorbat (Gambar II.8), natrium benzoat, asam propionat, dan natamycin (Garnier dkk., 2017b).



Gambar II.8. Kalium Sorbat (id.made-in-china.com)

Pengawet buatan ini sering menjadi pilihan utama industri karena harganya yang sangat ekonomis, stabilitasnya yang tinggi selama proses pengolahan, serta efisiensi penghambatan yang baik meskipun digunakan pada konsentrasi yang sangat rendah. Namun demikian, ketergantungan pada pengawet sintetik mulai menjadi perbincangan di kalangan konsumen dan praktisi kesehatan. Penggunaan secara terus-menerus dikhawatirkan dapat memicu berbagai masalah kesehatan jangka panjang, mulai dari reaksi alergi alergenik, iritasi saluran pencernaan, gangguan mikrobiota usus, hingga potensi risiko karsinogenik akibat akumulasi residu kimiawi tertentu di dalam tubuh (Fadhlorrohman dkk., 2023b).

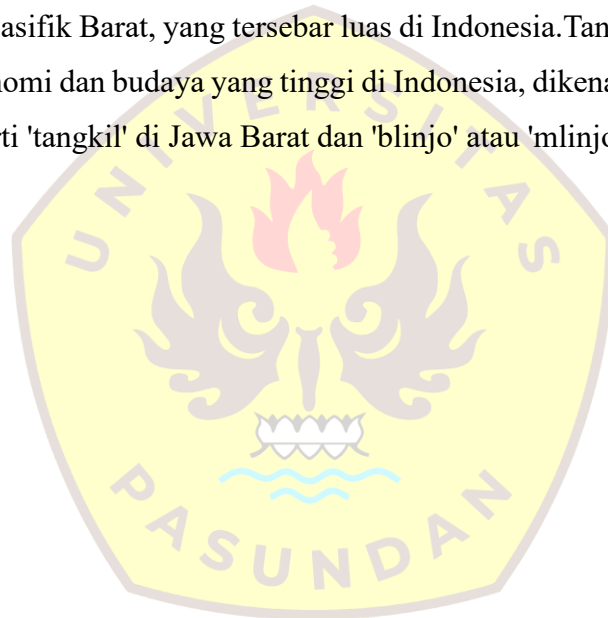
Sebagai respons terhadap tuntutan konsumen akan produk berlabel bersih (*clean label*) yang lebih aman, berbagai penelitian mulai gencar mengembangkan penggunaan pengawet alami pada keju. Jenis pengawet alami yang banyak dieksplorasi meliputi penggunaan kitosan, bakteriosin (seperti nisin), hingga pemanfaatan ekstrak tumbuhan yang kaya akan senyawa bioaktif antimikroba dan antioksidan, seperti ekstrak teh hitam, ekstrak bunga rosella, minyak atsiri, hingga ekstrak daun melinjo (Anggraeni, 2017). Pengawet alami ini telah banyak diuji coba aplikasinya pada berbagai varian keju, mulai dari keju mozzarella, *cheddar*, hingga keju segar (*cottage cheese*). Kelebihan utama dari pengawet alami adalah status keamanannya yang terjamin bagi kesehatan tubuh/GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dan kemampuannya memberikan nilai fungsional tambahan

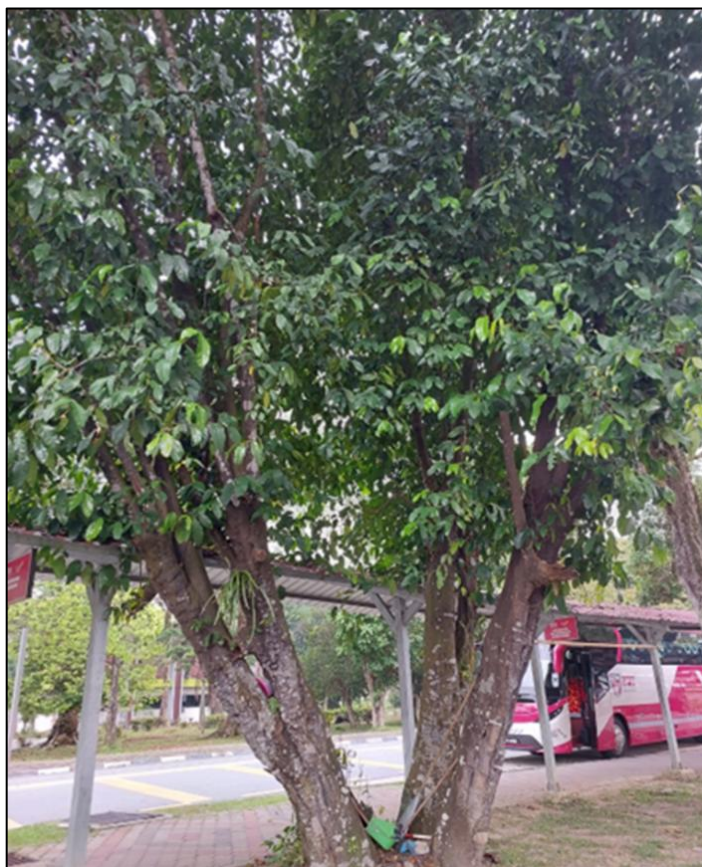
pada produk. Akan tetapi, aplikasi pengawet alami juga dihadapkan pada beberapa kelemahan, di antaranya adalah dibutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menyamai efektivitas pengawet sintetik, biaya produksi dan ekstraksi yang cenderung lebih mahal, serta adanya risiko perubahan profil sensoris, seperti timbulnya rasa getir atau aroma khas tumbuhan yang dapat memengaruhi tingkat penerimaan konsumen terhadap rasa asli keju (Fadhlorrohman dkk., 2023b).

II.4 Melinjo

II.4.1 Morfologi Melinjo

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) (Gambar II.9) merupakan tanaman asli Asia Tenggara dan Kepulauan Pasifik Barat, yang tersebar luas di Indonesia. Tanaman ini memiliki signifikansi ekonomi dan budaya yang tinggi di Indonesia, dikenal dengan berbagai nama lokal seperti 'tangkil' di Jawa Barat dan 'blinjo' atau 'mlinjo' di Jawa Tengah.





Gambar II.9. Pohon Melinjo

Secara taksonomi, melinjo diklasifikasikan secara lengkap dalam Tabel II.3.

Tabel II.3. Taksonomi Melinjo

Level Taksonomi	Nama Taksonomi
Kingdom	Plantae
Divisi	Gnetophyta
Subdivisi	Gymnospermae
Kelas	Gnetopsida
Ordo	Gnetales
Famili	Gnetaceae
Genus	<i>Gnetum</i>
Spesies	<i>Gnetum gnemon</i> Linn

(Sumber: Listyati, 2019)

Berbeda dengan anggota genus *Gnetum* lainnya yang umumnya berupa liana (tumbuhan pemanjat dengan batang berkayu), melinjo tumbuh sebagai pohon kokoh yang dapat mencapai ketinggian 8 hingga 15 meter dan dapat hidup hingga 100 tahun. Tanaman ini dapat tumbuh di berbagai kondisi, mulai dari dataran rendah hingga ketinggian 1.200 meter di atas permukaan laut, menjadikannya mudah diakses di seluruh wilayah Indonesia (Listiyati, 2019). Batangnya kokoh dan bisa dimanfaatkan sebagai bahan bangunan. Kayunya dapat dipakai sebagai bahan papan. Daunnya tunggal berbentuk oval dengan ujung tumpul. Melinjo tidak menghasilkan bunga dan buah sejati karena bukan termasuk tumbuhan berbunga, yang dianggap sebagai buah sebenarnya adalah biji yang terbungkus oleh selapis aril yang berdaging. Melinjo jarang dibudidayakan secara intensif karena tingkat konsumsi yang tidak begitu banyak di antara tanaman pangan lainnya. Kebanyakan dari masyarakat Indonesia lebih familiar dengan emping melinjo (Puarada dkk., 2020).

Daun melinjo (Gambar II.10) merupakan daun tunggal yang duduk saling berhadapan pada ranting. Bentuk daunnya bulat oval hingga lonjong dengan tepi yang rata, ujung dan pangkal yang runcing, serta sistem pertulangan daun menyirip.



Gambar II.10. Daun Melinjo

Daun yang sudah tua berwarna hijau tua mengkilap dengan panjang berkisar antara 10-20 cm dan lebar 4-7 cm. Daun melinjo tidak hanya dimanfaatkan sebagai bahan pangan, tetapi juga memiliki potensi sebagai obat herbal karena kandungan nutrisi dan senyawa bioaktif di dalamnya. Menurut TKPI (2020), kandungan gizi pada 100 gram daun melinjo segar disajikan pada Tabel II.4.

Tabel II.4. Komposisi Gizi Daun Melinjo Segar

Komposisi Gizi	Jumlah/100 gram
Air	70,8 g
Protein	5 mg
Lemak	1,3 g
Karbohidrat	21,3 mg
Abu	1,6 g
Kalsium	219 mg
Fosfor	82 mg
Natrium	12 mg
Vitamin C	182 mg

II.4.2 Fisikokimia Melinjo

Fisikokimia merupakan gabungan dari sifat fisik (hal yang dapat diukur secara mekanis atau visual) dan sifat kimia dasar dari suatu bahan pangan. Melinjo (*G. gnemon* L.) merupakan tanaman berbiji terbuka yang seluruh bagian tanamannya, mulai dari biji, bunga, hingga daun, memiliki karakteristik fisikokimia yang bernilai guna. Secara fisikokimia, buah melinjo dikenal memiliki kandungan gizi yang tinggi, terutama pada bagian bijinya yang kaya akan karbohidrat dan protein. Perubahan fisik pada buah melinjo, seperti transisi warna dari hijau menjadi kuning hingga merah tua saat matang, menandakan adanya perubahan konsentrasi pigmen dan kematangan fisiologis yang memengaruhi komposisi kimia di dalamnya. Meskipun bijinya lebih umum dikonsumsi sebagai bahan pangan, bagian daun melinjo memiliki profil fisikokimia yang sangat potensial untuk dikembangkan dalam teknologi nanopartikel.

Secara fisik, penelitian ini secara spesifik memanfaatkan daun melinjo tua yang telah mencapai tingkat kematangan fisiologis optimal, yakni daun yang diambil dari pohon yang sudah mulai menunjukkan pertumbuhan bunga atau buah. Pemilihan daun tua ini didasarkan pada pertimbangan bahwa pada fase kematangan tersebut, jaringan daun telah mengakumulasi berbagai senyawa metabolit sekunder (fitokimia) dalam jumlah yang melimpah dan stabil untuk digunakan dalam proses ekstraksi. Secara visual, daun tua ini memiliki karakteristik warna hijau yang lebih gelap dengan tekstur yang lebih kaku dibandingkan daun muda. Parameter fisikokimia seperti kadar air dan aktivitas air (a_w) menjadi sangat krusial dalam tahap ini, di mana penurunan kadar air melalui proses pengeringan menjadi bubuk bertujuan untuk menjaga stabilitas bahan baku. Kadar air yang rendah dan a_w yang terkontrol di bawah ambang batas terbukti efektif menghambat aktivitas enzimatik serta mencegah pertumbuhan mikroorganisme perusak yang dapat mendegradasi senyawa aktif di dalam bahan (Santoso dkk., 2010).

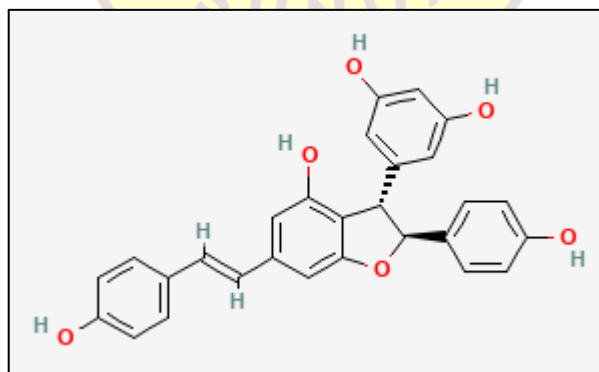
Karakteristik kimia daun melinjo juga ditentukan oleh profil derajat keasaman (pH) yang cenderung berada pada rentang asam lemah. Nilai pH ini dipengaruhi oleh akumulasi berbagai asam organik serta senyawa metabolit sekunder yang tersimpan di dalam jaringan sel daun tua. Karakteristik pH pada ekstrak daun melinjo memegang peranan vital dalam keberhasilan proses sintesis hijau nanopartikel perak. Kondisi kimiawi yang asam lemah ini sangat ideal untuk memfasilitasi kelancaran proses reduksi ion perak (Ag^+) menjadi nanopartikel perak, sekaligus membantu menjaga stabilitas koloid agar tidak mudah mengalami aglomerasi atau penggumpalan selama proses sintesis (Pradabsang dkk., 2025).

II.4.3 Fitokimia Melinjo

Fitokimia merujuk pada senyawa metabolit sekunder yang diproduksi secara alami oleh tumbuhan. Senyawa ini bukan nutrisi utama (seperti karbohidrat atau protein), melainkan senyawa khusus yang biasanya berfungsi sebagai sistem pertahanan diri tumbuhan terhadap hama, penyakit, atau tekanan lingkungan. Daun melinjo diketahui kaya akan berbagai senyawa metabolit sekunder yang secara alami

diproduksi oleh tanaman sebagai sistem pertahanan mandiri terhadap ancaman lingkungan luar maupun serangan patogen. Berdasarkan berbagai uji skrining fitokimia, ekstrak daun melinjo secara konsisten terbukti mengandung kelompok senyawa bioaktif utama yang meliputi polifenol, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid (Trisha dkk., 2024). Di antara keseluruhan komponen organik tersebut, kelompok senyawa fenolik (polifenol) dan flavonoid merupakan fitokimia yang terakumulasi paling melimpah. Tingginya kuantitas kedua kelompok senyawa inilah yang menjadikannya sangat bernilai dan memegang peran paling krusial ketika diekstraksi untuk dimanfaatkan sebagai agen alami dalam proses sintesis nanopartikel.

Kelompok polifenol pada daun melinjo memiliki keunikan tersendiri, yakni didominasi oleh turunan senyawa stilbenoid oligomerik yang secara spesifik disebut sebagai kelompok *gnetin*. Beberapa senyawa utama dalam kelompok ini meliputi *gnetin C*, *gnetin D*, serta turunannya dalam bentuk glikosida yang disebut *gnemonosida* (seperti *gnemonosida A*, *C*, dan *D*). *Gnetin C* (Gambar II.11) merupakan gabungan dari dua molekul resveratrol yang dikenal memiliki stabilitas struktural tinggi dan aktivitas biologis yang jauh lebih kuat dibandingkan resveratrol tunggal.



Gambar II.11. Struktur Kimia *Gnetin C* (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Sementara itu, *gnetin D* dan *gnemonosida* juga memiliki karakteristik struktur berupa cincin aromatik ganda yang sarat akan ikatan gugus hidroksil (-OH) bebas.

Keberadaan struktur kimia yang kompleks dan gugus hidroksil yang sangat reaktif pada kelompok *gnetin* ini memberikan manfaat luar biasa bagi daun melinjo, menjadikannya agen antioksidan alami yang sangat kuat dan mampu memberikan efek toksisitas mematikan terhadap membran sel mikroorganisme patogen pembusuk (Pradabsang dkk., 2025).

Kelimpahan dan tingginya reaktivitas dari senyawa kelompok *gnetin* dan flavonoid yang menjadikan ekstrak daun melinjo sangat ideal untuk diaplikasikan dalam metode sintesis hijau. Dalam proses pembentukan nanomaterial, campuran senyawa bioaktif ini secara kolektif menjalankan fungsi ganda yang penting. Pertama, fitokimia berperan utama sebagai agen pereduksi (*bio-reductor*) alami yang bertugas mereduksi prekursor ion perak menjadi partikel nanopartikel perak padat. Kedua, senyawa-senyawa organik ini juga secara bersamaan bertindak sebagai agen penudung (*capping agent*) yang menyelimuti permukaan partikel nano. Penudungan ini sangat penting untuk menjaga kestabilan partikel perak yang baru terbentuk agar tidak saling bertabrakan dan menggumpal (aglomerasi). Mekanisme interaksi kimiawi antara fitokimia melinjo dan ion perak secara lebih rinci akan menjadi dasar bagi keberhasilan tahapan sintesis ML-AgNPs (Saidi, 2026).

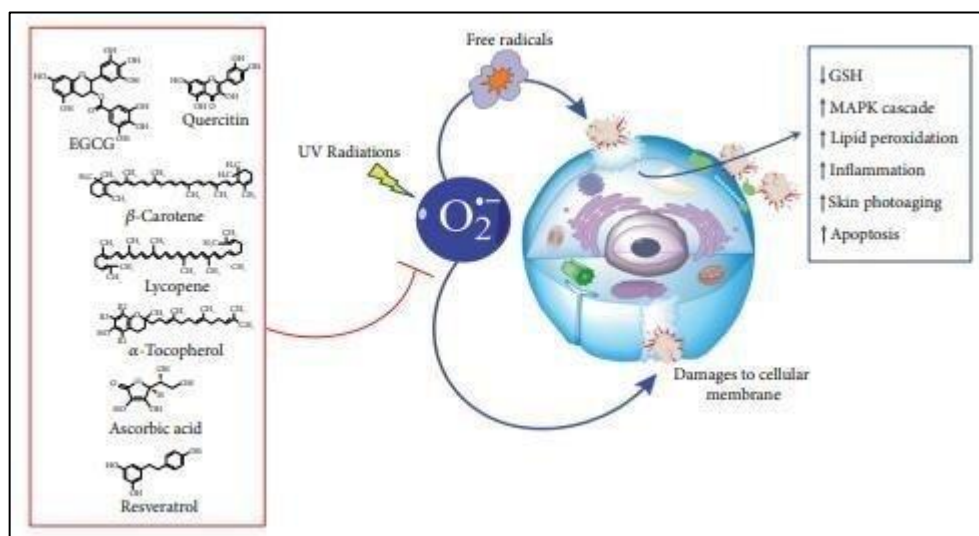
II.4.4 Bioaktivitas Melinjo

Bioaktivitas merujuk pada efek fisiologis, biologis, atau farmakologis yang ditimbulkan oleh suatu bahan alam ketika berinteraksi dengan sel hidup maupun sistem biologis. Tanaman melinjo (*G. gnemon* L.) telah lama dimanfaatkan secara empiris oleh masyarakat tradisional untuk menangani berbagai masalah kesehatan, mulai dari mengobati nyeri saat buang air kecil, penyakit mata, anemia, hingga penanganan luka gigitan anjing dan kondisi malnutrisi (Kining dkk., 2022). Secara farmakologis, ragam khasiat tradisional tersebut sangat erat kaitannya dengan tingginya profil bioaktivitas yang dimiliki oleh tanaman ini. Berbagai studi *in vitro* maupun *in vivo* telah membuktikan bahwa ekstrak dari berbagai bagian organ melinjo, terutama biji dan kulit bijinya, menunjukkan efek antioksidan yang sangat

baik, bertindak sebagai agen anti-inflamasi, serta memiliki aktivitas antimikroba berspektrum luas. Tingginya bioaktivitas ini secara langsung didorong oleh sinergi senyawa-senyawa fitokimia bioaktif di dalamnya, terutama oligomer stilbenoid dan polifenol, yang mampu menetralkan stres oksidatif serta merusak permeabilitas membran sel mikroba patogen (Kato dkk., 2009).

Ekstrak daun melinjo dikenal luas memiliki spektrum bioaktivitas yang sangat beragam dan menguntungkan. Seluruh kemampuan biologis ini tidak terlepas dari tingginya akumulasi senyawa metabolit sekunder di dalam jaringannya, sebagaimana yang telah diuraikan pada profil fitokimia sebelumnya. Senyawa-senyawa organik kompleks bekerja secara sinergis pada tingkat seluler untuk memicu respons pertahanan, perbaikan sel, hingga menunjukkan efek toksik yang selektif terhadap patogen atau mikroorganisme perusak.

Salah satu bioaktivitas utama yang dimiliki oleh daun melinjo dan sangat bermanfaat bagi tubuh manusia adalah kapasitas antioksidannya yang sangat tinggi. Aktivitas antioksidan ini secara langsung digerakkan oleh keberadaan senyawa *gnetin C* dan *gnetin D* yang kaya akan ikatan gugus hidroksil bebas. Ketika dikonsumsi dan masuk ke dalam tubuh manusia, senyawa polifenol dari melinjo ini bertindak sebagai pendonor elektron yang sangat reaktif. Elektron tersebut akan dengan cepat menetralkan radikal bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sebelum mereka sempat merusak komponen sel (Gambar II.12). Proses netralisasi ini sangat esensial untuk mencegah terjadinya stres oksidatif intraseluler yang kerap menjadi pemicu utama penuaan dini serta berbagai penyakit degeneratif, sehingga integritas dan kesehatan seluler jaringan tubuh manusia dapat tetap terjaga (Wazir dkk., 2011).



Gambar II.12. Cara Kerja Antioksidan (Agus dkk., 2022)

Selain kapasitas antioksidannya, bioaktivitas daun melinjo juga secara ekstensif dilaporkan memiliki sifat antidiabetes yang sangat potensial untuk terapi kesehatan metabolik. Ekstrak daun melinjo mampu menunjukkan efek penurunan kadar glukosa darah melalui mekanisme penghambatan kompetitif terhadap enzim pencernaan karbohidrat, seperti enzim α -amilase dan α -glukosidase di dalam usus. Penghambatan terhadap kinerja kedua enzim ini akan secara signifikan memperlambat laju pemecahan karbohidrat kompleks menjadi glukosa sederhana. Sebagai dampaknya, penyerapan gula ke dalam aliran darah menjadi lebih lambat dan terkontrol, sehingga lonjakan gula darah ekstrem setelah makan dapat dicegah secara efektif. Kemampuan regulasi metabolik alami ini menjadikan ekstrak melinjo sebagai agen fungsional yang sangat menjanjikan untuk manajemen penyakit diabetes melitus (Kato dkk., 2009).

Di samping beragam manfaat klinisnya bagi manusia, bioaktivitas daun melinjo yang paling relevan dengan aplikasi pengawetan pangan adalah kemampuannya sebagai agen antimikroba dan antijamur, khususnya aktivitas anti-*Candida*. Senyawa polifenol dan flavonoid dari ekstrak daun melinjo memiliki mekanisme kerja yang sangat destruktif terhadap struktur sel jamur pembusuk. Molekul bioaktif tersebut mampu berdifusi dan berinteraksi langsung dengan senyawa ergosterol

yang merupakan komponen sterol utama penyusun membran plasma *Candida*. Interaksi ikatan ini memicu perubahan drastis pada permeabilitas membran, yang menyebabkan kebocoran cairan intraseluler. Kerusakan membran yang masif ini pada akhirnya akan berujung pada lisis dan kematian sel jamur (Trisha dkk., 2024).

II.5 Nanoteknologi

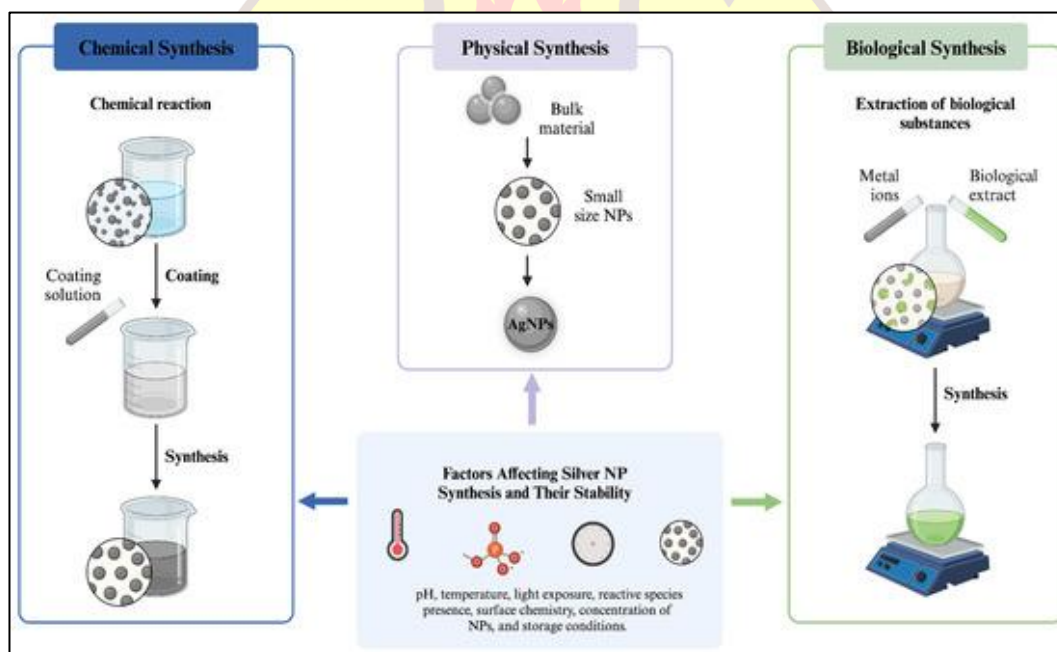
Nanoteknologi merupakan cabang ilmu sains multidisiplin yang berfokus pada manipulasi, perancangan, dan sintesis material pada skala nanometer (umumnya berkisar antara 1 hingga 100 nm) untuk menciptakan struktur dengan sifat fisikokimia yang sepenuhnya baru (Bumbudsanpharoke & Ko, 2015). Pada dasarnya, pembuatan material berskala nano dapat dilakukan melalui dua pendekatan utama, yaitu pendekatan *top-down* yang memecah material curah (*bulk*) menjadi ukuran nano melalui energi mekanis, dan pendekatan *bottom-up* yang menyusun atom atau molekul secara individual melalui reaksi kimia atau biologi. Di sektor industri pangan, nanoteknologi telah diimplementasikan secara luas, mulai dari pengembangan kemasan cerdas (*smart packaging*), sistem nanoenkapsulasi nutrisi, hingga pemanfaatannya sebagai agen pengawet antimikroba untuk memperpanjang umur simpan produk pangan segar (Singh & Journal, 2018). Meskipun menawarkan fungsionalitas yang luar biasa, aplikasi nanoteknologi yang berkontak langsung dengan matriks makanan memerlukan pengawasan keamanan pangan yang sangat ketat. Keamanan bahan berukuran nano ini sangat dipengaruhi oleh dosis, ukuran dan morfologi partikel, serta tingkat toksisitas pelarut yang digunakan selama masa sintesisnya (Amenta dkk., 2015).

II.5.1 Nanopartikel Perak

Nanopartikel perak (AgNPs) merupakan salah satu jenis nanomaterial berbahan dasar logam perak yang direkayasa sedemikian rupa hingga memiliki dimensi ukuran partikel antara 1 hingga 100 nanometer. Jika dibandingkan dengan nanomaterial logam transisi lainnya, seperti nanopartikel emas (AuNPs), seng oksida (ZnONPs), titanium dioksida (TiO₂NPs), maupun tembaga (CuNPs), AgNPs memiliki keunggulan yang jauh lebih menonjol terutama untuk aplikasi di bidang

medis dan keamanan pangan. Keunggulan utama tersebut terletak pada aktivitas antimikrobanya yang berspektrum sangat luas dan sangat reaktif, sehingga mampu melumpuhkan ratusan jenis bakteri patogen, virus, jamur, hingga khamir. Di samping itu, AgNPs memiliki rasio luas permukaan terhadap volume yang sangat padat, stabilitas struktur kimia yang kuat, serta sifat optik *Surface Plasmon Resonance* (SPR) yang khas. Sifat-sifat ini menjadikan AgNPs mampu memberikan efek toksik yang sangat terarah pada sel mikroba, meskipun hanya diaplikasikan dalam takaran dosis yang sangat minim (Yin dkk., 2020).

Pada dasarnya, proses sintesis nanopartikel perak dapat diklasifikasikan ke dalam tiga metode utama, yakni sintesis secara kimia (*chemical synthesis*), fisika (*physical synthesis*), dan biologi (*biological synthesis*), sebagaimana diilustrasikan secara skematik pada Gambar II.13.



Gambar II.13. Metode Sintesis Nanopartikel Perak secara Kimia, Fisik, dan Biologi (Duman dkk., 2024)

Berdasarkan alur pada gambar tersebut, sintesis kimia menggunakan pendekatan pembentukan molekuler (*bottom-up*). Larutan prekursor ion logam perak

direaksikan secara kimiawi dengan agen pereduksi sintetis (seperti natrium borohidrida atau sitrat) untuk mengubah ion menjadi partikel padat. Meskipun mampu memproduksi AgNPs secara cepat dengan ukuran yang seragam, penggunaan reagen kimia pada metode ini sering kali meninggalkan residu beracun yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Di sisi lain, sintesis fisika umumnya menggunakan pendekatan pemecahan material dari ukuran besar ke ukuran kecil (*top-down*). Material perak direduksi menjadi partikel berukuran nano melalui metode seperti ablasi laser, evaporasi-kondensasi, atau dekomposisi termal. Metode fisika memiliki keunggulan dalam menghasilkan nanopartikel dengan tingkat kemurnian yang tinggi tanpa residu kimia, namun membutuhkan konsumsi energi yang sangat besar dan peralatan yang mahal (Duman dkk., 2024).

Sebagai solusi inovatif, sintesis biologi atau sintesis hijau memanfaatkan ekstrak dari sumber hayati (tanaman, bakteri, atau jamur) sebagai agen pereduksi sekaligus penstabil alami (*capping agent*). Kelebihan utama dari metode biologi adalah sifatnya yang ramah lingkungan, hemat biaya, dan tidak menggunakan pelarut kimia beracun. Biomolekul seperti polifenol dan flavonoid dalam ekstrak tanaman secara otomatis membungkus permukaan nanopartikel, sehingga mencegah aglomerasi tanpa memerlukan tambahan zat penstabil sintetis. Meskipun sangat biokompatibel, metode ini memiliki tantangan berupa waktu reaksi yang relatif lebih lambat dibandingkan metode kimia serta kesulitan dalam standarisasi ukuran partikel karena variasi komposisi senyawa aktif dari sumber hayati yang digunakan (Iravani dkk., 2014).

Kemampuan AgNPs dalam menghambat pertumbuhan mikroba (antibakteri) dan jamur (*antifungal*) didasarkan pada beberapa mekanisme molekuler yang bekerja secara bersamaan. AgNPs memiliki kemampuan untuk menempel dan menembus dinding sel mikroba, yang mengakibatkan kerusakan fisik pada membran, perubahan permeabilitas, dan kebocoran isi sel. Selain itu, interaksi antara nanopartikel dengan komponen seluler memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menginduksi stres oksidatif masif, sehingga merusak struktur

protein, lipid, dan DNA mikroba. Pelepasan ion perak secara berkelanjutan dari permukaan nanopartikel dapat berikatan dengan gugus tiol pada protein esensial dan mengganggu proses replikasi DNA. Pada jamur seperti *Candida* spp., AgNPs secara spesifik dapat mengganggu stabilitas ikatan ergosterol pada membran plasma, yang berujung pada lisis atau kematian sel jamur secara total. Berbagai mekanisme inilah yang menjadikan AgNPs sebagai agen pengawet alami yang sangat tangguh untuk menjaga keamanan produk pangan (Duman dkk., 2024).

II.5.2 ML-AgNPs

Melinjo Leaf-mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) merupakan produk nanomaterial perak yang disintesis secara spesifik menggunakan pendekatan biologi dengan memanfaatkan ekstrak daun sebagai agen hayatinya. ML-AgNPs adalah perpaduan antara teknologi material nano berskala 1–100 nm dengan kekayaan senyawa fitokimia alami. Berbeda dengan nanopartikel perak sintetik yang diproduksi menggunakan bahan kimia berbahaya, ML-AgNPs memiliki tingkat kemurnian ekologis yang jauh lebih tinggi. Lapisan luar partikel ini secara alami diselubungi oleh senyawa metabolit sekunder dari daun melinjo, yang tidak hanya memastikan keamanan biologisnya (biokompatibilitas) bagi aplikasi pangan, tetapi juga memberikan karakteristik fisikokimia yang sangat stabil selama masa penyimpanan (Saidi, 2026).

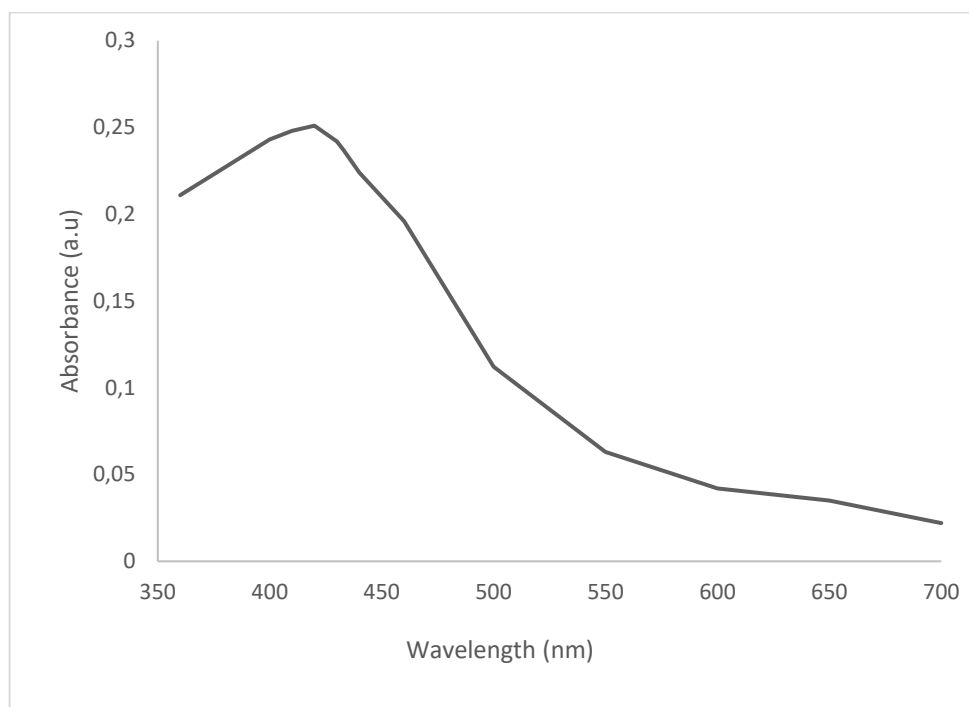
Proses pembentukan ML-AgNPs terjadi melalui reaksi reduksi-oksidasi (redoks) yang difasilitasi oleh pelarut pencampur pada suhu dan kondisi pH tertentu. Tahapan sintesis ini diawali dengan mereaksikan larutan prekursor logam, yakni perak nitrat (AgNO_3), dengan ekstrak daun melinjo. Pada fase inilah senyawa bioaktif dari ekstrak melinjo mengambil alih peran kimiawi yang sangat krusial. Kelompok senyawa polifenol, turunan gnetin, dan flavonoid yang kaya akan gugus hidroksil bebas bertindak langsung sebagai agen pereduksi. Senyawa-senyawa ini mendonorkan elektronnya untuk mereduksi ion perak murni (Ag^+) yang terlarut di dalam AgNO_3 menjadi atom perak padat bervalensi nol (Ag^0). Setelah partikel perak berskala nano tersebut terbentuk, sisa molekul fitokimia yang berukuran lebih

besar akan menempel dan membungkus permukaan partikel, bertindak sebagai agen penstabil (*capping agent*). Lapisan *capping* organik ini yang mencegah partikel-partikel perak saling bertabrakan dan menggumpal (Santoso dkk., 2010). Selain krusial dalam proses pembentukan fisik partikel, keberadaan lapisan ekstrak melinjo pada permukaan ML-AgNPs juga memberikan kontribusi terhadap aktivitas antijamurnya (anti-*Candida*). Kinerja ML-AgNPs tidak hanya bergantung pada toksisitas ion perak semata, melainkan melibatkan efek sinergis antara logam perak dan senyawa bioaktif tumbuhan. Ketika ML-AgNPs menempel pada dinding sel *Candida*, ion perak akan merusak membran dan menginduksi pembentukan ROS yang menghancurkan DNA jamur. Pada saat yang bersamaan, senyawa polifenol dan flavonoid dari ekstrak melinjo yang menjadi *capping agent* akan ikut berinteraksi dengan ergosterol pada membran sel jamur, memperparah kebocoran intraseluler, serta menurunkan resistensi jamur terhadap stres oksidatif (Trisha dkk., 2024). Keberhasilan rute sintesis biologi untuk menghasilkan nanopartikel perak dengan bioaktivitas unggul ini telah divalidasi oleh banyak riset yang menggunakan ekstrak tanaman dengan profil fitokimia serupa. Sebagai contoh, Ahmed dkk. (2016) merangkum berbagai kesuksesan sintesis AgNPs menggunakan ekstrak tanaman kaya flavonoid seperti daun nimba (*Azadirachta indica*) dan lidah buaya (*Aloe vera*), yang terbukti menghasilkan nanopartikel berspektrum antimikroba sangat luas dalam waktu yang singkat. Penelitian lain oleh (Narayanan dkk., 2022) juga membuktikan bahwa pemanfaatan ekstrak daun yang kaya polifenol mampu memediasi pembentukan AgNPs yang sangat stabil dan memiliki efek toksisitas mematikan terhadap berbagai galur patogen.

II.5.2.1 Karakterisasi ML-AgNPs

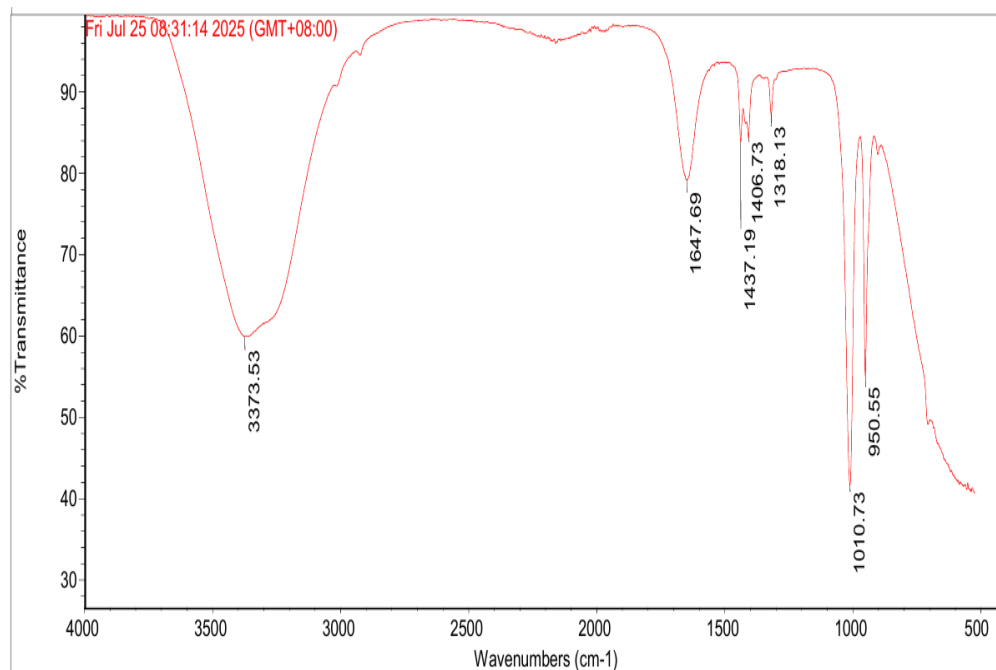
Karakterisasi ML-AgNPs dilakukan untuk memvalidasi keberhasilan pembentukan nanopartikel serta mengetahui profil fisikokimia yang dihasilkan melalui mediasi ekstrak daun melinjo. Berdasarkan penelitian Saidi (2026), metode karakterisasi utama yang digunakan meliputi spektrofotometri *UV-Vis*, *Fourier Transform Infrared* (FTIR), dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Hasil analisis *UV-Vis* (Gambar II.14) menunjukkan adanya puncak serapan spesifik *Surface Plasmon*

Resonance (SPR) pada panjang gelombang sekitar 400–450 nm dengan panjang gelombang maksimal sekitar 420-430 nm, yang menjadi bukti awal terbentuknya AgNPs.



Gambar II.14. Spektrum Absorpsi UV-Vis ML-AgNPs (Saidi, 2026)

Lebih lanjut, analisis FTIR (Gambar II.15) mengungkap adanya pergeseran pita serapan pada bilangan gelombang $3417,09\text{ cm}^{-1}$ (gugus hidroksil) dan $1655,08\text{ cm}^{-1}$ (gugus amida I protein atau gugus karbonil), yang mengonfirmasi peran polifenol dan flavonoid dari melinjo sebagai agen pereduksi sekaligus *capping agent* yang menstabilkan partikel perak agar tidak terjadi aglomerasi.



Gambar II.15. Pola FTIR ML-AgNPs (Saidi, 2026)

Pengamatan melalui TEM menunjukkan bahwa ML-AgNPs secara dominan memiliki morfologi sferis (bulat) dengan distribusi ukuran yang cukup seragam, yakni berkisar antara 10 hingga 40 nm dengan ukuran rata-rata yang berpusat pada kisaran 25–30 nm. Secara keseluruhan, karakterisasi ini menyimpulkan bahwa penggunaan ekstrak daun melinjo sukses menghasilkan nanopartikel perak yang stabil, berukuran sangat kecil, dan memiliki kristalinitas tinggi, sehingga sangat potensial untuk diaplikasikan sebagai agen antimikroba yang reaktif.

II.5.2.2 Uji Toksisitas ML-AgNPs

Evaluasi toksisitas merupakan tahapan esensial untuk memprediksi keamanan biologis ML-AgNPs sebelum diaplikasikan sebagai pengawet pada produk pangan. Berdasarkan penelitian (Saidi, 2026), uji sitotoksitas awal ML-AgNPs dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Assay* (BSLA) dengan memanfaatkan larva udang *Artemia salina*. Hasil pengujian memperlihatkan adanya korelasi linier yang positif antara peningkatan konsentrasi nanopartikel dengan persentase mortalitas larva udang. Melalui analisis regresi, diketahui bahwa nilai konsentrasi

mematikan atau *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) dari ML-AgNPs berada pada angka 20,1 mg/mL. Merujuk pada standar indeks toksisitas Meyer, suatu material diklasifikasikan sebagai bahan beracun apabila nilai LC_{50} berada di bawah 1 mg/mL, dan dikategorikan non-toksik jika nilainya melebihi 1 mg/mL. Oleh karena itu, perolehan nilai LC_{50} sebesar 20,1 mg/mL secara tegas mengonfirmasi bahwa ML-AgNPs bersifat non-toksik dan memiliki profil keamanan yang sangat baik pada konsentrasi pengujian. Dari sudut pandang keamanan pangan, karakteristik non-toksik yang kuat ini memberikan validasi ilmiah bahwa ML-AgNPs sangat aman dan menjanjikan untuk diaplikasikan secara praktis pada sistem pangan.



Bab 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.

III.1 Bahan dan Alat

III.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 melinjo tua (Taman Pertanian Putra, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia) yang berwarna hijau gelap, serta bahan penunjang yaitu keju *mozzarella*.

Bahan analisis yang digunakan adalah etanol *absolute* (99,5%) (SYSTEM®, Selangor, Malaysia), air destilasi, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) (*Institute of Bioscience*, UPM, Serdang, Selangor, Malaysia), *Amphotericin B* (Oxoid Ltd., UK), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Difco, USA), *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) (Difco, USA), *Silver Nitrate Solution* (AgNO_3), dan garam buffer fosfat (PBS) (Hampshire, England).

Mikroba yang digunakan adalah *Candida* patogen yang didapatkan dari *American Type Culture Collections* (ATCC) (Rockville, MD, USA) yang disimpan di *Laboratory of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Science and Technology*, Universiti Putra Malaysia. Mikroba tersebut diantaranya:

<i>Strain</i>	<i>Asal</i>	<i>Media Kultur</i>
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
<i>Candida krusei</i>	ATCC 32196	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>

III.1.2 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan yaitu pisau, *chopper* 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), 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*, jangka sorong, A&D MX-50 *moisture analyzer* (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, *96-well plate, magnetic stirrer, glass pasteur pipette* 6mm, pinset, *plate media, micro pipette* 1000 μL , *micro pipette* 100 μL , *micro pipette* 10 μL , *pipette tips* 1000 μL , *pipette tips* 100 μL , *pipette tips* 10 μL , *ependorf tube*, vortex, serta aluminium foil.

III.2 Metode Penelitian

Metode penelitian terdiri dari tiga tahap penelitian, yaitu: **Tahap I.** Karakterisasi dan Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo, **Tahap II.** Pembuatan ML-AgNPs serta Menentukan Aktivitas Anti-*Candida* dari Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs, dan **Tahap III.** Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs Terhadap Keju.

III.2.1 Rancangan Percobaan

Tahap I. Karakterisasi dan Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo

Pada **Tahap I**, dilakukan beberapa prosedur, yaitu karakterisasi fisikokimia bubuk daun melinjo, meliputi warna (L^* , a^* , b^*), kadar air, pH, dan aktivitas air. Selanjutnya, dilakukan ekstraksi bubuk daun melinjo menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol *absolute*.

Tahap II. Sintesis ML-AgNPs dan Menentukan Aktivitas Anti-*Candida* dari Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs

Pada **Tahap II**, dilakukan pembuatan nanopartikel perak dengan sintesis hijau ekstrak daun melinjo. Selanjutnya menentukan aktivitas anti-*Candida* dengan 3 prosedur, yaitu *Well Diffusion Assay* (WDA) untuk menentukan aktivitas anti-*Candida* pada dengan menghitung diameter zona bening yang muncul dilakukan secara 3×3, *Minimum Inhibitory Concetration* (MIC) untuk menentukan konsentrasi terendah dalam menghambat pertumbuhan *Candida*, serta *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) untuk menentukan konsetrasi terendah dalam membunuh *Candida*.

Tahap III. Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs pada Keju

Pada **Tahap III**, dilakukan dengan merendam keju dalam ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs sebagai zat tambah antijamur. Selanjutnya, analisis dilakukan dengan metode *Total Fungal Count* (TFC) untuk mengetahui berapa banyak jamur yang tumbuh secara alami pada keju.

III.2.2 Respon Pengujian

Tahap I Analisis warna, kadar air, pH, aktivitas air, serta ekstrak daun melinjo.

Tahap II Nanopartikel Perak Daun Melinjo (ML-AgNPs). WDA dengan menghitung zona bening yang muncul akibat aktivitas senyawa anti-*Candida*. MIC berdasarkan pertumbuhan minimal *Candida* yang tumbuh, sehingga dapat diketahui konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida*. MFC berdasarkan tidak adanya pertumbuhan *Candida*, sehingga dapat diketahui konsentrasi yang mampu membunuh *Candida*.

Tahap III Aplikasi ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap keju menggunakan metode perhitungan \log_{10} CFU/mL dari pengolahan data hasil TFC.

III.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 dan Microsoft Excel.

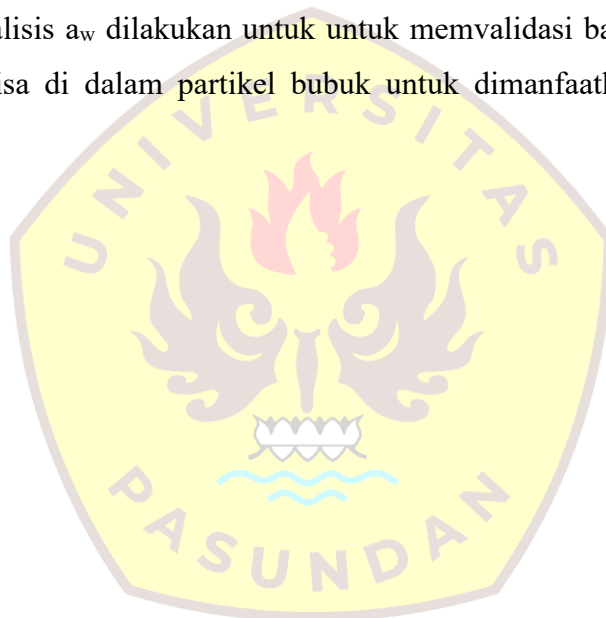
Uji statistik deskriptif merupakan deskripsi suatu data berdasarkan nilai rata-rata (*mean*), standar deviasi, varian, maksimum, minimum, *sum*, *range*, kurtosis, dan *skewness*. Statistik deskriptif umumnya digunakan untuk menggambarkan profil data sampel sebelum menggunakan teknik *analisis statistic*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

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.

III.3 Prosedur Penelitian

III.3.1 Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo

Analisis fisikokimia bubuk daun melinjo meliputi analisis warna, penentuan kadar air, penentuan pH, dan aktivitas air (a_w). Analisis warna dilakukan untuk mengevaluasi mutu visual yang menunjukkan kelimpahan pigmen bioaktif pada daun melinjo. Penentuan kadar air dilakukan untuk memastikan bahwa persentase air sudah cukup rendah untuk mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat merusak senyawa fitokimia. Analisis pH dilakukan karena karena profil pH dari bubuk daun melinjo akan sangat memengaruhi tingkat kelarutan senyawa aktif saat diekstraksi dan menentukan stabilitas reaksi reduksi ion perak pada tahap sintesis ML-AgNPs. Analisis a_w dilakukan untuk untuk memvalidasi bahwa tidak ada air bebas yang tersisa di dalam partikel bubuk untuk dimanfaatkan oleh mikroba perusak.

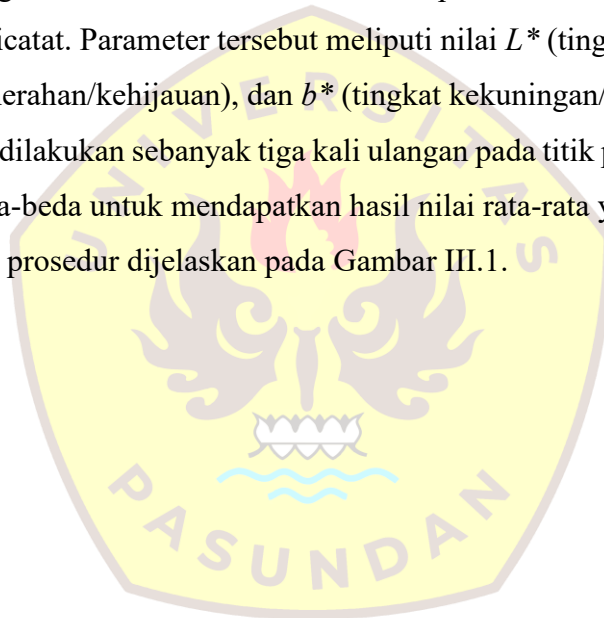


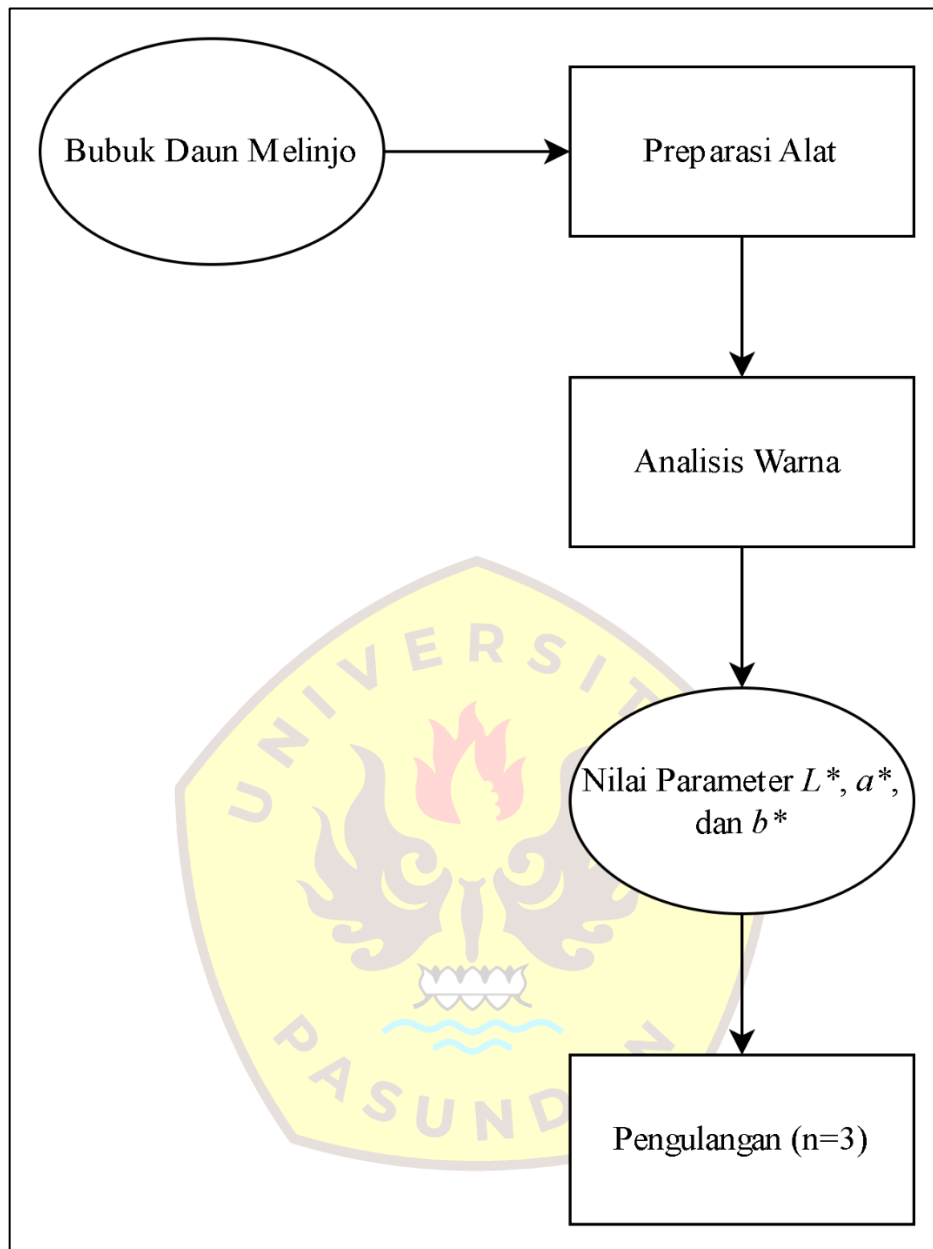
III.3.1.1 Analisis Warna

Prosedur analisis warna bubuk daun melinjo adalah sebagai berikut:

1. Sampel bubuk daun melinjo disiapkan dan dimasukkan secukupnya ke dalam wadah transparan atau berwarna putih, lalu permukaannya diratakan agar pembacaan sensor dapat akurat.
2. Alat Chroma meter dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan ubin putih standar (*white calibration plate*) sebelum digunakan untuk mengukur sampel.
3. Lensa sensor pada alat Chroma meter ditempelkan secara rapat tepat pada permukaan wadah yang berisi sampel bubuk daun melinjo.
4. Tombol pengukuran ditekan, kemudian nilai parameter warna yang muncul pada layar dicatat. Parameter tersebut meliputi nilai L^* (tingkat kecerahan), a^* (tingkat kemerahan/kehijauan), dan b^* (tingkat kekuningan/kebiruan).
5. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan pada titik permukaan sampel yang berbeda-beda untuk mendapatkan hasil nilai rata-rata yang representatif.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.1.





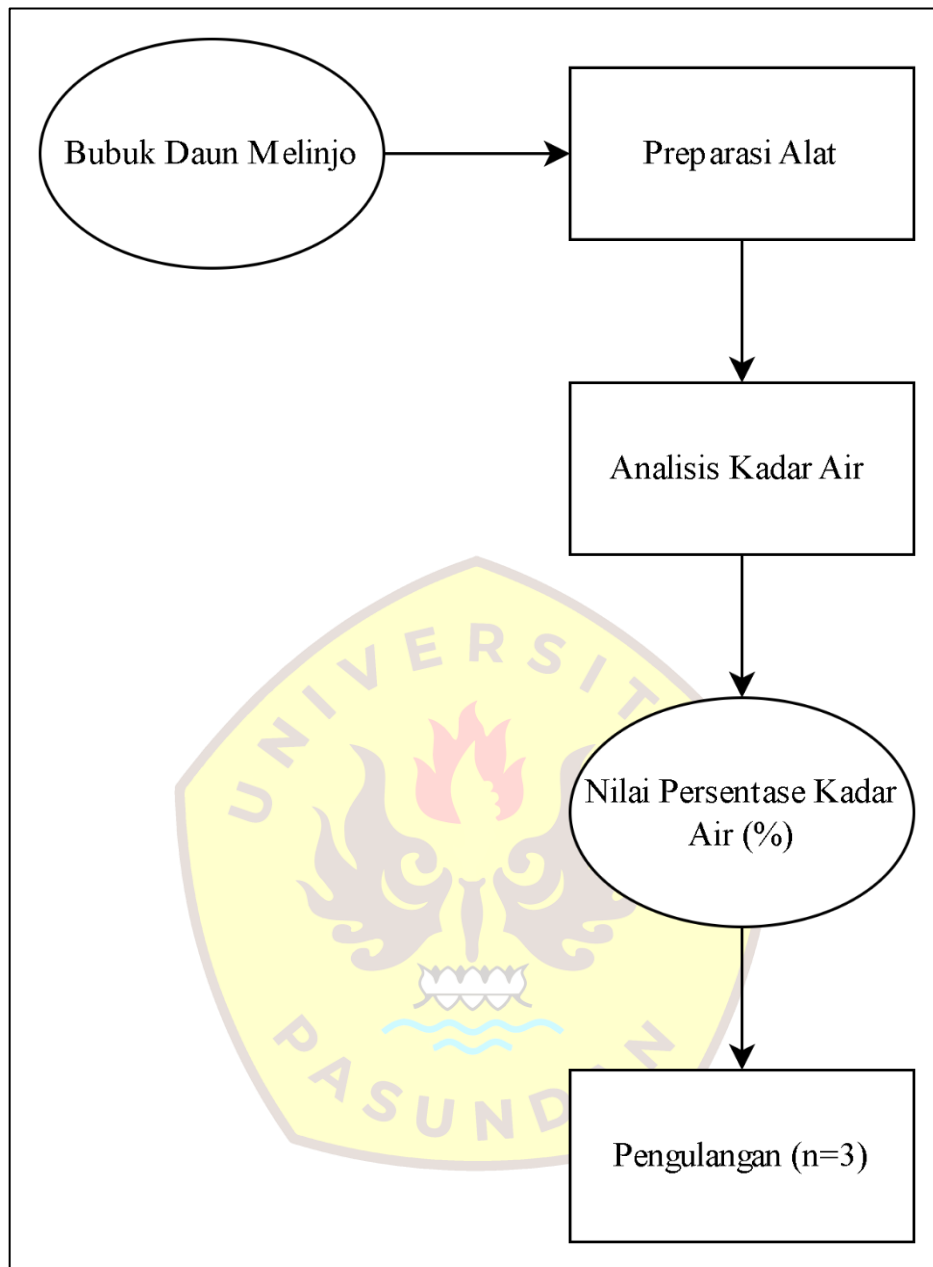
Gambar III.1. Diagram Alir Analisis Warna

III.3.1.2 Penentuan Kadar Air

Prosedur analisis penentuan kadar air bubuk daun melinjo adalah sebagai berikut:

1. Alat *Moisture Analyzer* dihidupkan dan dipastikan piringan aluminium di dalamnya dalam keadaan bersih dan kering.
2. Alat diatur ke posisi nol (*tare*) terlebih dahulu untuk memastikan berat piringan aluminium tidak ikut terhitung pada saat pengukuran.
3. Sampel bubuk daun melinjo dimasukkan secara merata hingga menutupi seluruh permukaan piringan aluminium agar proses penguapan berjalan optimal.
4. Penutup alat *Moisture Analyzer* ditutup dengan rapat, kemudian tombol pengukuran ditekan untuk memulai proses pemanasan.
5. Alat akan secara otomatis memanaskan sampel pada suhu yang telah ditentukan (105°C) dan menguapkan kandungan air di dalam bahan hingga berat sampel mencapai kondisi konstan.
6. Nilai persentase kadar air (%) yang tertera secara otomatis pada layar monitor alat setelah proses pemanasan selesai dan alat berbunyi dicatat sebagai hasil pengujian.
7. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata kadar air yang akurat dan representatif.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.2.



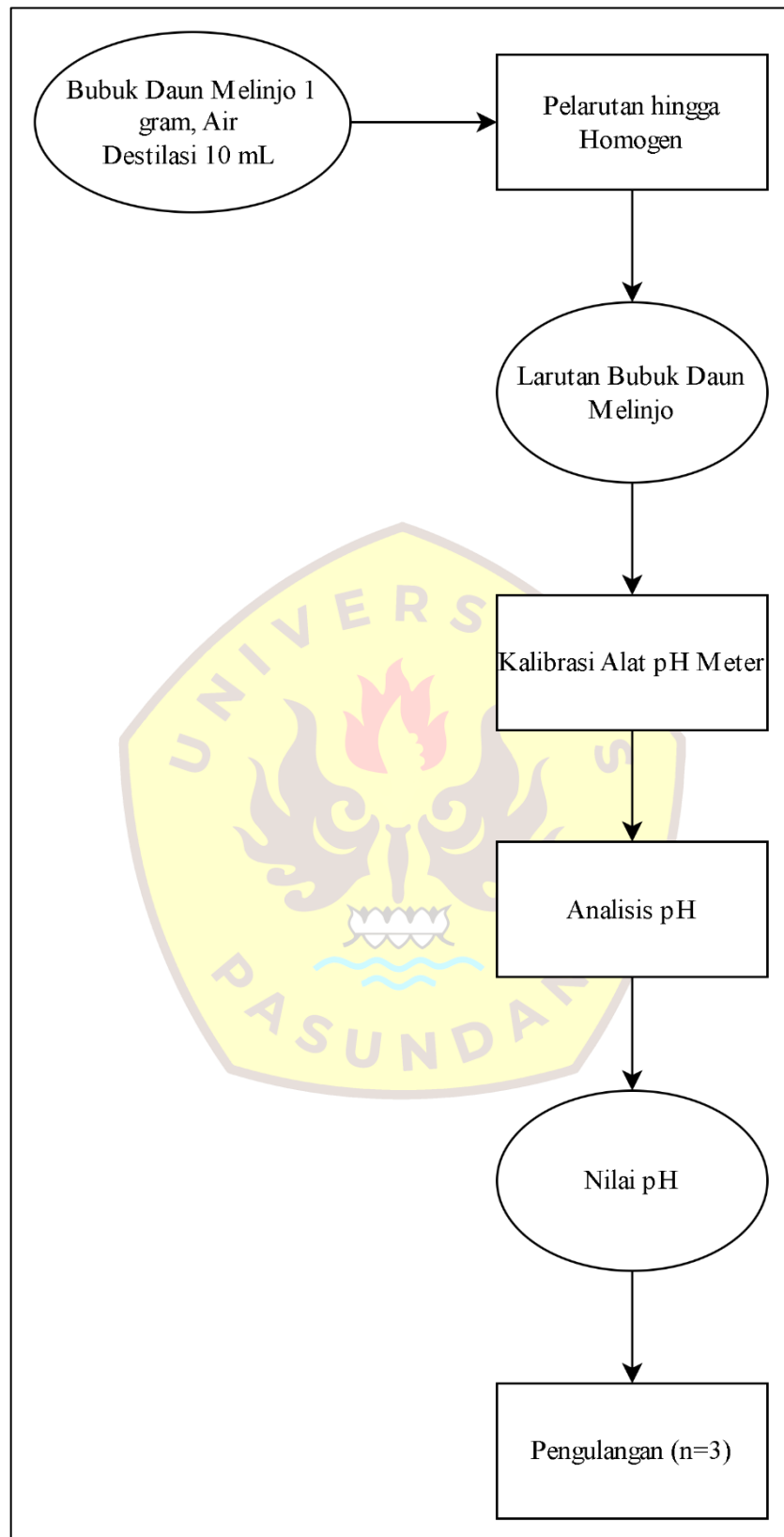
Gambar III.2. Diagram Alir Penentuan Kadar Air

III.3.1.3 Penentuan pH

Prosedur analisis penentuan pH bubuk daun melinjo adalah sebagai berikut:

1. Sampel bubuk daun melinjo ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan ke dalam 10 mL air destilasi di dalam gelas kimia, kemudian diaduk hingga tersuspensi secara homogen.
2. Alat pH meter dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan penyangga (*buffer*) standar pH 4,0 dan 7,0 untuk memastikan tingkat akurasi pembacaan sensor alat.
3. Elektroda kaca pada alat pH meter dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan secara perlahan menggunakan tisu bersih sebelum digunakan pada sampel.
4. Elektroda dicelupkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan sampel. Posisi elektroda dipastikan terendam dengan baik di dalam larutan namun tidak menyentuh dasar gelas kimia.
5. Pembacaan pada layar monitor pH meter ditunggu beberapa saat hingga angka digital yang ditampilkan berhenti bergerak atau mencapai kondisi stabil. Nilai pH yang tertera pada layar alat dicatat sebagai hasil pengujian.
6. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata pH yang akurat dan representatif.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.3.



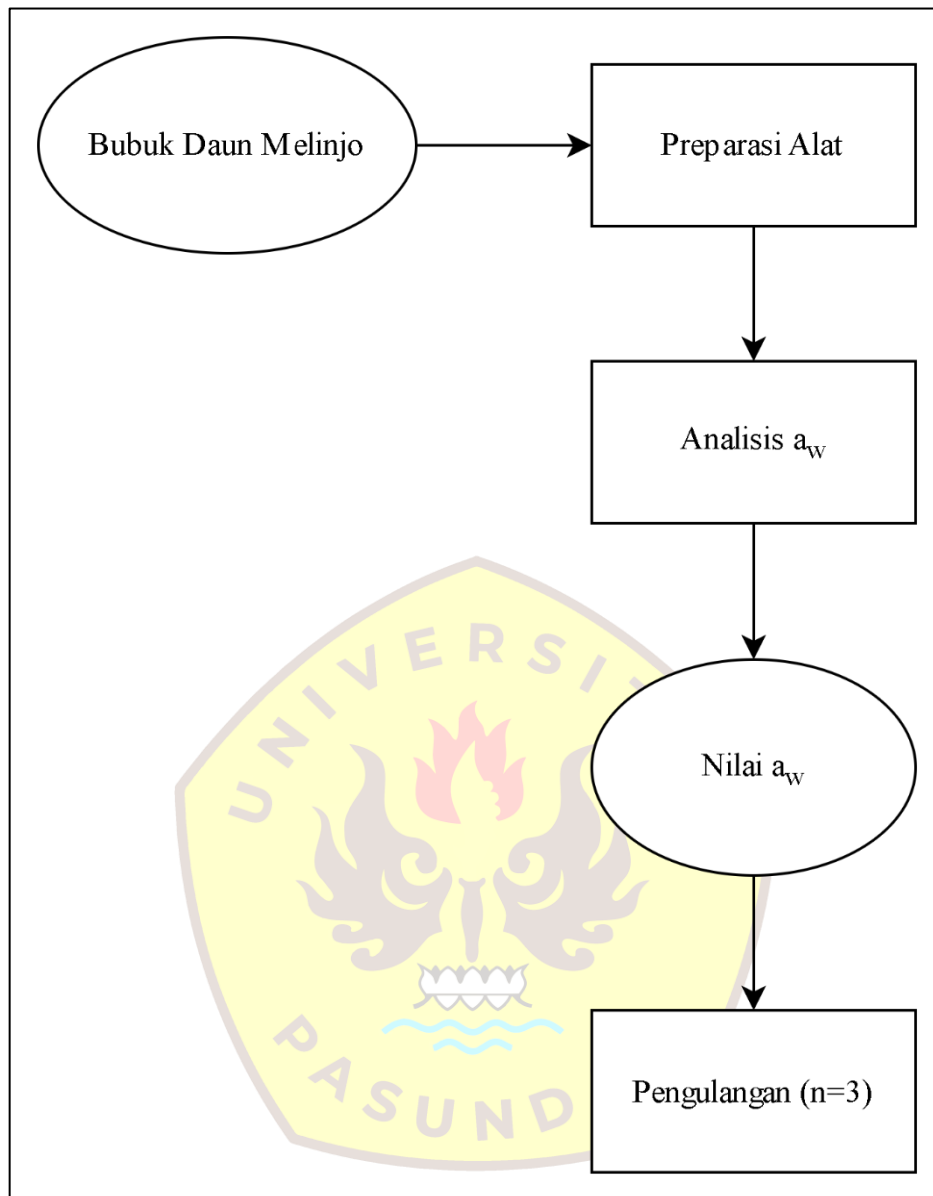
Gambar III.3. Diagram Alir Penentuan pH

III.3.1.4 Penentuan Aktivitas Air

Prosedur analisis penentuan aktivitas air (a_w) bubuk daun melinjo adalah sebagai berikut:

1. Alat a_w meter dihidupkan dan dibiarkan menyala selama beberapa saat agar suhu alat stabil dan siap digunakan.
2. Sampel bubuk daun melinjo disiapkan dan dimasukkan ke dalam wadah sampel (*sample cup*) khusus berbahan plastik transparan yang telah dipastikan dalam keadaan bersih dan kering. Sampel diisi hingga mencapai sekitar setengah dari volume wadah.
3. Wadah yang berisi sampel tersebut 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 agar sensor tidak terpengaruh oleh kelembapan udara dari lingkungan luar.
5. Proses pembacaan ditunggu selama beberapa menit hingga angka digital yang ditampilkan pada layar monitor alat berhenti bergerak atau telah mencapai kondisi stabil.
6. Nilai aktivitas air beserta suhu pengukuran yang tertera pada layar dicatat sebagai hasil pengujian. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata aktivitas air yang akurat dan representatif.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.4.



Gambar III.4. Diagram Alir Penentuan Aktivitas Air

III.3.2 Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo

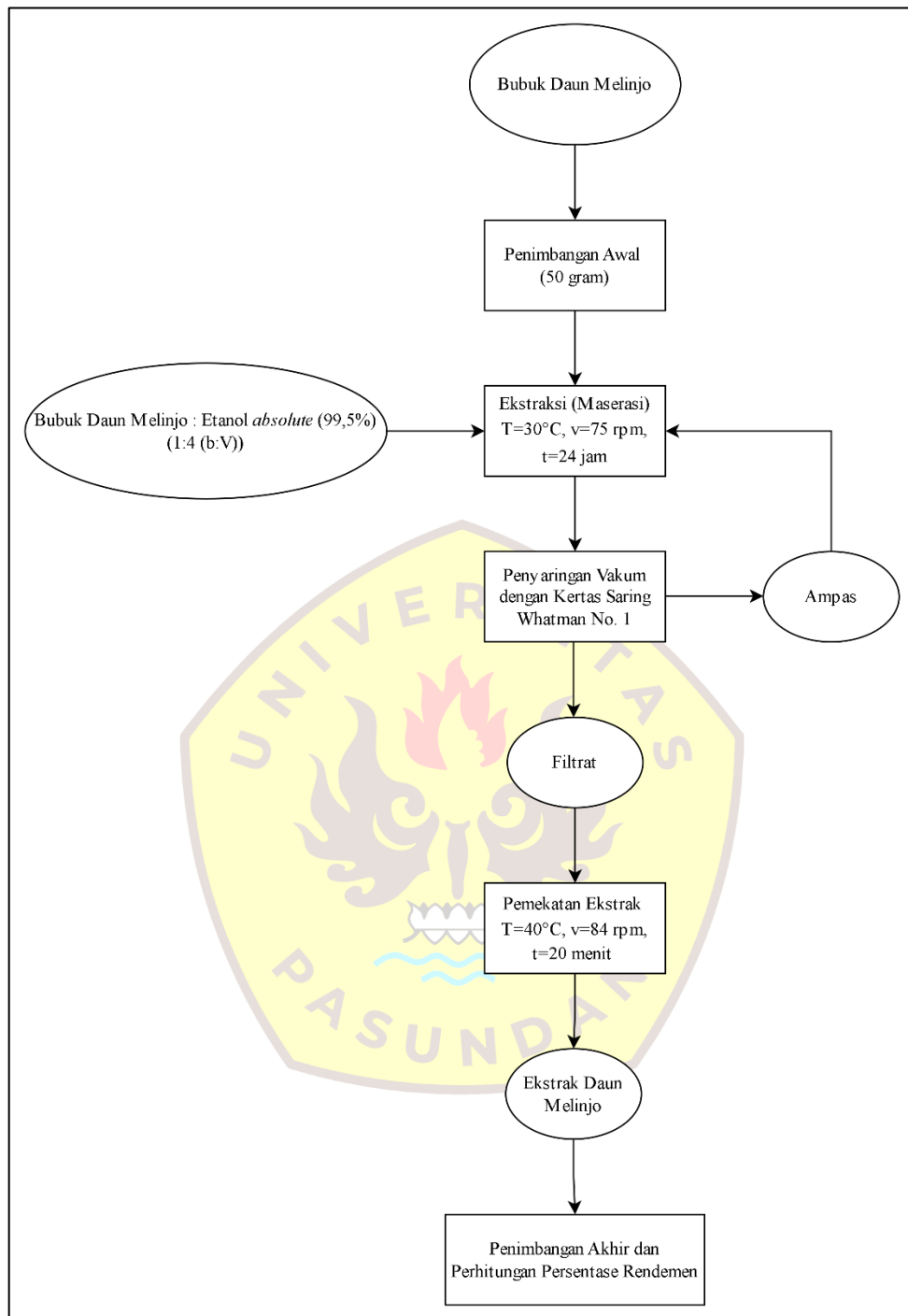
Prosedur ekstraksi bubuk daun melinjo adalah sebagai berikut:

1. Bubuk daun melinjo ditimbang sejumlah 50 gram menggunakan timbangan elektronik (Mettler Toledo, Ohio, USA).
2. Bubuk daun melinjo dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 200 mL, lalu ditambahkan pelarut etanol *absolute* (99.5%) dengan perbandingan 1:4 (b:V). Labu ditutup dengan *aluminium foil* dan diletakkan di dalam *incubator C24 incubator shaker* (Edison, NJ, USA). Proses maserasi dilakukan pada suhu 30°C dengan kecepatan 75 rpm selama 24 jam untuk memisahkan senyawa aktif pada bubuk daun melinjo.
3. Campuran hasil maserasi disaring menggunakan metode filtrasi vakum untuk memisahkan filtrat (cairan ekstrak) dari ampasnya (residu). Proses ini menggunakan kertas saring Whatman No. 1 (Whatman International Ltd, Middlesex, Inggris) dan pompa aspirator (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Jepang). Ampas yang terkumpul akan diekstraksi kembali (*remaserasi*) untuk memaksimalkan hasil.
4. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarutnya. Proses ini diatur pada suhu 40°C dengan kecepatan putaran 84 rpm selama 20 menit.
5. Ekstrak kental yang dihasilkan dipindahkan secara steril ke dalam botol universal, kemudian ditimbang untuk mendapatkan berat akhir produk. Nilai persentase rendemen ekstrak kemudian dihitung berdasarkan perbandingan antara berat ekstrak akhir dan berat bubuk daun melinjo awal.

Rumus dalam menghitung hasil persentase rendemen adalah sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat bubuk daun melinjo (g)}} \times 100$$

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.5.



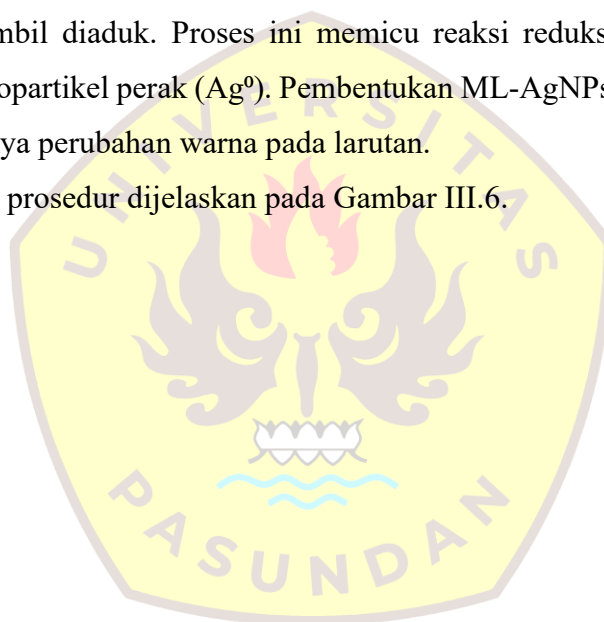
Gambar III.5. Diagram Alir Prosedur Ekstraksi Daun Melinjo

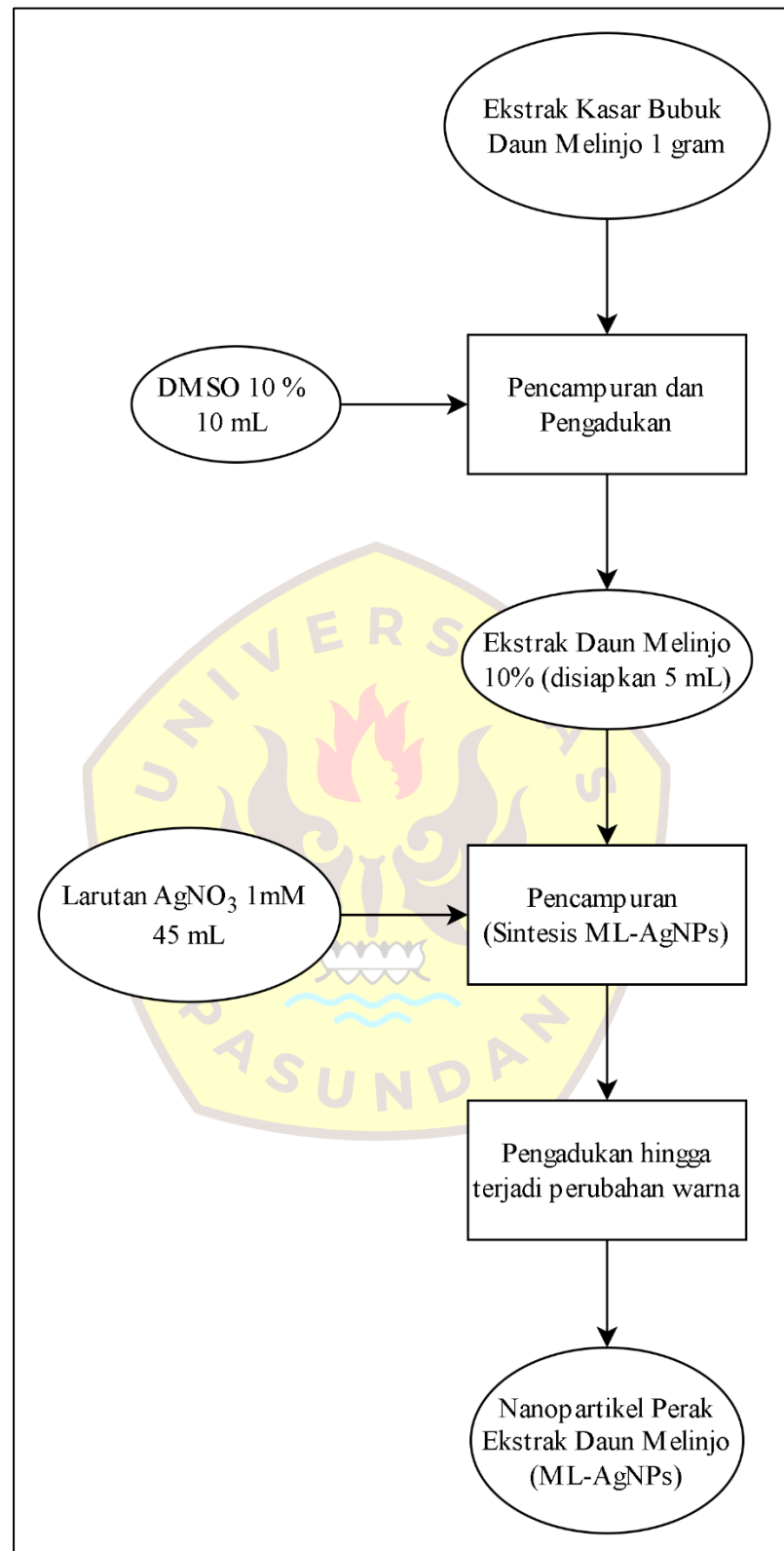
III.3.3 Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo

Prosedur sintesis hijau nanopartikel perak ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs) adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak kasar bubuk daun melinjo ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian ditambahkan pelarut DMSO 10% sebanyak 10 mL dan diaduk sehingga didapat ekstrak daun melinjo konsentrasi 10%
2. Bahan-bahan yang akan digunakan disiapkan, yaitu 5 mL ekstrak daun melinjo 10% yang berfungsi sebagai bioreduktor dan 45 mL larutan perak nitrat (AgNO_3) 1 mM sebagai prekursor logam.
3. Larutan perak nitrat dicampurkan ke dalam ekstrak daun melinjo secara bertahap sambil diaduk. Proses ini memicu reaksi reduksi ion perak (Ag^+) menjadi nanopartikel perak (Ag^0). Pembentukan ML-AgNPs biasanya ditandai dengan adanya perubahan warna pada larutan.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.6.





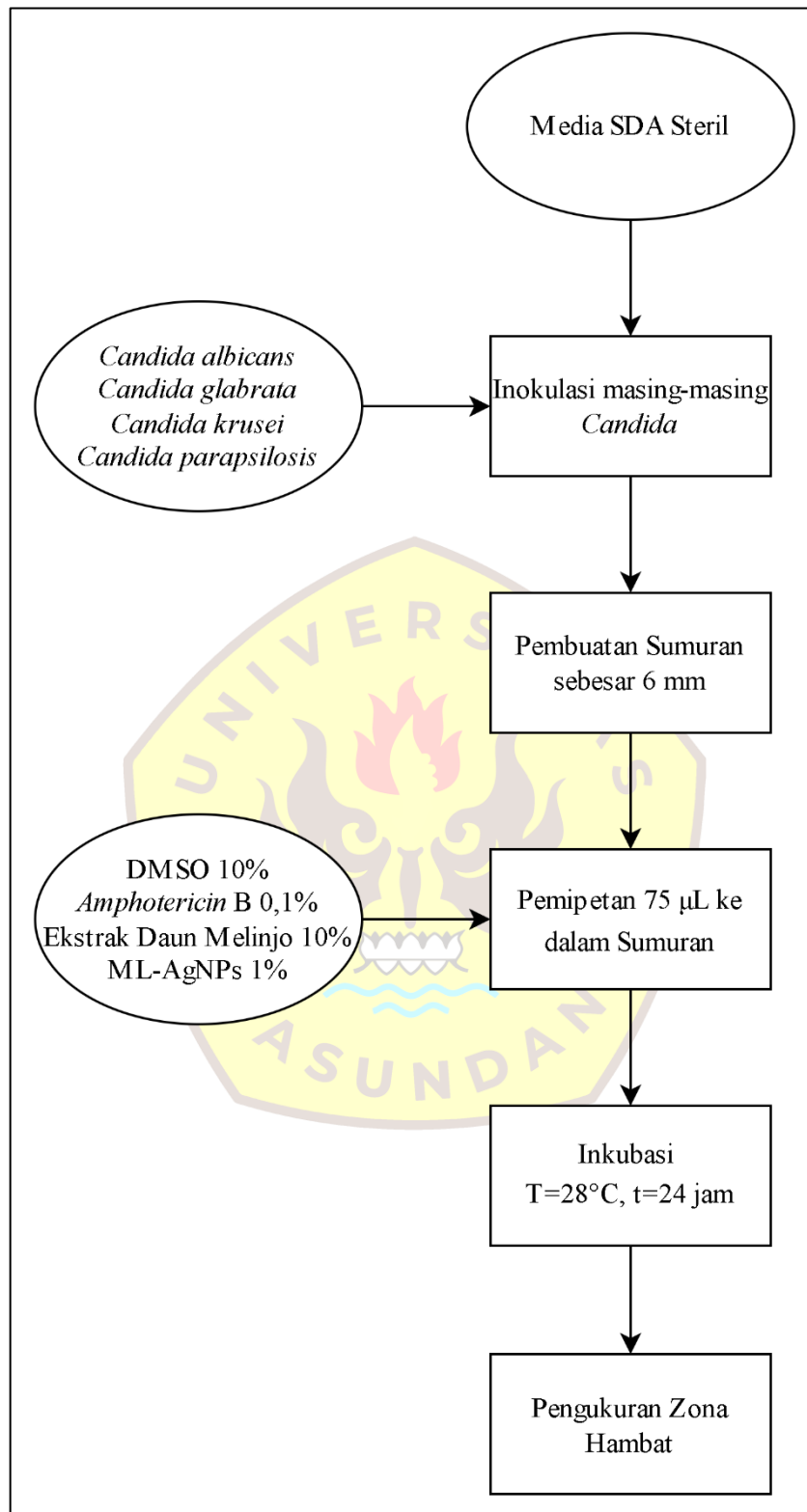
Gambar III.6. Diagram Alir Prosedur Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (ML-AgNPs)

III.3.4 Prosedur Well Difussion Assay (WDA)

Prosedur metode WDA adalah sebagai berikut:

1. Bahan-bahan yang diperlukan disiapkan, yaitu media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) steril dalam cawan petri, larutan *Amphotericin B* dengan konsentrasi 0,1%, larutan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) dengan konsentrasi 10%, ekstrak daun melinjo konsentrasi 10%, ML-AgNPs konsentrasi 1%, serta inokulum *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, dan *C. parapsilosis*.
2. Masing-masing *Candida* diinokulasikan pada media SDA secara merata menggunakan *cotton bud* steril.
3. Lubang atau sumuran dibuat pada media SDA yang telah diinokulasi dengan menggunakan ujung pipet Pasteur hingga membentuk lubang berdiameter 6 mm. 75 μ L larutan ekstrak daun melinjo 10% dan ML-AgNPs 1% ditaruh dalam masing-masing sumuran, satu sumuran untuk satu pelarut, tiga sumuran untuk masing-masing larutan sebagai *replication*, satu sumuran untuk DMSO 10% sebagai kontrol negatif dan satu sumuran untuk *Amphotericin B* 0,1% sebagai kontrol positif.
4. Cawan petri diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam.
5. Setelah masa inkubasi, diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk di sekitar setiap sumuran diamati dan diukur menggunakan jangka sorong.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.7.



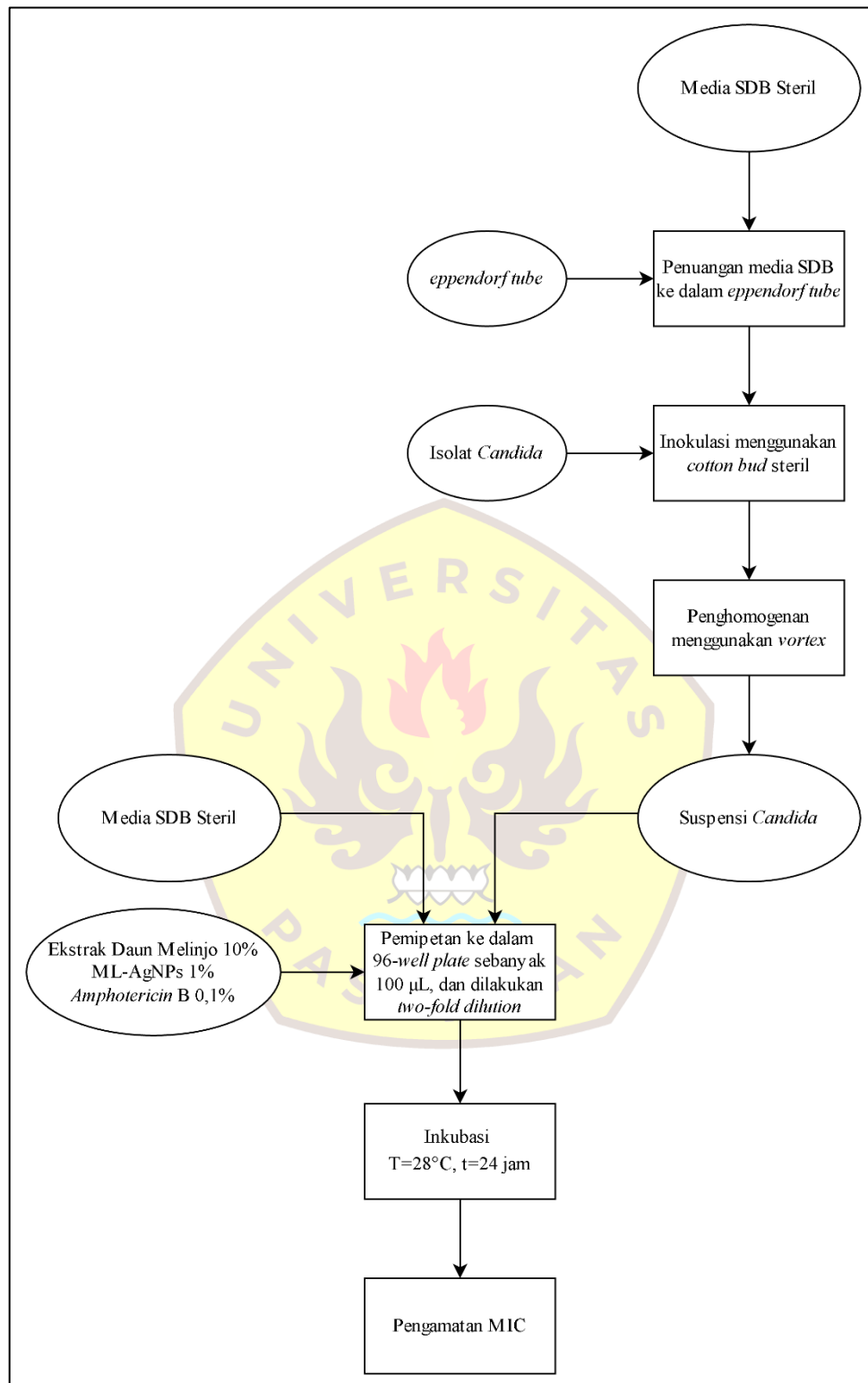
Gambar III.7. Diagram Alir Metode *Well Diffusion Assay* (WDA)

III.3.5 Prosedur *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Prosedur metode MIC adalah sebagai berikut:

1. Media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) disiapkan sebanyak 10 mL dalam *universal bottle*, dua buah *96-well plate* steril, ekstrak daun melinjo konsentrasi 10%, dan ML-AgNPs dengan konsentrasi 1%.
2. 100 μ L media SDB dimasukkan ke dalam setiap sumuran pada kolom 1 *96-well plate* sebagai kontrol negatif media.
3. Biakan *Candida* diambil menggunakan *cotton bud* steril, lalu dimasukkan dan dihomogenkan ke dalam *eppendorf tube* yang berisi 1 mL SDB menggunakan *vortex*.
4. Semua sumuran pada kolom 2 hingga 12 diisi dengan 100 μ L suspensi *Candida* yang telah dibuat sebelumnya.
5. *Two-fold dilution* dilakukan dengan memasukkan 100 μ L ekstrak daun melinjo 10% (untuk baris A-D) dan ML-AgNPs 1% (untuk baris E-H) ke dalam kolom 12, kemudian dihomogenkan dan dipindahkan 100 μ L dari kolom 12 ke kolom 11, lalu proses tersebut diulangi secara berurutan hingga ke kolom 3 (lihat Lampiran A).
6. Prosedur pengenceran berseri yang sama diulangi untuk larutan *Amphotericin B* 1% pada *96-well plate* yang berbeda, sebagai kontrol positif.
7. *96 well plate* tersebut diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam.
8. Nilai MIC ditentukan secara subjektif dengan mengamati secara visual sumuran dengan konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba (tidak terbentuk endapan atau kekeruhan).

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.8.



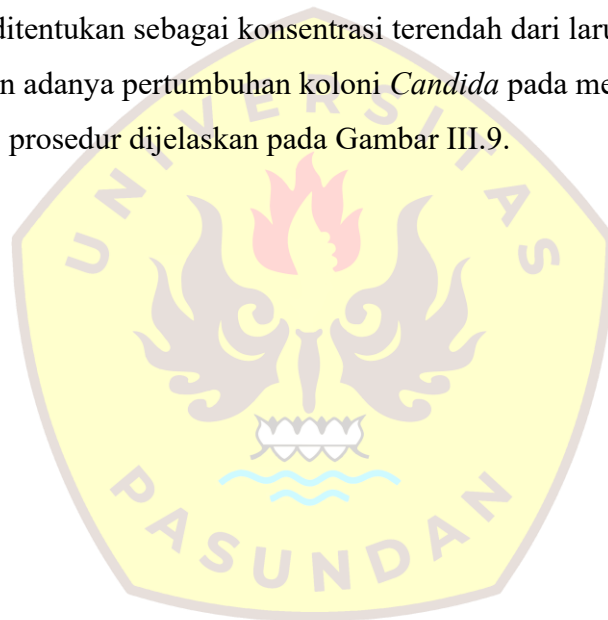
Gambar III.8. Diagram Alir Metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

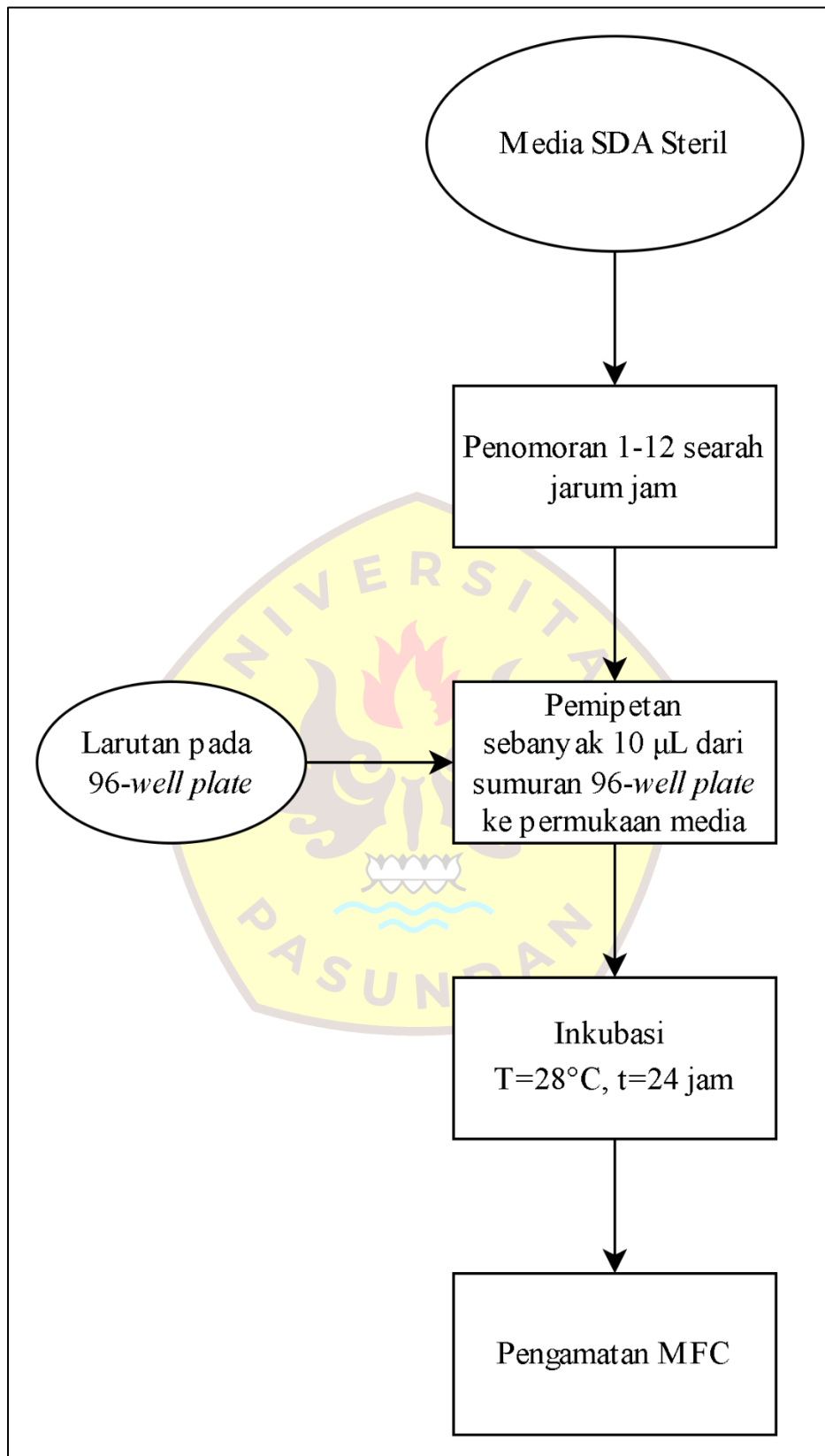
III.3.6 Prosedur *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC)

Prosedur metode MFC adalah sebagai berikut:

1. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) steril disiapkan di dalam cawan petri.
2. Label penandaan berupa angka 1 hingga 12 diberikan secara melingkar sesuai arah jarum jam pada dasar cawan petri.
3. Sebanyak 10 μL larutan dipipet dari setiap sumuran (*well*) pada *96-well plate* hasil uji MIC, lalu teteskan pada permukaan media SDA sesuai dengan nomor yang telah ditandai sebelumnya.
4. Cawan petri yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada 28°C selama 24 jam.
5. Nilai MFC ditentukan sebagai konsentrasi terendah dari larutan uji yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni *Candida* pada media SDA.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.9.





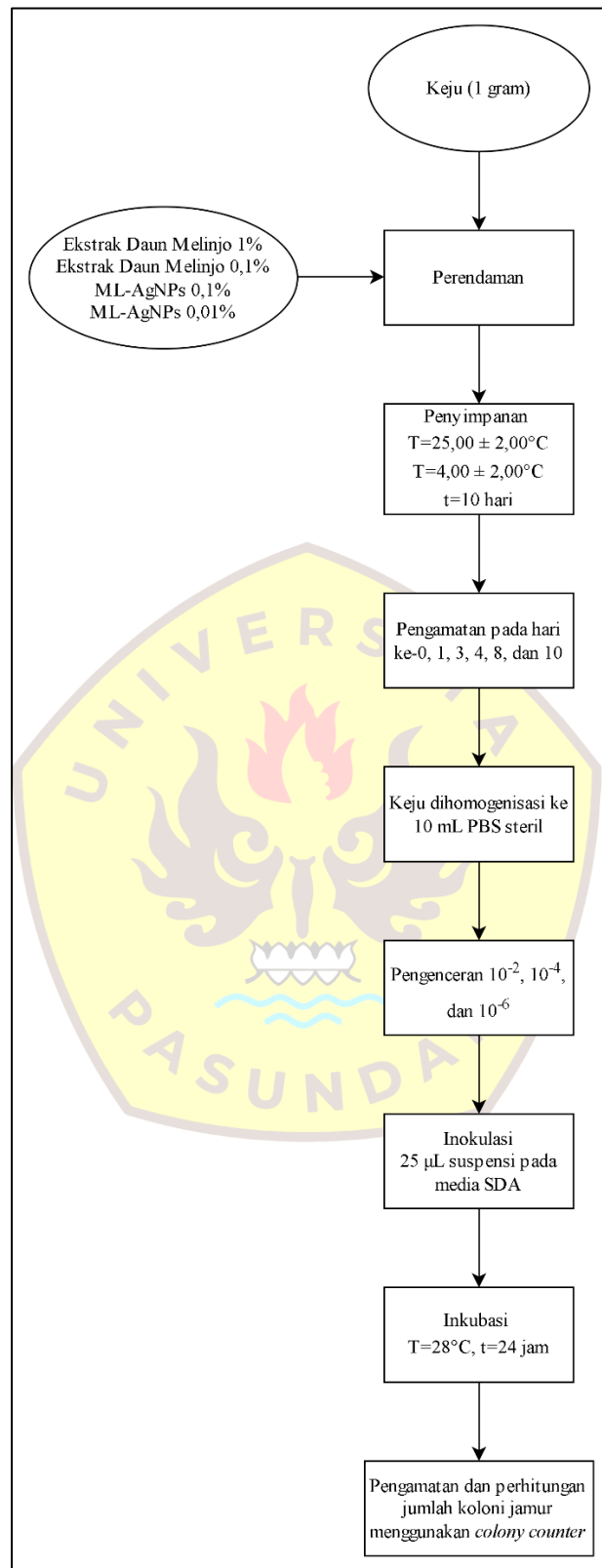
Gambar III.9. Diagram Alir Metode *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC)

III.3.7 Prosedur Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhadap Keju

Prosedur aplikasi ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap keju adalah sebagai berikut:

1. Sampel keju disiapkan untuk dilakukan 5 perlakuan berbeda dengan 2 suhu penyimpanan berbeda.
2. Keju dipotong sebanyak 10 buah dengan berat 1 gram untuk setiap perlakuan, lalu dimasukkan ke dalam wadah steril.
3. Keju direndam dengan tiap perlakuan berbeda yaitu, konsentrasi 0% (kontrol), ekstrak daun melinjo 1%, ekstrak daun melinjo 0,1%, ML-AgNPs 0,1%, dan ML-AgNPs 0,01%.
4. Keju disimpan selama 10 hari, dengan suhu berbeda: *room temperature* ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$) dan *chiller temperature* ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$).
5. Pengamatan dilakukan pada waktu 0 jam, 1 hari, 3 hari, 4 hari, 8 hari, dan 10 hari.
6. Pada pengamatan, keju dimasukkan ke dalam wadah yang berisi 10 mL larutan PBS steril, kemudian dicampur menggunakan alat *vortex* hingga mencapai kondisi homogen.
7. Untuk mendapatkan seri pengenceran 10^{-2} , 10^{-4} , dan 10^{-6} , sebanyak 10 μL suspensi diambil dan dilarutkan ke dalam 990 μL PBS steril secara bertahap.
8. Sebanyak 25 μL suspensi dari setiap tingkat pengenceran dipindahkan ke media SDA menggunakan *cotton bud* steril.
9. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam.
10. Jumlah koloni jamur yang terdapat pada media dihitung dengan menggunakan alat *colony counter* dan dinyatakan dalam satuan $\log_{10}\text{CFU/mL}$.

Secara skematik, prosedur dijelaskan pada Gambar III.10.



Gambar III.10. Diagram Alir Prosedur Aplikasi Nanopartikel Perak Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhadap Keju

Bab IV Hasil dan Pembahasan

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

IV.1 Penelitian Tahap I “Karakterisasi dan Ekstraksi Bubuk Daun Melinjo”

IV.1.1 Karakteristik Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo

Pada penelitian ini, bubuk daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dianalisis untuk diketahui berbagai parameter fisik dan kimianya. Analisis yang dilakukan terdiri atas 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 melinjo.

Tabel IV.1. Hasil Karakterisasi Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo

Karakteristik Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	Nilai
Warna	L^* 41,40 ± 0,95
	a^* -3,39 ± 0,02
	b^* 10,09 ± 0,61
Kadar Air (%)	7,73 ± 0,32
pH	5,94 ± 0,01
Aktivitas Air (a_w)	0,58 ± 0,00

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

IV.1.1.1 Warna Bubuk Daun Melinjo

Analisis warna ditentukan oleh tiga parameter, yaitu L^* (kecerahan), a^* (kemerahan/kehijauan), dan b^* (kekuningan/kebiruan). Pengukuran L^* (*Lightness*) merupakan nilai parameter kecerahan (warna akromatis, nilai 0 = hitam hingga 100 = putih), a^* untuk nilai warna kromatik campuran merah hijau dengan nilai $a^* = 0-100$ untuk warna merah dan nilai $a^* = 0-(-80)$ untuk warna hijau, serta b^* untuk

nilai warna akromatik campuran kuning biru dengan nilai $b^* = 0-70$ untuk warna kuning dan nilai $b^* = 0-(-70)$ untuk warna biru (Engelen, 2018). Parameter warna bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.) berdasarkan Tabel 6, dengan nilai L^* , a^* , dan b^* rata-rata masing-masing secara berurutan sebesar $41,40 \pm 0,95$, $-3,39 \pm 0,02$, dan $10,09 \pm 0,61$. Nilai L^* untuk bubuk daun melinjo (Gambar IV.1) menunjukkan bahwa bubuk lebih cenderung ke arah kecerahan dengan warna abu-abu sedang. Nilai a^* negatif menunjukkan bahwa bubuk memiliki kecenderungan menuju warna hijau, sedangkan nilai b^* positif menunjukkan kecenderungan menuju warna kuning.



Gambar IV.1. Bubuk Daun Melinjo

Hasil pengukuran warna tersebut tidak terlepas dari komposisi pigmen alami yang terkandung di dalam jaringan daun melinjo serta pengaruh degradasi termal selama tahapan pengeringan (preparasi bubuk). Nilai L^* sebesar 41,40 menunjukkan bahwa bubuk memiliki tingkat kecerahan menengah ke bawah (cenderung gelap). Penurunan tingkat kecerahan ini sangat umum terjadi pada pembuatan bubuk daun akibat adanya penguapan air yang memicu penyusutan jaringan selulosa, konsentrasi pigmen yang semakin pekat, serta potensi terjadinya reaksi pencoklatan

non-enzimatis ringan selama proses pengeringan (Engelen, 2018). Sementara itu, nilai a^* yang bernilai negatif (-3,39) secara langsung merepresentasikan spektrum warna hijau. Warna hijau ini dipertahankan oleh residu pigmen klorofil utama pembentuk fotosistem pada daun melinjo yang masih bertahan setelah proses pemanasan.

Di sisi lain, nilai b^* yang bernilai positif cukup tinggi (10,09) mengindikasikan adanya kontribusi kuat dari spektrum warna kuning. Tingginya parameter kekuningan ini utamanya diatribusikan pada kelimpahan senyawa karotenoid dan flavonoid yang memiliki pigmen dasar kuning hingga jingga pada daun melinjo (Rachmawati, 2017). Lebih jauh lagi, paparan panas selama proses pengeringan sering kali menyebabkan ketidakstabilan pada struktur klorofil, memicu pelepasan ion magnesium dari cincin porfirin, dan mendegradasi sebagian klorofil menjadi molekul turunan seperti feofitin (*pheophytin*) yang berwarna hijau zaitun keabu-abuan. Degradasi klorofil inilah yang menyingkap pigmen karotenoid dan flavonoid yang sebelumnya tertutupi, sehingga warna kuning menjadi lebih terlihat secara visual. Oleh karena itu, berdasarkan kombinasi nilai kecerahan yang moderat, spektrum hijau dari klorofil, dan dominasi kuning dari fitokimia flavonoid, dapat disimpulkan bahwa kecenderungan warna visual dari bubuk daun melinjo yang dihasilkan adalah hijau kekuningan gelap.

IV.1.1.2 Kadar Air Bubuk Daun Melinjo

Berdasarkan pada Tabel IV.1, didapatkan bahwa hasil kadar air pada bubuk daun melinjo sebesar $7,73 \pm 0,32\%$ (b/b) (Gambar IV.2). Menurut BSN (2005), syarat kandungan kadar air untuk simplisia yaitu sebesar 10%.



Gambar IV.2. Kadar Air Bubuk Daun Melinjo

Kadar air memiliki pengaruh yang sangat penting dalam menentukan keawetan dari bahan pangan karena air dapat mempengaruhi sifat-sifat fisik, perubahan kimia, serta kerusakan oleh mikroorganisme yang dapat mengurangi umur simpan bahan pangan. Semakin rendah kadar air suatu bahan pangan, maka akan berbanding terbalik dengan tingkat kekerasan suatu bahan pangan (Engelen, 2018).

Hasil kadar air yang diperoleh menunjukkan bahwa metode preparasi dan pengeringan bubuk daun melinjo telah berlangsung secara optimal. Secara fisiologis, daun melinjo segar memiliki kadar air awal yang sangat tinggi, yakni mencapai lebih dari 70% (TKPI, 2020). Penurunan kadar air yang drastis hingga memenuhi standar mutu (di bawah 10%) ini memiliki dua manfaat teknis yang sangat penting untuk tahapan penelitian selanjutnya. Pertama, dari segi stabilitas mikrobiologis dan kimiawi, minimalnya persentase air bebas akan menghentikan aktivitas enzimatis intraseluler yang berisiko mendegradasi senyawa bioaktif (seperti flavonoid dan tanin) selama masa penyimpanan bahan baku. Kedua, dari segi efisiensi ekstraksi, kadar air bubuk yang rendah sangat menguntungkan karena

dapat mengoptimalkan kinerja pelarut organik. Apabila bubuk daun melinjo masih mengandung kadar air yang tinggi, sisa air bawaan tersebut akan berdifusi dan mengencerkan pelarut etanol *absolute* (99,5%) yang digunakan saat maserasi. Pengenceran pelarut ini akan mengubah tingkat polaritas etanol, yang pada akhirnya menghambat penetrasi pelarut dan menurunkan kapasitasnya dalam mengekstrak senyawa metabolit sekunder target secara maksimal (Mukhriani, 2014). Oleh karena itu, kadar air 7,73% ini dinilai sangat ideal untuk menjaga mutu struktural bahan sekaligus mendukung efisiensi penarikan senyawa fitokimia daun melinjo.

IV.1.1.3 pH Bubuk Daun Melinjo

Skala pH berkisar dari 0 hingga 14, mengukur tingkat keasaman atau kebasaan makanan. Makanan dengan pH di bawah 7 dianggap asam, sedangkan makanan dengan pH di atas 7 dianggap basa (Ramadhan, 2024). Pada Tabel IV.1, dapat diketahui bahwa pH dari bubuk daun melinjo sebesar $5,94 \pm 0,01$ (Gambar IV.3).



Gambar IV.3. pH Bubuk Daun Melinjo

Dari hasil tersebut dapat dikategorikan bahwa bubuk daun melinjo tergolong asam karena memiliki pH di bawah nilai pH netral yaitu 7. Daun melinjo kaya akan senyawa fenolik seperti asam galat dan asam kafeat, yang merupakan komponen

umum dalam ekstrak tumbuhan dan keberadaannya secara langsung menurunkan pH ekstrak (Kumar & Goel, 2019).

Hasil pengukuran mengindikasikan bahwa bubuk daun melinjo memiliki sifat asam lemah. Karakteristik asam pada jaringan daun melinjo ini secara langsung disebabkan oleh tingginya akumulasi asam-asam organik dan senyawa metabolit sekunder di dalam selnya. Secara spesifik, daun melinjo kaya akan senyawa fenolik seperti asam galat dan asam kafeat, yang merupakan komponen umum dalam ekstrak tumbuhan dan keberadaannya secara langsung berperan dalam menurunkan pH ekstrak (Kumar & Goel, 2019). Keberadaan gugus karboksil dan hidroksil yang reaktif pada asam-asam fenolik tersebut berkontribusi dalam melepaskan ion hidrogen (H^+) saat dilarutkan, sehingga menurunkan nilai pH secara keseluruhan. Dari segi stabilitas fisikokimia bahan, kondisi pH yang sedikit asam ini sangat menguntungkan karena dapat membantu mempertahankan integritas senyawa flavonoid dan tanin agar tidak mudah teroksidasi selama masa penyimpanan bubuk daun melinjo. Selain itu, kondisi asam lemah ini merupakan prakondisi lingkungan kimiawi yang sangat ideal untuk memfasilitasi kelancaran proses reduksi ion perak pada tahapan sintesis hijau selanjutnya.

IV.1.1.4 Aktivitas Air Bubuk Daun Melinjo

Pada Tabel IV.1, ditunjukkan bahwa bubuk daun melinjo memiliki aktivitas air (a_w) sebesar $0,58 \pm 0,00$ (Gambar IV.4).



Gambar IV.4. Aktivitas Air Bubuk Daun Melinjo

Aktivitas air merupakan jumlah air bebas yang terkandung dalam suatu bahan dan salah satu faktor yang harus diperhatikan karena berpengaruh terhadap kualitas suatu bahan pangan (Supriyadi & Rujita, 2013). Air bebas ini yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhan. Batas aman yang harus dimiliki oleh suatu bahan pangan agar terhindar dari pertumbuhan mikroba yaitu kurang dari 0,61 (Tapia dkk., 2008).

Jika kadar air merepresentasikan total persentase air di dalam bahan, maka aktivitas air (a_w) secara spesifik menunjukkan ketersediaan jumlah air bebas yang terkandung dalam suatu bahan dan merupakan faktor penentu yang sangat krusial terhadap kualitas serta stabilitas suatu bahan pangan (Supriyadi & Rujita, 2013). Air bebas inilah yang dapat diakses dan digunakan oleh mikroorganisme pembusuk untuk melangsungkan proses metabolisme dan pertumbuhannya. Pencapaian nilai a_w sebesar 0,58 ini memberikan indikasi bahwa tahapan pengeringan daun melinjo segar menjadi bubuk telah berjalan dengan sangat efektif. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa bubuk daun melinjo yang dihasilkan pada tahap ini memiliki jaminan umur simpan yang sangat baik, stabil secara kimiawi, dan secara biologis

sangat aman dari risiko proliferasi kapang maupun khamir selama masa penyimpanan sebelum proses ekstraksi dilakukan.

IV.1.2 Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Pada penelitian ini, ekstrak daun melinjo (Gambar IV.5) dibuat dengan menggunakan 50 gram bubuk daun melinjo, yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol *absolute*. Hasil yang diperoleh dari proses ekstraksi bubuk daun melinjo dapat dilihat pada Tabel IV.2 di bawah ini.



Gambar IV.5. Ekstrak Kasar Daun Melinjo

Tabel IV.2. Hasil Ekstrak Daun Melinjo

Sampel Bubuk Daun Melinjo	50,00 ± 0,00 gram
Pelarut Ekstrak (Etanol)	200,00 ± 0,00 mL
Hasil Ekstrak yang Didapat	4,41 ± 0,00 gram
Persentase Hasil Ekstrak	8,82%

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol *absolute* 99,5%. Pelarut organik, seperti etanol dan heksana, lebih sering digunakan untuk

mengekstrak daun dalam penelitian terkait makanan. Etanol menjadi pilihan terbaik untuk digunakan karena umumnya lebih aman untuk dikonsumsi dan efektif dalam mengekstrak komponen yang diinginkan (Trisha dkk., 2024). Dalam penelitian ini, ekstraksi dilakukan dengan perbandingan bahan baku dan pelarut 1:4 (b/v), yaitu seberat 50 gram bubuk daun melinjo dan 200 mL etanol *absolute*. Proses ekstraksi dibantu dengan menggunakan *incubator shaker*, dengan kecepatan 75 rpm dan suhu 30°C selama 24 jam. Pengocokan tersebut dilakukan bertujuan untuk mempercepat kontak antara bahan baku dengan pelarut. Kemudian larutan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman No. 1* dan dibantu juga dengan mesin *aspirator pump* untuk membuat kondisi vakum yang mempercepat proses penyaringan. Prinsip kerja dari mesin tersebut adalah berdasarkan adanya sirkulasi air sebagai fluida kerja yang menghasilkan tekanan tinggi dan menciptakan kondisi vakum. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* dengan kecepatan 84 rpm dan suhu 40°C selama 20 menit. Proses evaporasi bertujuan untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak daun melinjo seberat $4,41 \pm 0,00$ gram atau 8,82%.

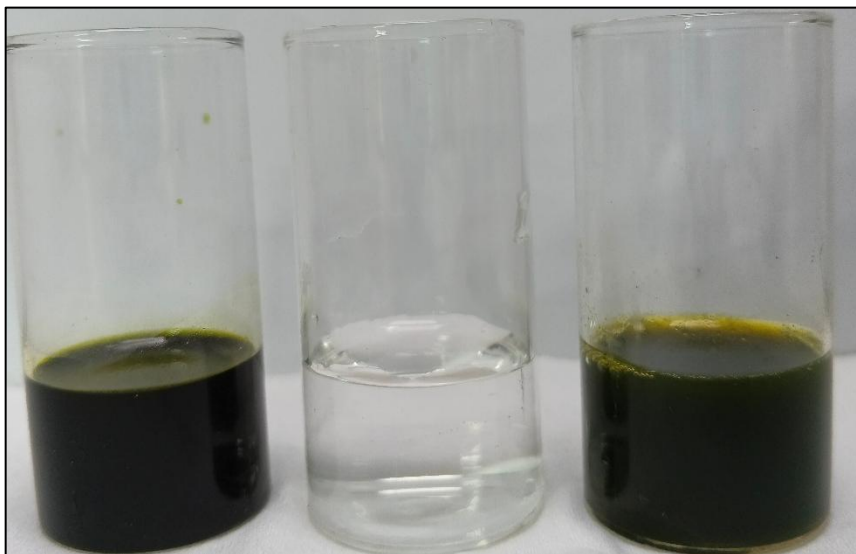
Nilai rendemen sebesar 8,82% yang diperoleh tersebut merepresentasikan persentase akumulasi senyawa bioaktif dan material organik larut lainnya yang berhasil diekstrak dari matriks seluler bubuk daun melinjo. Tercapainya rendemen ini tidak terlepas dari kombinasi tepat antara jenis pelarut dan metode ekstraksi yang diaplikasikan. Penggunaan etanol *absolute* terbukti sangat ideal karena etanol merupakan pelarut polar yang memiliki kemampuan penetrasi membran seluler yang sangat baik. Tingkat polaritas etanol tersebut sangat sesuai dengan sifat kepolaran senyawa metabolit sekunder target pada daun melinjo seperti polifenol, flavonoid, dan tanin sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat tertarik keluar secara maksimal (Trisha dkk., 2024).

IV.2 Penelitian Tahap II “Sintesis ML-AgNPs dan Menentukan Aktivitas Anti-*Candida* dari Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs”

Penelitian tahap II terdiri dari pembuatan ML-AgNPs, WDA, MIC, dan MFC.

IV.2.1 Sintesis ML-AgNPs

Keberhasilan proses sintesis *Melinjo Leaf-mediated Silver Nanoparticles* (ML-AgNPs) secara makroskopis dapat diamati melalui terjadinya perubahan warna visual pada larutan campuran (Gambar IV.6).



Gambar IV.6. Perbandingan antara Ekstrak 10%, DMSO, dan ML-AgNPs 1%

Pada tahap awal reaksi, larutan prekursor perak nitrat (AgNO_3) 1 mM yang direaksikan dengan ekstrak daun melinjo akan menunjukkan warna hijau tua yang merupakan warna bawaan dari pigmen tanaman. Namun, seiring berjalannya waktu inkubasi pada kondisi yang telah ditentukan, warna suspensi secara bertahap bertransformasi menjadi cokelat kehijauan pekat. Perubahan visual menjadi cokelat kehijauan ini merupakan fenomena yang sangat khas pada sintesis hijau menggunakan ekstrak daun. Warna tersebut terbentuk dari kombinasi antara bertahannya pigmen alami, seperti klorofil, dari daun melinjo sebagai agen penstabil, serta munculnya sifat optik *Surface Plasmon Resonance* (SPR) dari koloid nanopartikel perak yang memendarkan warna kecokelatan saat terpapar cahaya (Wazir dkk., 2011). Perubahan warna ini menjadi indikator empiris utama bahwa ion perak murni (Ag^+) telah berhasil direduksi menjadi partikel perak bervalensi nol (Ag^0).

Selain memicu perubahan warna, pengamatan fisik terhadap suspensi ML-AgNPs juga tidak menunjukkan adanya endapan di dasar wadah, yang mengindikasikan bahwa koloid nanopartikel yang terbentuk memiliki tingkat kestabilan yang sangat baik. Kestabilan ini merupakan bukti langsung dari efektivitas metode sintesis hijau. Gugus hidroksil bebas dari senyawa polifenol dan flavonoid di dalam daun melinjo tidak hanya berfungsi sebagai agen pereduksi (*bioreductor*), tetapi sisa molekul mikronya secara otomatis menyelimuti permukaan luar partikel perak yang baru terbentuk. Pembungkusan molekuler ini bertindak sebagai agen penudung biogenik yang menciptakan gaya tolak elektrostatis dan rintangan sterik antarpartikel, sehingga ML-AgNPs terhindar dari proses penggumpalan (Saidi, 2026). Keberhasilan sintesis tahap awal ini menjadi bukti kelayakan fisikokimia ML-AgNPs sebelum diaplikasikan sebagai agen pengawet.

IV.2.2 Well Diffusion Assay (WDA)

Berbagai metode dapat dilakukan untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu senyawa, baik percobaan secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penilaian *in vitro* yang paling umum dan banyak digunakan adalah metode difusi. Metode difusi yang pertama kali dikembangkan oleh Heatley (1944) untuk uji penisilin yaitu difusi cakram agar. Prinsip utama metode difusi cakram agar yaitu dengan menginokulasikan pelat agar dengan konsentrasi mikroba yang telah ditentukan, kemudian memasukkan cakram kertas saring pada permukaan agar yang hasilnya dapat diketahui dengan mengukur zona hambat di sekitar cakram. Sangat mirip dengan metode difusi cakram agar, metode *well diffusion assay* (difusi sumur agar) dilakukan dengan membuat lubang dengan diameter 6 mm pada agar yang diisi dengan sampel yang akan diuji. Zona penghambatan, yang dibentuk oleh difusi sampel dalam agar kemudian diukur (Dewi dkk., 2018).

Dalam pengujian aktivitas antimikroba metode *Well Diffusion Assay* (WDA), penggunaan *Amphotericin B* 0,1% sebagai kontrol positif didasarkan pada statusnya sebagai agen antijamur berspektrum luas yang bekerja secara agresif mengikat ergosterol pada membran sel jamur, sehingga memberikan tolok ukur

nilai inhibisi maksimal yang diharapkan. Di sisi lain, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10% digunakan sebagai kontrol negatif karena pelarut ini digunakan untuk mendispersikan ekstrak dan nanopartikel perak. Tidak adanya zona hambat pada sumuran DMSO membuktikan bahwa pelarut tersebut sama sekali tidak memengaruhi pertumbuhan *Candida*. Hal ini memberikan kepastian bahwa seluruh zona bening yang terbentuk pada sampel uji murni merupakan hasil dari aktivitas bioaktif ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs, bukan efek toksik dari pelarutnya. Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan, dapat diketahui zona hambat dari ekstrak daun melinjo 10% dan ML-AgNPs 1% yang dapat dilihat pada Tabel IV.3.

Tabel IV.3. Zona Penghambatan Ekstrak Daun Melinjo 10% dan ML-AgNPs 1% Terhadap *Candida*

Strain <i>Candida</i>	Rata-rata Zona Hambat (mm)			
	Ekstrak Daun Melinjo 10%	ML-AgNPs 1%	<i>Amphotericin</i> B 0,1%	DMSO 10%
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	8,00 ± 1,50 ^a	7,67 ± 0,76 ^a	13,00 ± 0,00	NA
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	6,67 ± 0,76 ^a	6,33 ± 0,58 ^a	11,50 ± 0,00	NA
<i>Candida krusei</i> ATCC 32196	7,83 ± 0,76 ^a	7,33 ± 0,76 ^a	12,50 ± 0,00	NA
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	7,00 ± 0,87 ^a	6,83 ± 0,29 ^a	9,00 ± 0,00	NA

Keterangan:

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

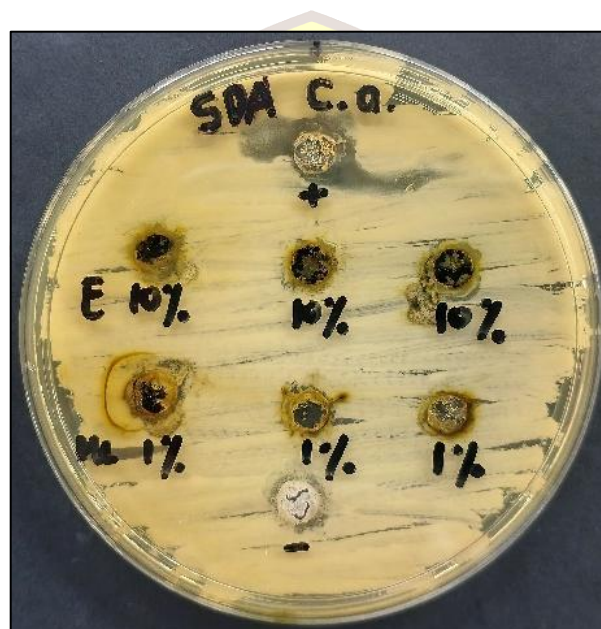
NA: *No Active* (tidak ada hambatan)

Hasil dinyatakan sebagai rata-rata ± standar deviasi (SD); n = 3×3

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda di kolom yang sama berbeda secara signifikan (p<0,05)

Aktivitas anti-*Candida* diketahui dengan menggunakan ekstrak daun melinjo dengan konsentrasi 10% dan ML-AgNPs 1% menggunakan agar WDA yang disajikan pada Tabel IV.3. Hasil yang diperoleh menunjukkan zona bening yang mengindikasikan kerentanan terhadap *Candida*. Pada ekstrak daun melinjo 10%,

aktivitas penghambatan tertinggi dialami oleh *C. albicans* (Gambar IV.7) dengan zona hambat sebesar $8,00 \pm 1,50$ mm, diikuti oleh *C. krusei*, *C. parapsilosis*, dan *C. glabrata* dengan masing-masing zona hambat sebesar $7,83 \pm 0,76$ mm, $7,00 \pm 0,87$ mm, dan $6,67 \pm 0,76$ mm. Sementara itu, pada ML-AgNPs 1% aktivitas penghambatan tertinggi dialami oleh *C. albicans* dengan zona hambat sebesar $7,67 \pm 0,76$ mm, diikuti oleh *C. krusei*, *C. parapsilosis*, dan *C. glabrata* dengan masing-masing zona hambat sebesar $7,33 \pm 0,76$ mm, $6,83 \pm 0,29$ mm, dan $6,33 \pm 0,58$ mm. Sementara itu, tidak ada bakteri yang terpengaruh oleh penggunaan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.



Gambar IV.7. Zona Hambat Kontrol Positif (*Amphotericin B* 0,1%), Ekstrak Daun Melinjo 10%, ML-AgNPs 1%, dan Kontrol Negatif (DMSO 10%) pada *Candida albicans*

Dengan pemberian konsentrasi yang berbeda, yaitu ekstrak daun melinjo 10% dan ML-AgNPS 1%, bertujuan untuk menunjukkan bahwa dengan adanya AgNPs pada ekstrak daun melinjo akan meningkatkan diameter zona hambat yang terbentuk, yang menandakan bahwa adanya peningkatan aktivitas antimikroba. Pada penelitian ini, zona hambat pada ML-AgNPS 1% lebih kecil dibandingkan ekstrak daun melinjo 10% dikarenakan faktor- faktor yang mempengaruhi aktivitas anti-

Candida. Faktor yang mempengaruhi salah satunya yaitu kepekatan stok ML-AgNPs yang lebih pekat sehingga mengurangi daya difusi pada media agar. Nanopartikel logam dan senyawa fitokimia yang menyelimutinya memiliki densitas serta tingkat aglomerasi koloid yang lebih kompleks dibandingkan molekul ekstrak bebas. Dengan demikian, banyaknya zat bioaktif yang dapat berdifusi ke dalam agar lebih sedikit, sehingga pembentukan zona hambat juga lebih kecil (Rahman dkk., 2012). Untuk meningkatkan akurasi penelitian ini, yang sebagian besar bersifat kualitatif dan belum optimal untuk penilaian efektivitas anti-*Candida*, diperlukan data kuantitatif yang lebih akurat. Maka, dilakukan uji MIC dan MFC yang sangat penting untuk menilai kemanjuran anti-*Candida* ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs.

IV.2.3 Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC)

Konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan yang tampak disebut MIC, sementara konsentrasi fungisida minimal (MFC) adalah konsentrasi terendah dari zat antijamur yang memiliki kemampuan untuk membunuh pertumbuhan kultur secara keseluruhan (Ramadhan, 2024). Diameter zona hambat merupakan petunjuk kepekaan mikroba uji, dimana semakin besar zona hambat maka aktivitas antimikroba semakin besar pula (Anggraini, 2024). Hasil uji MIC dan MFC ekstrak daun melinjo terhadap *Candida* dapat dilihat pada Tabel IV.4.

Tabel IV.4. MIC dan MFC Ekstrak Daun Melinjo 10% Terhadap *Candida*

<i>Strain Candida</i>	Ekstrak 10%			<i>Amphotericin B</i> 1%		
	MIC	MFC	Keterangan	MIC	MFC	Keterangan
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12,50	12,50	Fungisida	0,04	0,31	Fungistatik
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	6,25	12,50	Fungistatik	0,04	0,31	Fungistatik
<i>Candida krusei</i> ATCC 32196	6,25	25,00	Fungistatik	0,08	0,63	Fungistatik
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	12,50	12,50	Fungisida	0,08	1,25	Fungistatik

Keterangan:

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

MIC = MFC : menunjukkan adanya efek fungisida

MIC < MFC : menunjukkan adanya efek fungistatik

MIC > MFC : menunjukkan adanya kesalahan pada penelitian

96 *well plate* untuk penentuan MIC dan MFC ekstrak daun melinjo terhadap *Candida*, dengan konsentrasi kolom 1 (a): kontrol negatif, kolom 2 (b): kontrol positif, kolom 3 (c): 0,09 mg/mL, kolom 4 (d): 0,20 mg/mL, kolom 5 (e): 0,39 mg/mL, kolom 6 (f): 0,78 mg/mL, kolom 7 (g): 1,56 mg/mL, kolom 8 (h): 3,13 mg/mL, kolom 9 (i): 6,25 mg/mL, kolom 10 (j): 12,50 mg/mL, kolom 11 (k): 25,00 mg/mL, dan kolom 12 (l): 50,00 mg/mL ekstrak daun melinjo 10% dengan SDA dan inokulum. Hasil uji MIC dan MFC ML-AgNPs terhadap *Candida* dapat dilihat pada Tabel IV.5.

Tabel IV.5. MIC dan MFC ML-AgNPs 1% Terhadap *Candida*

<i>Strain Candida</i>	ML-AgNPs 1%			<i>Amphotericin B</i> 1%		
	MIC	MFC	Keterangan	MIC	MFC	Keterangan
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	5,00	Fungistatik	0,04	0,31	Fungistatik
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	1,25	2,50	Fungistatik	0,04	0,31	Fungistatik
<i>Candida krusei</i> ATCC 32196	2,50	2,50	Fungisida	0,08	0,63	Fungistatik
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,25	>5,00	Fungistatik	0,08	1,25	Fungistatik

Keterangan:

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

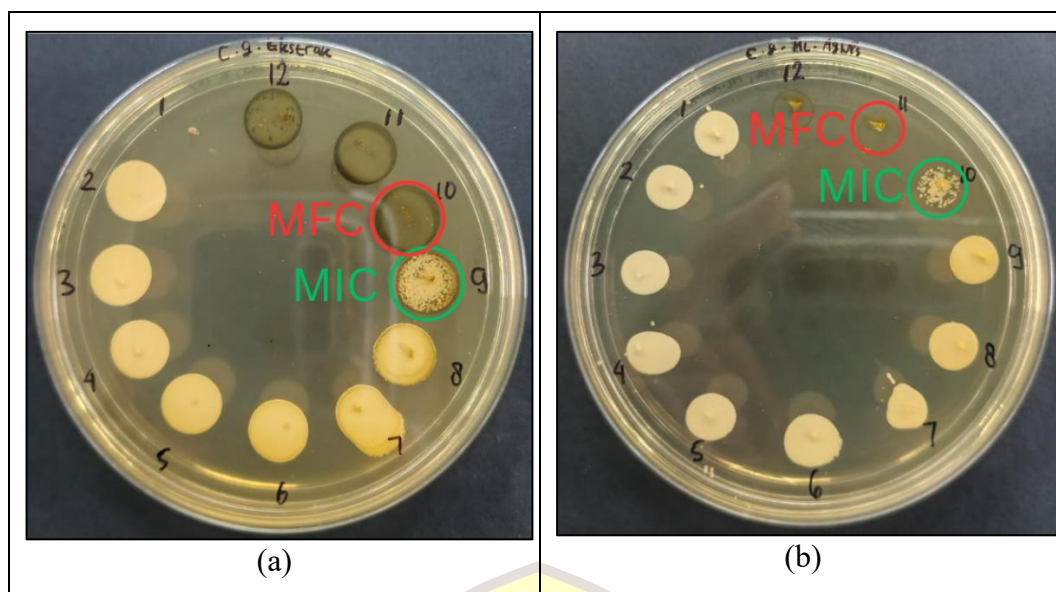
MIC = MFC : menunjukkan adanya efek fungisida

MIC < MFC : menunjukkan adanya efek fungistatik

MIC > MFC : menunjukkan adanya kesalahan pada penelitian

Pada uji menggunakan ML-AgNPs, konsentrasi kolom 1 (a): kontrol negatif, kolom 2 (b): kontrol positif, kolom 3 (c) : 0,01 mg/mL, kolom 4 (d): 0,02 mg/mL, kolom 5 (e): 0,04 mg/mL, kolom 6 (f): 0,08 mg/mL, kolom 7 (g): 0,16 mg/mL, kolom 8 (h): 0,31 mg/mL, kolom 9 (i): 0,63 mg/mL, kolom 10 (j): 1,25 mg/mL, kolom 11 (k): 2,50 mg/mL, dan kolom 12 (l): 5,00 mg/mL ML-AgNPs dengan SDA dan inokulum.

Pada Tabel IV.5, dapat diketahui bahwa ekstrak kulit melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menunjukkan aktivitas fungistatik dan fungisida terhadap semua spesies *Candida* yang diuji. Hasil penelitian menunjukkan nilai MIC berkisar antara 6,25 hingga 12,50 mg/mL dan nilai MFC berkisar antara 12,50 hingga 25,00 mg/mL. Hasil menunjukkan bahwa *C. glabrata* (Gambar IV.8) merupakan yang paling rentan terhadap ekstrak, dengan nilai MIC sebesar 6,25 mg/mL dan nilai MFC sebesar 12,50 mg/mL.



Gambar IV.8. Hasil Uji MIC dan MFC pada *C. glabrata* dengan (a) Ekstrak Daun Melinjo 10% dan (b) ML-AgNPs

Berikutnya adalah pada *C. krusei* dengan nilai MIC sebesar 6,25 mg/mL dan nilai MFC sebesar 25,00 mg/mL, serta *C. albicans* dan *C. parapsilosis* merupakan yang paling resisten terhadap ekstrak, dengan nilai MIC sama dengan MFC sebesar 12,50 mg/mL. Efek fungistatik terlihat pada *C. glabrata* dan *C. krusei*, sedangkan efek fungisida terlihat pada *C. albicans* dan *C. parapsilosis*. Pada Tabel 10, dapat diketahui bahwa ML-AgNPs menunjukkan efek fungistatik terhadap semua spesies *Candida*, namun tidak menunjukkan efek fungisida terhadap *C. parapsilosis*. Hasil penelitian menunjukkan nilai MIC berkisar antara 1,25 hingga 2,50 mg/mL dan nilai MFC berkisar antara 2,50 hingga lebih dari 5,00 mg/mL. Hasil menunjukkan bahwa *C. glabrata* merupakan yang paling rentan terhadap ML-AgNPs, dengan nilai MIC sebesar 1,25 mg/mL dan nilai MFC sebesar 2,50 mg/mL. Berikutnya adalah pada *C. krusei* dengan nilai MIC sama dengan MFC sebesar 2,50 mg/mL, lalu *C. albicans* dengan nilai MIC sebesar 1,25 mg/mL dan nilai MFC sebesar 5,00 mg/mL. Sementara itu, *C. parapsilosis* merupakan *Candida* yang paling resisten terhadap ML-AgNPs, dengan nilai MIC sebesar 1,25 mg/mL dan nilai MFC sebesar lebih dari 5,00 mg/mL. Efek fungisida terlihat pada *C. krusei*, sementara pada *Candida* yang lain menunjukkan efek fungistatik.

Pada Gambar IV.8 terlihat bahwa ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs menunjukkan aktivitas anti-*Candida* yang efektif terhadap *C. glabrata*. Dibandingkan dengan hasil pada *Amphotericin B* 1%, ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs menunjukkan nilai MIC dan MFC yang lebih besar terhadap semua strain *Candida*, yang mengindikasikan bahwa efektivitas anti-*Candida* masih lebih rendah dibandingkan dengan *Amphotericin B*. Namun, ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs tetap mampu menghambat pertumbuhan bahkan membunuh *Candida*. ML-AgNPs juga memiliki efektivitas lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *Candida* dibandingkan ekstrak daun melinjo, dilihat dengan peningkatan pada nilai MIC dan MFC pada masing-masing *Candida* yang dapat dilihat pada Tabel IV.6.

Tabel IV.6. Peningkatan MIC dan MFC dari Ekstrak Daun Melinjo ke ML-AgNPs

<i>Strain Candida</i>	Peningkatan dari Ekstrak Daun Melinjo ke ML-AgNPs	
	MIC	MFC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10×	2,5×
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	5×	5×
<i>Candida krusei</i> ATCC 32196	2,5×	10×
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	10×	<2,5×

Berdasarkan hasil pada Tabel IV.6, terjadinya penurunan nilai MIC dan MFC yang sangat tajam pada ML-AgNPs dibandingkan ekstrak murni dengan rata-rata peningkatan efektivitas hingga 6,89 kali lipat pada MIC dan 5,00 kali lipat pada MFC. Ukuran partikel ML-AgNPs yang sangat kecil memberikan rasio luas permukaan terhadap volume yang jauh lebih besar dibandingkan molekul ekstrak biasa (Qing dkk., 2018). Kondisi ini memungkinkan partikel nano untuk menempel lebih kuat dan berpenetrasi lebih dalam ke matriks sel *Candida*. Begitu berinteraksi dengan sel, ML-AgNPs tidak hanya melepaskan ion perak (Ag^+) yang memicu kerusakan DNA, tetapi senyawa fitokimia daun melinjo yang menyelubungi

partikel tersebut (sebagai *capping agent*) turut bekerja merusak dinding sel sehingga mempercepat inaktivasi sel patogen (Bere dkk., 2019).

Analisis rasio peningkatan MIC dan MFC juga menunjukkan pola mekanisme penghambatan dari material uji. Jika ekstrak murni dominan bersifat fungisida pada beberapa spesies, ML-AgNPs justru lebih banyak menunjukkan efek fungistatik (menghambat pertumbuhan tanpa membunuh secara instan) pada sebagian besar spesies, kecuali pada *C. krusei*. Meskipun bersifat fungistatik pada rentang tersebut, pencapaian inhibisi pertumbuhan pada konsentrasi yang sangat kecil memberikan keuntungan yang luar biasa bagi industri pangan. Konsentrasi efektif yang sangat rendah ini berarti bahwa penggunaan ML-AgNPs sebagai pengawet tidak memerlukan penambahan dosis dalam jumlah besar. Aplikasi dosis rendah ini sangat esensial untuk meminimalisasi risiko toksisitas logam perak bagi konsumen (Saidi, 2026), sekaligus mencegah terjadinya penyimpangan rasa, aroma, maupun diskolorasi warna akibat penambahan ekstrak daun melinjo pada produk keju.

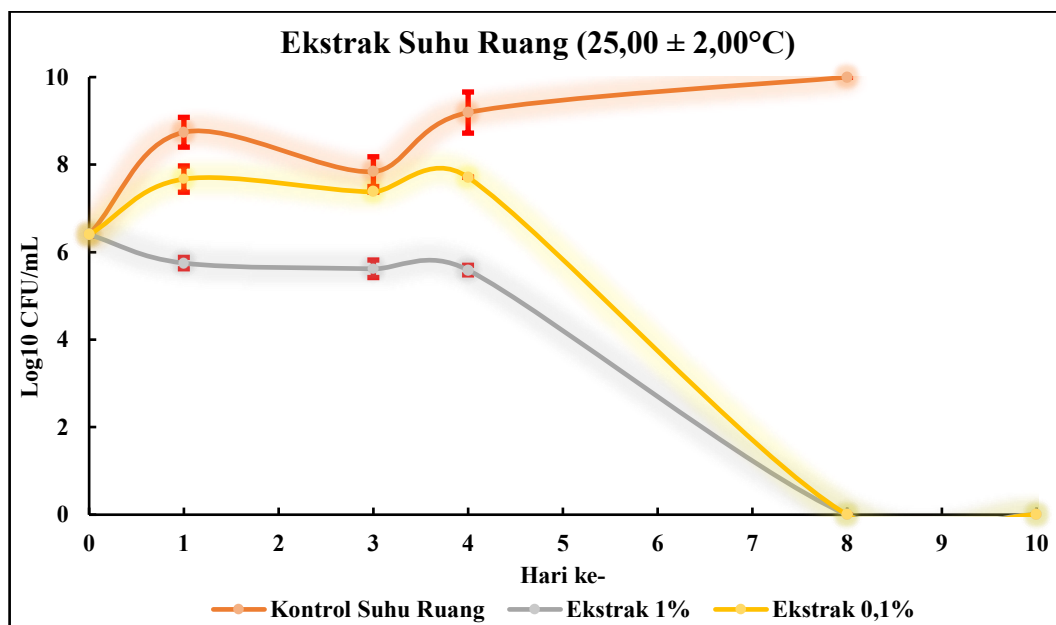
IV.3 Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan ML-AgNPs Terhadap Keju Selama Penyimpanan”

Banyak mikroorganisme bawaan makanan yang tidak hanya menyebabkan pembusukan makanan, tetapi juga bersifat patogen serta menimbulkan risiko terhadap keamanan pangan dan penyakit bawaan makanan bagi masyarakat umumnya. Pengujian mikrobiologi rutin pada makanan diperlukan untuk mencegah kontaminasi dan mengurangi resiko terpapar penyakit dari makanan (Ramadhan, 2024). Pada pengujian ini, dilakukan analisis pengaruh ekstrak daun melinjo konsentrasi 1,00% dan 0,10%, serta ML-AgNPs konsentrasi 0,10% dan 0,01% pada penyimpanan sampel keju. Penyimpanan dilakukan dengan dua kondisi suhu berbeda, yaitu suhu ruangan ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$) dan suhu pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$), serta untuk waktu penyimpanan yang berbeda (0 hari, 1 hari, 3 hari, 4 hari, 8 hari, dan 10 hari). Metode yang digunakan untuk mengevaluasi aktivitas mikrobiologi pada bahan pangan adalah pengujian *Total Fungal Count* (TFC) dengan menggunakan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

IV.3.1 Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ\text{C}$)

Hasil yang dapat dilihat pada Gambar IV.9 menunjukkan pengaruh ekstrak daun melinjo terhadap jumlah total jamur (TFC) pada keju yang disimpan pada suhu ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ\text{C}$) selama 10 hari. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak daun melinjo (0,00%, 1,00%, dan 0,10%) serta potensi sifat anti-*Candida* selama masa penyimpanan. Total jumlah *Candida* pada keju dengan berbagai konsentrasi menunjukkan fluktuasi, yaitu naik turunnya jumlah mikroba setiap hari. Pada penambahan ekstrak 0,00% terjadi peningkatan jumlah mikroba pada hari pertama, dari $6,40 \log_{10}$ CFU/mL menjadi $8,74 \log_{10}$ CFU/mL (Tabel IV.7). Peningkatan ini merupakan suatu hal yang lumrah karena mikroba akan terus bertumbuh dan berkembang pada makanan dengan suhu penyimpanan yang sesuai untuk pertumbuhannya.

Hasil utama yang dapat dilihat dari penelitian ini adalah penurunan jumlah mikroba pada penambahan ekstrak 1,00% dan 0,10% dibandingkan dengan 0,00%, dimana pada hari ke-1 hingga hari ke-4 menunjukkan pengaruh ekstrak daun melinjo dalam menghambat pertumbuhan *Candida*. Pada hari ke-8, pertumbuhan *Candida* pada penambahan ekstrak 0,00% mencapai batas terlalu banyak untuk dihitung (*Too Many To Count*/TNTC). Hal ini menunjukkan bahwa tanpa penambahan ekstrak, pertumbuhan mikroba tidak terhambat secara efektif selama penyimpanan, terutama karena tidak ada senyawa bioaktif yang mampu menghambat mikroorganisme. Sedangkan pada sampel dengan penambahan ekstrak 1,00% dan 0,10% mengalami fungisida dimana mikroba sudah tidak menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan, yang membuktikan bahwa kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak daun melinjo mampu menghambat bahkan membunuh *Candida* pada keju. Pengurangan jumlah mikroba pada penambahan ekstrak 1,00% lebih signifikan dibandingkan dengan 0,01%, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin besar kemampuan penghambatannya dalam pertumbuhan *Candida*.



Gambar IV.9. Grafik Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Tabel IV.7. Jumlah Jamur (TFC) pada Keju Setelah Penyimpanan selama 10 Hari yang Diberi Ekstrak Daun Melinjo dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Konsentrasi Ekstrak (%)	Lama Penyimpanan (Hari)					
	0	1	3	4	8	10
0,00	6,40 ± 0,03 ^{Ca}	8,74 ± 0,34 ^{Aa}	7,84 ± 0,34 ^{Ba}	9,19 ± 0,47 ^{Aa}	TNTC	TNTC
0,10	6,40 ± 0,03 ^{Cb}	7,67 ± 0,30 ^{Ab}	7,38 ± 0,01 ^{Bb}	7,71 ± 0,00 ^{Ab}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}
1,00	6,40 ± 0,03 ^{Cc}	5,75 ± 0,13 ^{Ac}	5,62 ± 0,20 ^{Bc}	5,59 ± 0,11 ^{Ac}	0,00 ± 0,00 ^{Dc}	0,00 ± 0,00 ^{Dc}

Keterangan:

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf besar yang berbeda pada baris yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

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

TNTC (*Too Numerous to Count*)

Pertumbuhan *Candida* yang sangat pesat pada sampel kontrol (0,00%) hingga mencapai batas TNTC pada hari ke-8 dan ke-10 sangat berkaitan erat dengan kondisi lingkungan penyimpanan. Suhu ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ\text{C}$) merupakan rentang suhu mesofilik yang sangat ideal untuk mendukung laju metabolisme, aktivitas enzimatik, dan proliferasi sel khamir secara eksponensial. Ditambah lagi, keju memiliki aktivitas air (a_w) yang relatif tinggi dan kaya akan residu laktosa, asam laktat, serta nutrisi esensial lainnya yang menjadi substrat sempurna bagi pertumbuhan *Candida* (Garnier dkk., 2017). Ketiadaan agen antimikroba pada sampel kontrol menyebabkan mikroorganisme pembusuk ini dapat dengan leluasa mendegradasi produk, yang pada kondisi riil di industri akan menyebabkan kerusakan fisik, perubahan tekstur, dan *off-flavor* dalam waktu singkat.

Sebaliknya, penurunan signifikan pada populasi *Candida* hingga mencapai 0,00 \log_{10} CFU/mL pada sampel perlakuan membuktikan adanya aktivitas bioaktif yang kuat dari ekstrak daun melinjo. Keberhasilan efek fungisida ini disebabkan oleh tingginya penetrasi senyawa fitokimia, terutama flavonoid dan tanin, yang terkandung dalam ekstrak daun melinjo ke dalam matriks keju. Senyawa polifenol tersebut bekerja dengan cara merusak struktur dinding sel *Candida*, mengubah permeabilitas membran plasma, dan mengikat protein intraseluler hingga memicu lisis atau kematian sel secara permanen (Trisha dkk., 2024).

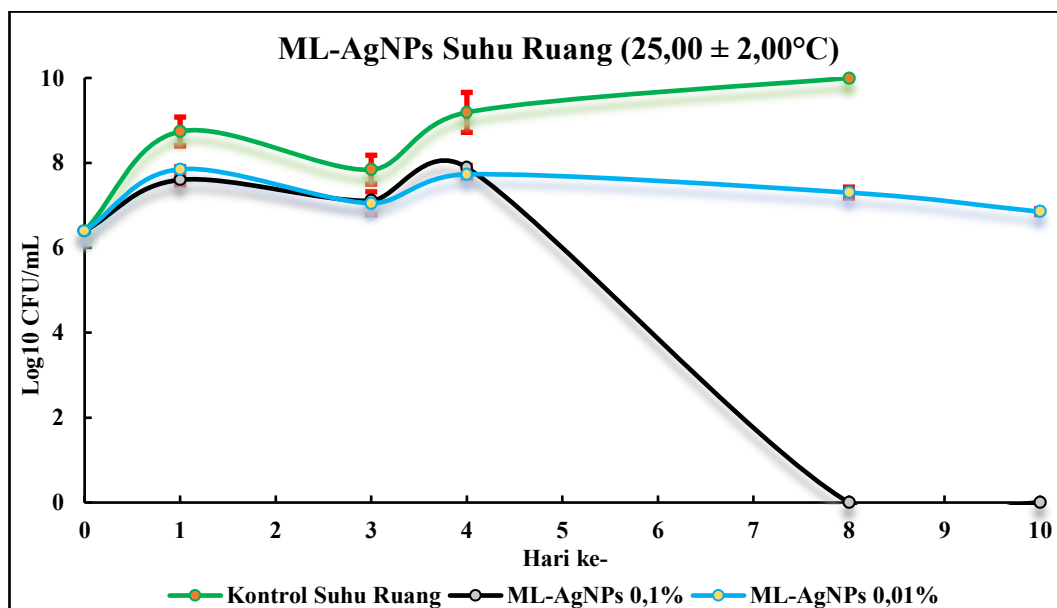
Penambahan ekstrak 1,00% menunjukkan laju penurunan populasi *Candida* yang lebih tajam dan stabil sejak awal masa inkubasi dibandingkan dengan konsentrasi 0,10%. Fenomena ini menegaskan bahwa semakin tinggi persentase ekstrak yang digunakan, semakin banyak pula ketersediaan senyawa bioaktif yang berinteraksi langsung dengan membran patogen. Keberhasilan aplikasi ekstrak nabati dalam memperpanjang umur simpan produk olahan susu pada suhu ruang ini selaras dengan penelitian Fadhlurrohman dkk. (2023), yang membuktikan bahwa penambahan ekstrak kaya polifenol (teh hitam) ke dalam formulasi keju secara signifikan mampu menekan laju pertumbuhan mikroorganisme perusak dan

bertindak sebagai pengawet alami yang sangat efektif tanpa harus bergantung secara mutlak pada fasilitas pendinginan berantai (*cold chain*).

IV.3.2 Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Evaluasi aktivitas antijamur dari ML-AgNPs terhadap populasi *Candida* pada keju selama 10 hari penyimpanan di suhu ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$) disajikan pada Gambar IV.10. Berdasarkan grafik tersebut, dinamika populasi mikroba secara umum mengalami fluktuasi selama masa pengamatan pada ketiga tingkat konsentrasi. Pada sampel kontrol tanpa penambahan agen antimikroba (0,00%), terlihat adanya lonjakan jumlah mikroba yang cukup tajam di hari pertama penyimpanan.

Perbedaan hasil yang sangat mencolok mulai terlihat ketika membandingkan sampel kontrol dengan sampel yang diberi perlakuan ML-AgNPs. Sejak hari pertama hingga hari keempat, penambahan nanopartikel perak baik pada konsentrasi 0,01% maupun 0,10% secara konsisten mampu menekan laju pertumbuhan *Candida*. Memasuki hari ke-8, sampel kontrol (0,00%) sudah mengalami pembusukan dengan jumlah koloni yang mencapai batas TNTC akibat ketiadaan senyawa bioaktif yang mampu menahan laju mikroorganisme. Sebaliknya, pada hari yang sama, keju dengan perlakuan ML-AgNPs 0,10% justru menunjukkan ketiadaan aktivitas pertumbuhan mikroba ($0,00 \log_{10} \text{CFU/mL}$) (Tabel IV.8). Hasil ini mengindikasikan terjadinya efek fungisida, di mana nanopartikel perak terbukti mampu membunuh sel jamur pada keju secara menyeluruh. Selain itu, tingkat penurunan mikroba pada konsentrasi 0,10% tampak jauh lebih besar dibandingkan konsentrasi 0,01%, yang menegaskan bahwa efektivitas daya hambat ML-AgNPs berbanding lurus dengan besarnya konsentrasi yang diaplikasikan pada produk.



Gambar IV.10. Grafik Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Tabel IV.8. Jumlah Jamur (TFC) pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi ML-AgNPs dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Konsentrasi ML-AgNPs (%)	Lama Penyimpanan (Hari)					
	0	1	3	4	8	10
0,00	6,40 ± 0,03 ^{Ca}	8,74 ± 0,34 ^{Aa}	7,84 ± 0,34 ^{Ba}	9,19 ± 0,47 ^{Aa}	TNTC	TNTC
0,01	6,40 ± 0,03 ^{Cc}	7,85 ± 0,06 ^{Ac}	7,05 ± 0,27 ^{Bc}	7,73 ± 0,10 ^{Ac}	7,30 ± 0,13 ^{Cc}	6,85 ± 0,07 ^{Cc}
0,10	6,40 ± 0,03 ^{Cb}	7,60 ± 0,12 ^{Ab}	7,11 ± 0,02 ^{Bb}	7,89 ± 0,05 ^{Ab}	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	0,00 ± 0,00 ^{Cb}

Keterangan:

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf besar yang berbeda pada baris yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

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

TNTC (*Too Numerous to Count*)

Berdasarkan hasil analisis statistik ANOVA dan uji lanjut Tukey yang telah dilakukan, terdapat perbedaan yang nyata antara pertumbuhan jamur pada kontrol (0,00%) dengan keju yang diberi perlakuan ML-AgNPs 0,10% dan 0,01%. Penurunan jumlah *Candida* yang sangat drastis pada konsentrasi 0,10% hingga mencapai 0,00 log₁₀ CFU/mL disebabkan oleh kemampuan nanopartikel perak dalam melepaskan ion perak (Ag⁺). Ion perak ini sangat reaktif dan dapat menembus dinding sel jamur, lalu mengganggu proses metabolisme seluler serta memicu kerusakan oksidatif yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel *Candida* secara permanen.

Jika dibandingkan dengan hasil uji aplikasi ekstrak murni pada suhu ruang, penggunaan ML-AgNPs menunjukkan efektivitas penghambatan yang jauh lebih baik. Pada penggunaan ekstrak daun melinjo murni, dibutuhkan konsentrasi sebesar 1,00% untuk menghentikan pertumbuhan *Candida* secara total. Namun, pada ML-AgNPs, konsentrasi 0,10% saja sudah cukup untuk memberikan efek fungisida yang sama pada hari ke-8. Bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah yaitu 0,01%, laju pertumbuhan mikroba masih dapat ditekan di angka 6,85 log₁₀ CFU/mL pada hari ke-10, di saat sampel kontrol sudah mengalami kerusakan parah atau TNTC. Tingginya efektivitas ML-AgNPs ini dikarenakan ukuran partikelnya yang berada pada skala nanometer. Ukuran yang sangat kecil memberikan luas permukaan kontak yang lebih besar, sehingga nanopartikel perak dapat menempel dan berpenetrasi lebih mudah ke dalam matriks keju maupun ke dalam membran sel *Candida*.

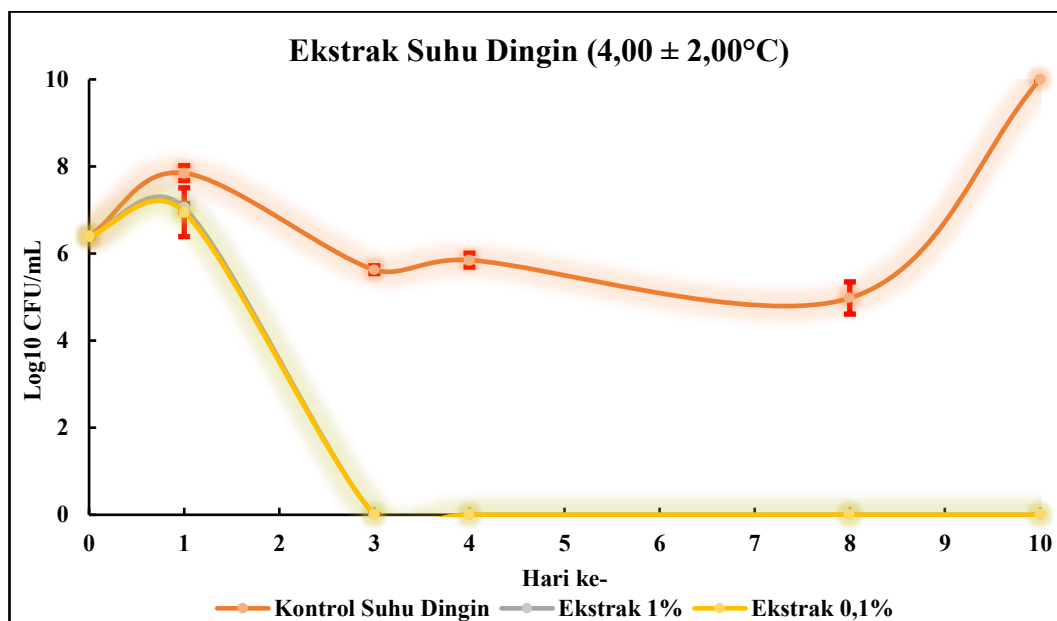
Fenomena penetrasi yang baik pada matriks makanan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Gmail dkk. (2023), yang menyatakan bahwa pelapis berbasis nanopartikel perak mampu memberikan perlindungan antimikroba yang lebih merata dan kuat di dalam matriks bahan pangan dibandingkan agen pengawet konvensional. Dari segi aplikasi pada industri pangan, kemampuan ML-AgNPs dalam menghambat mikroba pada konsentrasi yang sangat rendah (0,10%) memberikan keuntungan yang besar. Penggunaan dosis yang minim ini sangat

penting untuk mencegah terjadinya perubahan warna atau penyimpangan rasa (*off-flavor*) pada produk keju asli, sekaligus memastikan bahwa penggunaan nanopartikel perak ini tetap berada pada batas aman untuk dikonsumsi oleh manusia.

IV.3.3 Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap Populasi Jamur pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Pengamatan terhadap total populasi jamur (TFC) pada keju yang diberi ekstrak daun melinjo dan disimpan pada suhu pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$) selama 10 hari disajikan pada Gambar IV.11. Grafik tersebut memperlihatkan dinamika pertumbuhan *Candida* yang diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 0,00%, 0,10%, dan 1,00%. Pada pengamatan hari pertama, keju tanpa penambahan ekstrak mengalami kenaikan populasi mikroba dari angka awal $6,40 \log_{10}$ CFU/mL menjadi $7,85 \log_{10}$ CFU/mL (Tabel IV.9). Meskipun disimpan pada suhu dingin, peningkatan jumlah *Candida* di awal masa simpan ini masih dapat terjadi karena mikroba tersebut perlahan beradaptasi dengan lingkungan keju yang kaya nutrisi untuk terus berkembang.

Efek ekstrak daun melinjo dalam menghambat *Candida* mulai terlihat jelas ketika dibandingkan dengan sampel kontrol seiring berjalannya waktu penyimpanan. Memasuki hari ke-10, sampel keju tanpa ekstrak membusuk dengan jumlah koloni jamur yang mencapai batas terlalu banyak untuk dihitung (TNTC). Kondisi ini membuktikan bahwa suhu pendinginan saja tidak cukup kuat untuk mencegah kerusakan produk jika tidak ada senyawa bioaktif yang bekerja sebagai pengawet. Sebaliknya, keju yang diberi ekstrak 0,10% dan 1,00% menunjukkan hasil yang sangat positif, di mana populasi mikroba turun drastis hingga tidak ada lagi pertumbuhan ($0,00 \log_{10}$ CFU/mL) yang terdeteksi mulai dari hari ke-3 hingga akhir masa pengujian. Hasil ini menegaskan bahwa penggunaan senyawa bioaktif dari daun melinjo yang dikombinasikan dengan suhu dingin mampu memberikan efek fungisida yang sangat efektif dalam menuntaskan kontaminasi *Candida* pada keju.



Gambar IV.11. Grafik Pengaruh Ekstrak Daun Melinjo Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Tabel IV.9. Jumlah Jamur (TFC) Pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi Ekstrak Daun Melinjo dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Konsentrasi Ekstrak (%)	Lama Penyimpanan (Hari)					
	0	1	3	4	8	10
0,00	6,40 ± 0,03 ^{Ba}	7,85 ± 0,17 ^{Aa}	5,63 ± 0,09 ^{Da}	5,85 ± 0,16 ^{Da}	4,98 ± 0,37 ^{Da}	TNTC
	6,40 ± 0,03 ^{Bb}	6,95 ± 0,56 ^{Ab}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Cb}
0,10	6,40 ± 0,03 ^{Bb}	7,05 ± 0,10 ^{Ab}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Cb}
	6,40 ± 0,03 ^{Bb}	7,05 ± 0,10 ^{Ab}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Db}	0,00 ± 0,00 ^{Cb}

Keterangan:

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf besar yang berbeda pada baris yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

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

TNTC (*Too Numerous to Count*)

Berdasarkan analisis statistik yang dilakukan (Tabel IV.9), perlakuan penambahan ekstrak daun melinjo memberikan perbedaan yang nyata dalam menekan populasi *Candida* dibandingkan dengan sampel kontrol. Temuan paling krusial dari pengujian pada suhu pendinginan ini terletak pada kecepatan pencapaian efek fungisida. Jika dibandingkan dengan aplikasi ekstrak pada suhu ruang, di mana ekstrak murni baru mampu memusnahkan *Candida* secara total pada hari ke-8, kombinasi ekstrak dengan suhu pendingin ($4,00^{\circ}\text{C}$) ternyata mampu mempercepat kematian sel khamir, yakni mencapai $0,00 \log_{10}$ CFU/mL hanya dalam waktu 3 hari penyimpanan.

Percepatan kematian sel ini dapat dijelaskan secara ilmiah melalui mekanisme sinergisme rintangan ganda (*hurdle technology*) dalam sistem pengawetan pangan. Secara fisiologis, paparan suhu dingin akan menginduksi stres termal pada *Candida*, yang berdampak langsung pada penurunan drastis laju metabolisme, inaktivasi enzim intraseluler, serta berkurangnya fluiditas (kelenturan) membran sel jamur (Tapia dkk., 2008). Ketika membran sel patogen sedang berada dalam kondisi kaku, stres, dan sangat rentan akibat suhu dingin tersebut, senyawa fitokimia dari ekstrak daun melinjo, khususnya flavonoid dan tanin, dapat mengikat protein membran dan merusak integritas struktural sel dengan jauh lebih mudah dan mematikan. Mikroba yang mengalami tekanan ganda ini akan kehilangan kemampuannya untuk melakukan mekanisme perbaikan sel, sehingga fase kematian terjadi jauh lebih cepat (Garnier dkk., 2017).

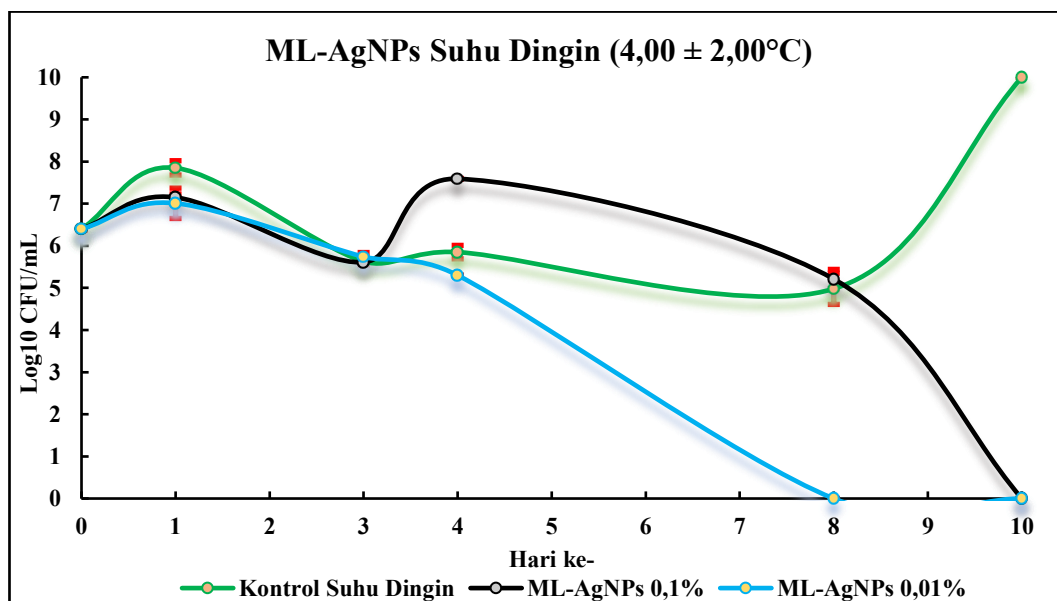
Perpaduan antara suhu rendah dan agen antimikroba alami ini juga selaras dengan temuan pada penelitian Ahmed dkk. (2025), yang membuktikan bahwa kelangsungan hidup *C. albicans* pada produk keju akan merosot tajam ketika hambatan lingkungan (seperti suhu dan salinitas) dikombinasikan dengan intervensi senyawa aktif. Dari perspektif di bidang industri, hasil pengujian ini memberikan kesimpulan yang sangat menjanjikan. Penggunaan ekstrak daun melinjo dalam konsentrasi yang sangat rendah (0,10%) terbukti sudah sangat memadai untuk menjamin keamanan mikrobiologis keju segar dan mencegah kerusakan oleh

Candida, dengan catatan produk tersebut didukung oleh sistem penyimpanan rantai dingin (*cold chain*) yang konsisten.

IV.3.4 Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba pada Keju Selama Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Evaluasi terhadap kemampuan ML-AgNPs dalam menekan populasi jamur pada keju yang disimpan pada suhu pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$) dapat dilihat pada Gambar IV.12. Secara keseluruhan, pergerakan jumlah koloni *Candida* memperlihatkan adanya fluktuasi pada awal masa simpan. Pada sampel kontrol (0,00%), populasi awal mikroba yang berada di angka $6,40 \log_{10}$ CFU/mL naik menjadi $7,85 \log_{10}$ CFU/mL (Tabel IV.10) tepat pada pengamatan hari pertama. Peningkatan awal ini menegaskan bahwa *Candida* masih sanggup beradaptasi dan melanjutkan fase pertumbuhannya memanfaatkan nutrisi pada keju, sekalipun sudah ditempatkan di lingkungan bersuhu rendah.

Perbandingan laju pertumbuhan antara sampel kontrol dan sampel perlakuan ML-AgNPs mengungkap hasil utama yang sangat signifikan. Keju tanpa penambahan agen antimikroba terbukti tidak mampu menahan pertumbuhan jamur, hingga akhirnya mengalami pembusukan dengan jumlah koloni mencapai status TNTC di pengujung masa simpan atau hari ke-10. Kondisi ini membuktikan bahwa suhu dingin semata tidak akan memberikan hambatan yang cukup berarti tanpa adanya senyawa bioaktif pendukung. Sebaliknya, sampel yang mendapatkan intervensi ML-AgNPs 0,01% dan 0,10% sukses memperlihatkan tren penurunan populasi yang drastis. Kematian sel secara total atau efek fungisida ($0,00 \log_{10}$ CFU/mL) berhasil dicapai pada hari ke-8 untuk konsentrasi 0,01%, dan disusul oleh konsentrasi 0,10% pada hari ke-10.



Gambar IV.12. Grafik Pengaruh ML-AgNPs Terhadap Populasi Mikroba Pada Keju Selama 10 Hari Penyimpanan pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Tabel IV.10. Jumlah Jamur (TFC) Pada Keju Setelah Penyimpanan Selama 10 Hari yang Diberi ML-AgNPs dengan Konsentrasi yang Berbeda dan Kondisi pada Suhu Pendinginan ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Konsentrasi ML-AgNPs (%)	Lama Penyimpanan (Hari)					
	0	1	3	4	8	10
0,00	6,40 ± 0,03 ^{Ba}	7,85 ± 0,17 ^{Aa}	5,63 ± 0,09 ^{Ca}	5,85 ± 0,16 ^{Ba}	4,98 ± 0,37 ^{Ea}	TNTC
	6,40 ± 0,03 ^{Bc}	7,01 ± 0,36 ^{Ac}	5,74 ± 0,10 ^{Cc}	5,30 ± 0,01 ^{Bc}	0,00 ± 0,00 ^{Ec}	0,00 ± 0,00 ^{Dc}
0,01	6,40 ± 0,03 ^{Bb}	7,15 ± 0,08 ^{Ab}	5,61 ± 0,03 ^{Cb}	7,59 ± 0,01 ^{Bb}	5,21 ± 0,23 ^{Eb}	0,00 ± 0,00 ^{Db}
	6,40 ± 0,03 ^{Bb}	7,15 ± 0,08 ^{Ab}	5,61 ± 0,03 ^{Cb}	7,59 ± 0,01 ^{Bb}	5,21 ± 0,23 ^{Eb}	0,00 ± 0,00 ^{Db}

Keterangan:

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf besar yang berbeda pada baris yang sama berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

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

TNTC (*Too Numerous to Count*)

Berdasarkan analisis statistik yang dilakukan, penambahan ML-AgNPs memberikan perbedaan yang signifikan terhadap penekanan populasi *Candida* dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan (0,00%). Jika dibandingkan dengan aplikasi ML-AgNPs pada suhu ruang, penyimpanan pada suhu pendinginan (4,00°C) menunjukkan sinergisme yang sangat menguntungkan, terutama pada konsentrasi rendah. Pada suhu ruang, ML-AgNPs 0,01% hanya mampu menahan laju pertumbuhan dan belum mencapai efek fungisida secara total hingga hari ke-10. Namun, pada suhu pendinginan, konsentrasi 0,01% yang sama justru berhasil memusnahkan sel *Candida* secara menyeluruh (0,00 log₁₀ CFU/mL) lebih cepat, yakni pada hari ke-8. Suhu dingin secara fisiologis memicu stres termal pada *Candida* yang berdampak pada penurunan laju metabolisme dan berkurangnya fluiditas membran sel. Dalam kondisi sel jamur yang melemah tersebut, daya tembus ion perak (Ag⁺) dari ML-AgNPs yang menginduksi ROS menjadi jauh lebih agresif dan mematikan. Hasil ini sejalan dengan penelitian Gmail dkk. (2023), yang menegaskan bahwa aplikasi perlindungan berbasis nanopartikel perak memberikan kualitas pengawetan yang jauh lebih superior ketika dikombinasikan dengan penyimpanan pada suhu dingin.

Akan tetapi, hasil analisis yang menarik muncul ketika dibandingkan dengan aplikasi ekstrak daun melinjo murni pada suhu pendinginan. Ekstrak murni ternyata mampu memberikan efek fungisida yang lebih cepat, yakni pada hari ke-3, dibandingkan dengan ML-AgNPs yang baru mematikan mikroba pada hari ke-8 hingga ke-10. Keterlambatan efek mematikan pada ML-AgNPs di suhu rendah ini diduga kuat berkaitan dengan faktor kinetika dan stabilitas fisik nanomaterial. Suhu yang rendah (4,00°C) secara termodinamika dapat memperlambat laju disolusi dan pelepasan ion perak dari inti nanopartikel ke lingkungan sekitarnya. Selain itu, matriks keju yang padat lemak akan menjadi semakin mengeras di suhu dingin, sehingga berpotensi menurunkan laju difusi partikel nano jika dibandingkan dengan penyebaran molekul polifenol pada ekstrak murni yang lebih mudah melarut. Meskipun efek fungisidanya membutuhkan waktu yang sedikit lebih lama dibandingkan ekstrak, penggunaan ML-AgNPs 0,01% pada suhu dingin tetap

menjadi alternatif pengawetan yang sangat baik. Penggunaan dosis nanomaterial yang teramat minim ini sangat penting secara industrial, karena dapat secara efektif meminimalisasi risiko toksisitas logam sekaligus menjaga profil sensoris keju segar agar tidak mengalami perubahan warna maupun penyimpangan aroma.



Bab V Kesimpulan dan Saran

Bab ini menyimpulkan hasil penelitian (5.1) Kesimpulan dan menyampaikan saran-saran berdasarkan penelitian yang telah dilakukan (5.2) Saran.

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian, analisis data, dan pembahasan yang telah dilakukan pada penelitian ini, diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Bubuk daun melinjo tua memiliki karakteristik fisikokimia yang sangat mendukung untuk digunakan sebagai agen sintesis biologi. Bubuk ini memiliki nilai warna $L^* 41,40 \pm 0,95$, $a^* -3,39 \pm 0,02$, dan $b^* 10,09 \pm 0,61$, dengan kadar air sebesar $7,73 \pm 0,32\%$, aktivitas air (a_w) $0,58 \pm 0,00$, dan pH asam lemah $5,94 \pm 0,01$ yang ideal untuk kestabilan proses reduksi ion perak. Proses ekstraksi maserasi dari simplisia tersebut menghasilkan rendemen ekstrak kasar sebesar 8,82%.
2. Modifikasi ekstrak daun melinjo menjadi ML-AgNPs terbukti secara signifikan melipatgandakan efektivitas aktivitas anti-*Candida* secara *in vitro*. Hal ini dibuktikan dengan penurunan drastis pada nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) menjadi 1,25–2,50 mg/mL dan *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) menjadi 2,50–(>5,00) mg/mL, yang jauh lebih baik dibandingkan kemampuan ekstrak murni (MIC 6,25–12,50 mg/mL dan MFC 12,50–25,00 mg/mL).
3. Penambahan ML-AgNPs sangat efektif dalam menekan populasi jamur pada keju. Pada suhu ruang ($25,00^\circ\text{C} \pm 2,00^\circ\text{C}$), ML-AgNPs 0,10% mampu memberikan efek fungisida total ($0,00 \log_{10}$ CFU/mL) pada hari ke-8. Sementara itu, dengan suhu pendinginan ($4,00^\circ\text{C} \pm 2,00^\circ\text{C}$) memungkinkan penggunaan dosis ML-AgNPs yang teramat rendah, yakni 0,01%, untuk mencapai tingkat pemusnahan total yang sama pada hari ke-8, menjadikan ML-AgNPs sebagai agen biopreservatif yang sangat tangguh dibandingkan ekstrak murni.

V.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang penulis dapat sampaikan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengoptimalkan metode sintesis hijau, penelitian lanjutan dapat mengeksplorasi penggunaan bahan dasar logam transisi lainnya yang juga memiliki aktivitas antimikroba, seperti nanopartikel seng oksida (ZnONPs) atau emas (AuNPs). Di samping itu, penggunaan sumber hayati lain, seperti bagian tanaman melinjo yang lain (kulit, biji) atau tanaman lokal lain yang kaya akan polifenol, dapat dicoba sebagai agen bioreduktor guna membandingkan efektivitas karakteristik partikel dan reaktivitas biologis yang dihasilkan.
2. Perlu dilakukan pengujian aplikasi pengawetan dengan rentang waktu pengamatan yang lebih panjang (misalnya lebih dari 10 hari atau hingga masa kedaluwarsa maksimal keju) untuk melihat ketahanan jangka panjang ML-AgNPs. Selain itu, pengujian pada suhu penyimpanan yang lebih beragam, seperti fluktuasi suhu ekstrem (*temperature abuse*), diperlukan untuk mensimulasikan kondisi distribusi komersial di lapangan.
3. Disarankan untuk mengaplikasikan ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs pada berbagai jenis produk pangan lain yang juga rentan terhadap kerusakan oleh khamir atau jamur, seperti produk roti-rotian (*bakery*), saus, atau sari buah. Hal ini penting untuk mengevaluasi interaksi nanopartikel dengan matriks pangan yang memiliki karakteristik protein, lemak, dan pH yang berbeda dari keju.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, B. M., & Ali, E. M. (2022). Therapeutic Effect of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Erodium glaucophyllum* Extract against Oral Candidiasis: In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*, 27(13). <https://doi.org/10.3390/molecules27134221>
- Ahmad, K. M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O. P., & Piškur, J. (2014). Genome structure and Dynamics of The Yeast Pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 529–535. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12145>
- Ahmed, L., Taher, E. M., Fahim, K. M., & Ali, Z. (2025a). Occurrence of Some Spoilage Microorganisms in Cheese Highlighting The Impact of Salt and Starter Culture Activity on The Viability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2025.315453.2361>
- Ahmed, L., Taher, E. M., Fahim, K. M., & Ali, Z. (2025b). Occurrence of Some Spoilage Microorganisms in Cheese Highlighting The Impact of Salt and Starter Culture Activity on The Viability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2025.315453.2361>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: a Green Expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Aisyah S., Hayuningtyas, T., Wiwin, Ramadhani, E., & Liss Dyah Dewi A. (2024). Pengaruh Mikroba dalam Pembuatan Keju dengan Fermentasi Asam Laktat. *Intellektika : Jurnal Ilmiah Mahasiswa*, 2(4), 48-55. <https://doi.org/10.59841/intellektika.v2i4.1275>
- Aliifah, F., Rustama, M., & Putranto, W. (2023). Skrining Bakteri Asam Laktat dan Khamir Potensial Proteolitik Ekstraseluler dan Milk Clotting Activity dari

- Getah dan Fresh Cheese Pepaya (*Carica papaya* L.). *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 4(2), 167-186. <https://doi.org/10.24198/jthp.v4i2.49944>
- Amenta, V., Aschberger, K., Arena, M., Bouwmeester, H., Botelho Moniz, F., Brandhoff, P., Gottardo, S., Marvin, H. J. P., Mech, A., Quiros Pesudo, L., Rauscher, H., Schoonjans, R., Vettori, M. V., Weigel, S., & Peters, R. J. (2015). Regulatory Aspects of Nanotechnology in the Agri/Feed/Food Sector in EU and non-EU Countries. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.016>
- Andasari, S. D., Hermanto, A. A., & Wahyuningsih, A. (2020). Perbandingan Hasil Skrining Fitokimia Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan Metode Maserasi dan Sokhletasi. *Jurnal Ilmu Farmasi*, 11(2), 27–31.
- Anggraeni. (2017). Rendemen, Nilai pH, Tekstur, dan Mutu Hedonik Keju Segar dengan Bahan Pengasam Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). [Fakultas Peternakan dan Pertanian Undip]. <https://eprints.undip.ac.id/55247/>
- Anggraini, V. A. (2024). Efek Ekstrak Daun Kecombrang (*Etligeria elatior*) sebagai Antibakteri Alami *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. Bachelor (S1) thesis, Wijaya Kusuma Surabaya University.
- Ariningsih, E. (2016). Prospek Penerapan Teknologi Nano dalam Pertanian dan Pengolahan Pangan di Indonesia. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, 34(1), 1–20.
- Bere, M. L., Sibarani, J., & Manurung, M. (2019). Sintesis Nanopartikel Perak (NPAg) Menggunakan Ekstrak Air Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) dan Aplikasinya dalam Fotodegradasi Zat Warna Metilen Biru. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 7(2), 155–164.
- BSN. (2005). Simplisia Jahe. Dalam *SNI 01-7084-2005*.
- Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015). Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, 80(5), R910–R923. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>
- Dewi, I. C., Falaise, C., Hellio, C., Bourgougnon, N., & Mouget, J. L. (2018). Anticancer, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Properties in Microalgae.

- Dalam *Microalgae in Health and Disease Prevention* (hlm. 235–261). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00012-8>
- Dewi, N. (2007). Kajian Pembuatan Keju Olahan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak, Februari*, 2(1), 10–14.
- Duman, H., Eker, F., Akdaşçi, E., Witkowska, A. M., Bechelany, M., & Karav, S. (2024). Silver Nanoparticles: A Comprehensive Review of Synthesis Methods and Chemical and Physical Properties. *Nanomaterials*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/nano14181527>
- Ely, S., Patty, P. J., & Hutagalung, R. (2025). Formation Kinetics of Green Silver Nanoparticles Using *Gnetum Gnemon* L. Leaf and Fruit Extract As Bioreductors. *Journal Online of Physics*, 10(2), 66–72. <https://doi.org/10.22437/jop.v10i2.41704>
- Engelen, A. (2018a). Analisis Kekerasan, Kadar Air, Warna dan Sifat Sensori pada Pembuatan Keripik Daun Kelor. *Journal of Agritech Science*, 2(1), 10–15.
- Engelen, A. (2018b). Analisis Kekerasan, Kadar Air, Warna dan Sifat Sensori pada Pembuatan Keripik Daun Kelor. *Journal of Agritech Science*, 2(1), 10–15.
- Fadhlurrohman, I., Setyawardani, T., & Sumarmono, J. (2023a). Development of Cheese as an Antioxidant Functional Food with the Addition of Orthodox Black Tea. *Tropical Animal Science Journal*, 46(3), 367–374. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.3.367>
- Fadhlurrohman, I., Setyawardani, T., & Sumarmono, J. (2023b). Development of Cheese as an Antioxidant Functional Food with the Addition of Orthodox Black Tea. *Tropical Animal Science Journal*, 46(3), 367–374. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.3.367>
- Fatril, A. E., & Adawiyah, R. (2025). Kajian Komprehensif *Pichia kudriavzevii*: Epidemiologi, Biologi dan Manifestasi Klinis sebagai Parasit pada Manusia. *Journal Of The Indonesian Medical Association*, 75(3), 156–167. <https://doi.org/10.47830/jinma-vol.75.3-2025-1865>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017a). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An update. Dalam *Microorganisms* (Vol. 5, Nomor 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>

- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017b). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. Dalam *Microorganisms* (Vol. 5, Nomor 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Gemail, M. M., Elesawi, I. E., Jghef, M. M., Alharthi, B., Alsanei, W. A., Chen, C., El-Hefnawi, S. M., & Gad, M. M. (2023). Influence of Wax and Silver Nanoparticles on Preservation Quality of Murcott Mandarin Fruit during Cold Storage and after Shelf-Life. *Coatings*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/coatings13010090>
- Handayani, A., Mardiana, N. R., & Syambarkah, A. (2009). Imobilisasi Nanopartikel Perak sebagai Senyawa Anti-Mikroba pada Kemasan Produk.
- Honga, J., Parhusip, A. J. N., Anugrahati, N. A., Sinaga, W. S. L., & Angel, V. (2019). Stabilization of Red Melinjo Peel (*Gnetum gnemon* L.) Ethyl Acetate Extract as Antibacterial Agent. *Journal of Functional Food and Nutraceutical*, *1*(1), 1–12. <https://doi.org/10.33555/jffn.v1i1.7>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *9*(6), 385–406.
- Jangid, H., Joshi, H. C., Dutta, J., Ahmad, A., Alshammari, M. B., Hossain, K., Pant, G., & Kumar, G. (2025). Advancing Food Safety with Biogenic Silver Nanoparticles: Addressing Antimicrobial Resistance, Sustainability, and Commercial Viability. Dalam *Food Chemistry: X* (Vol. 26). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102298>
- Kato, E., Tokunaga, Y., & Sakan, F. (2009). Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and Their Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(6), 2544–2549. <https://doi.org/10.1021/jf803077p>
- Kining, E., Firdiani, D., & Asma, S. (2022). Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Ekstrak Air Daun Melinjo terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, *7*(1), 19–31.

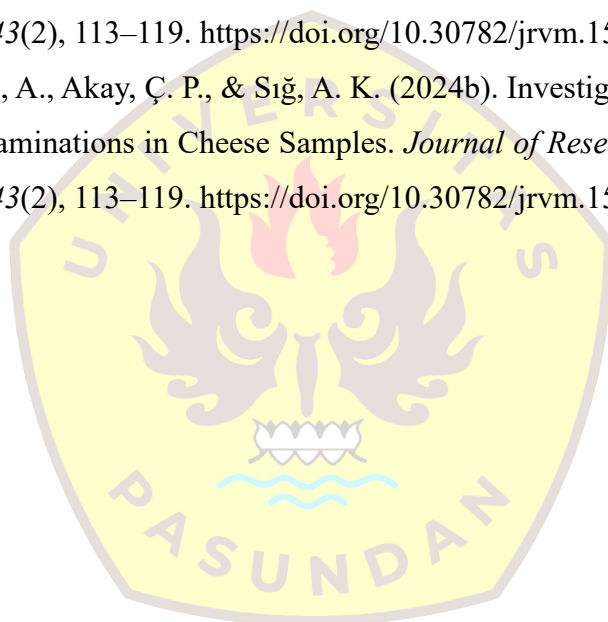
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications. *Biotechnology Reports*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Listyati, D. (2019). Potensi Pengembangan Melinjo. Dalam Dewi Listyati *SIRINOV* (Vol. 7, Nomor 1). <http://health.kompas.com/2010>
- Losito, F., Arienzo, A., Bottini, G., Priolisi, F. R., Mari, A., & Antonini, G. (2014). Microbiological Safety and Quality of Mozzarella Cheese Assessed by The Microbiological Survey Method. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 46–55. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7026>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mokobi, F. (2022a, Agustus 18). *Candida glabrata* - An Overview. Microbe Notes.
- Mokobi, F. (2022b, Agustus 18). *Candida glabrata* - An Overview. Microbe Notes.
- Mukhriani. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2), 361–367.
- Mutiawati, V. K. (2016). Pemeriksaan Mikrobiologi pada *Candida Albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 16(1), 53–3.
- Narayanan, M., Priya, S., Natarajan, D., Alahmadi, T. A., Alharbi, S. A., Krishnan, R., Chi, N. T. L., & Pugazhendhi, A. (2022). Phyto-fabrication of Silver Nanoparticle Using Leaf Extracts of *Aristolochia bracteolata* Lam and Their Mosquito Larvicidal Potential. *Process Biochemistry*, 121, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.06.022>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Dalam *Annual Review of Microbiology* (Vol. 69, Nomor 1, hlm. 71–92). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Nuryanti, S. D., Solikah, W. Y., Salsabillah, M. S., Afifah, N. P., Fauzia, N. S., & Anggraeni, R. L. A. (2024). Review: Karakterisasi Hasil Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Bioreduktor Berbagai Tanaman sebagai Anti Bakteri *Staphylococcus aureus*. *INPHARMED Journal (Indonesian Pharmacy and*

- Natural Medicine Journal*), 8(1), 195.
<https://doi.org/10.21927/inpharmmed.v8i1.4402>
- Padang, S. N. N., Hutagalung, M. H. P., Siregar, J. I., & Suryantika, T. (2020). Perbandingan Pertumbuhan *Candida albicans* pada Air Susu Ibu (ASI) dan Susu Formula. *Prima Journal of Oral and Dental Sciences*, 3(2), 39–43.
<https://doi.org/10.34012/primajods.v3i2.2682>
- Pereira, G. V. de M., Maske, B. L., de Carvalho Neto, D. P., Karp, S. G., De Dea Lindner, J., Martin, J. G. P., de Oliveira Hosken, B., & Soccol, C. R. (2022a). What Is Candida Doing in My Food? A Review and Safety Alert on Its Use as Starter Cultures in Fermented Foods. Dalam *Microorganisms* (Vol. 10, Nomor 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091855>
- Pereira, G. V. de M., Maske, B. L., de Carvalho Neto, D. P., Karp, S. G., De Dea Lindner, J., Martin, J. G. P., de Oliveira Hosken, B., & Soccol, C. R. (2022b). What Is Candida Doing in My Food? A Review and Safety Alert on Its Use as Starter Cultures in Fermented Foods. Dalam *Microorganisms* (Vol. 10, Nomor 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091855>
- Pirbalouti, M. M. A., Shahbazi, S., Shahraki, S. S., Reisi, S., & Mokhtari, A. (2024). Study the Antifungal Effects of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Microbiota*, 1(3), 1–8.
- Pradabsang, C., Sukrong, S., & Warisnoicharoen, W. (2025). Green Synthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles Using Edible Plants. *Natural and Life Sciences Communications*, 24(3). <https://doi.org/10.12982/NLSC.2025.055>
- Puarada, S., Nadia, R., Gurning, S., & Harahap, W. U. (2020). Pemanfaatan Limbah Kulit Buah Melinjo (*Gnetum gnemon* L) Menjadi Produk Olahan Keripik Kulit Buah Melinjo. *Jurnal Pengabdian kepada Masyarakat*, 11(4), 567–572. <http://journal.upgris.ac.id/index.php/e-dimas>
- Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., Liu, H., & Qin, Y. (2018). Potential Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and the Optimization of Orthopedic Implants by Advanced Modification Technologies. Dalam *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13, hlm. 3311–3327). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>

- 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. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 26(3), 124–128. <https://doi.org/10.20956/mff.v26i3.21047>
- Rachmawati, P. (2017). Identifikasi Flavanoid pada Ekstrak Daun Melinjo (*Genatum Genanom L.*).
- Rachmawati, R. (2015). Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) sebagai Antifungi terhadap *Candida Albicans* secara In Vitro [Sarjana Thesis, Universitas Brawijaya]. <https://repository.ub.ac.id/id/eprint/125641/>
- Rahman, D. T., Sutrisna, E. M., & Candrasari, A. (2012). Uji Efek Antibakteri Ekstrak Etil Asetat dan Kloroform Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 11229 secara In Vitro. *Biomedika*, 4(2), 18.
- Ramadhan, R. S. (2024). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhadap Patogen Bawaan Makanan dan Pengaruhnya Bagi Populasi Mikroba pada Ayam Mentah. Tugas Akhir Program Sarjana, Universitas Pasundan.
- Saidi, N. A. (2026). Enhancing Antibacterial Activity of Green Synthesis of Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Leaf Eextract-Mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) Against Foodborne Pathogens and Their Safety. Universiti Putra Malaysia.
- Santoso, M., Naka, Y., Angkawidjaja, C., Yamaguchi, T., Matoba, T., & Takamura, H. (2010). Antioxidant and DNA Damage Prevention Activities of the Edible Parts of *Gnetum gnemon* and Their Changes upon Heat Treatment. *Food Sci. Technol. Res*, 16(6), 549–556.
- Singh, P., & Journal, R. (2018). Nanotechnology in Food Preservation. *Food Science Research Journal*, 9(2), 435–441. <https://doi.org/10.15740/HAS/FSRJ/9.2/435-441>. Copyright
- Srikandi. (2012a). Uji Cemaran Bakteri dan Cendawan pada Keju Kasar (Cheddar). *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 2(1), 92–100.

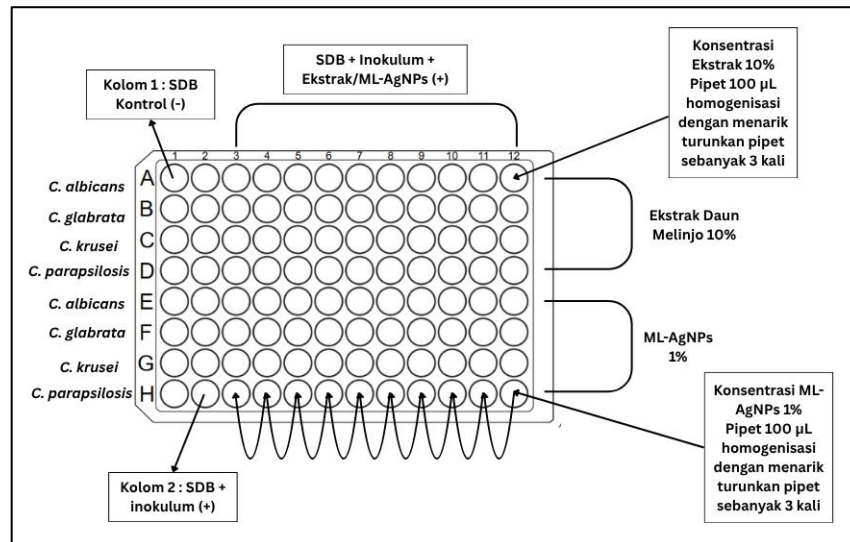
- Srikandi. (2012b). Uji Cemaran Bakteri dan Cendawan pada Keju Kasar (Cheddar). *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 2(1), 92–100.
- Supriyadi, & Rujita, A. S. (2013). Karakteristik Mikrokapsul Minyak Atsiri Lengkuas dengan Maltodekstrin sebagai Enkapsulan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 24(2), 201–208. <https://doi.org/10.6066/jtip.2013.24.2.201>
- Taba, P., Parmitha, N. Y., & Kasim, S. (2019). Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) sebagai Bioreduktor dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan. *J. Chem. Res*, 7(1), 51–60.
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2008). Effects of Water Activity (a_w) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation. Dalam *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications* (hlm. 239–271). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.ch10>
- TKPI. (2020). Tabel Komposisi Pangan Indonesia (1 ed.). Kementerian Kesehatan.
- Trisha, M. R., Deavyndra Gunawan, V., Wong, J. X., Pak Dek, M. S., & Rukayadi, Y. (2024). Antibacterial Effect of Ethanolic *Gnetum gnemon* L. Leaf Extract on Food-borne Pathogens and its Application as a Natural Preservative on Raw Quail Eggs. *Heliyon*, 10(16). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35691>
- Trofa, D., Gácsér, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Dalam *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Nomor 4, hlm. 606–625). <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
- Uçak, Ş. C., & Şatana, D. (2021). *Candida glabrata*: Laboratuvar Tanısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri, Epidemiyolojisi, Virulans Faktörleri ve Klinik Hastalıkları. *Istanbul University Institute of Health Sciences Journal of Advanced Research in Health Sciences*, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.26650/jarhs2021-795999>

- Wazir, D., Ahmad, S., Muse, R., Mahmood, M., & Shukor, M. Y. (2011). Antioxidant Activities of Different Parts of *Gnetum gnemon* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(2), 234–240. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0051-8>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Yıbar, A., Altaki, A., Akay, Ç. P., & Sığ, A. K. (2024a). Investigation of Mold and Yeast Contaminations in Cheese Samples. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 43(2), 113–119. <https://doi.org/10.30782/jrv.m.1513569>
- Yıbar, A., Altaki, A., Akay, Ç. P., & Sığ, A. K. (2024b). Investigation of Mold and Yeast Contaminations in Cheese Samples. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 43(2), 113–119. <https://doi.org/10.30782/jrv.m.1513569>



LAMPIRAN

Lampiran A. Layout 96 Well Plate



96 well plate untuk penentuan MIC dan MFC ekstrak daun melinjo 10% terhadap *Candida*; kolom 1: kontrol negatif (A, B, C, D), kolom 2: kontrol positif (A, B, C, D), kolom 3: 0,09 mg/mL (A, B, C, D), kolom 4: 0,20 mg/mL (A, B, C, D), kolom 5: 0,39 mg/mL (A, B, C, D), kolom 6: 0,78 mg/mL (A, B, C, D), kolom 7: 1,56 mg/mL (A, B, C, D), kolom 8: 3,13 mg/mL (A, B, C, D), kolom 9: 6,25 mg/mL (A, B, C, D), kolom 10: 12,50 mg/mL (A, B, C, D), kolom 11: 25,00 mg/mL (A, B, C, D) dan kolom 12: 50,00 mg/mL (A, B, C, D) ekstrak daun melinjo dengan SDB dan inokulum. Sedangkan untuk penentuan MIC dan MFC ML-AgNPs 1% terhadap *Candida*; kolom 1: kontrol negatif (E, F, G, H), kolom 2: kontrol positif (E, F, G, H), kolom 3: 0,001 mg/mL (E, F, G, H), kolom 4: 0,02 mg/mL (E, F, G, H), kolom 5: 0,04 mg/mL (E, F, G, H), kolom 6: 0,08 mg/mL (E, F, G, H), kolom 7: 0,16 mg/mL (E, F, G, H), kolom 8: 0,31 mg/mL (E, F, G, H), kolom 9: 0,63 mg/mL (E, F, G, H), kolom 10: 1,25 mg/mL (E, F, G, H), kolom 11: 2,50 mg/mL (E, F, G, H) dan kolom 12: 5,00 mg/mL (E, F, G, H) ML-AgNPs dengan SDB dan inokulum.

Lampiran B. Two-way ANOVA: Inhibition Zone versus Candida strands, Concentration

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Candida	3	6,7083	2,23611	3,11	0,056
Konsentrasi	1	0,6667	0,66667	0,93	0,350
Candida*Konsentrasi	3	0,0833	0,02778	0,04	0,989
Error	16	11,5000	0,71875		
Total	23	18,9583			

Tukey Pairwise Comparisons: Candida

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

CANDIDAN	N	Mean	Grouping
CA	6	7,83333	a
CK	6	7,58333	a
CP	6	6,91667	a
CG	6	6,50000	a

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi	N	Mean	Grouping
10	12	7,37500	a
1	12	7,04167	a

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Candida*Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Candida*Konsentrasi	N	Mean	Grouping
10 CA	3	8,00000	a
10 CK	3	7,83333	a
1 CA	3	7,66667	a
1 CK	3	7,33333	a
10 CP	3	7,00000	a
1 CP	3	6,83333	a
10 CG	3	6,66667	a
1 CG	3	6,33333	a

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran C. *Analysis of Variance* (Aplikasi)

Jumlah mikroba TFC yang terdapat pada keju setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak Daun melinjo dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Konsentrasi	2	204,518	102,259	3024,17	0,000
Hari	5	79,238	15,848	468,67	0,000
Konsentrasi*Hari	10	207,314	20,731	613,10	0,000
Error	18	0,609	0,034		
Total	35	491,678			

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi N Mean Grouping

0,0	12	9,36167	a
0,1	12	4,85917	b
1,0	12	3,89167	c

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hari N Mean Grouping

4	6	7,49500	a
1	6	7,38833	a
3	6	6,94667	b
0	6	6,39500	c
8	6	4,00000	d
10	6	4,00000	d

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi*Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi*Hari N Mean Grouping

0,0	8	2	12,000	a
0,0	10	2	12,000	a
0,0	4	2	9,190	b

0,0 1	2	8,745	b	
0,0 3	2	7,840	c	
0,1 4	2	7,710	c	
0,1 1	2	7,665	c	
0,1 3	2	7,385	c	
1,0 0	2	6,395		d
0,0 0	2	6,395		d
0,1 0	2	6,395		d
1,0 1	2	5,755		d e
1,0 3	2	5,615		e
1,0 4	2	5,585		e
1,0 8	2	0,000		f
0,1 8	2	0,000		f
0,1 10	2	-0,000		f
1,0 10	2	-0,000		f

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Jumlah mikroba TFC yang terdapat pada keju setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25,00 \pm 2,00^\circ\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Konsentrasi	2	123,251	61,6257	1932,34	0,000
Hari	5	23,724	4,7448	148,78	0,000
Konsentrasi*Hari	10	172,756	17,2756	541,70	0,000
Error	18	0,574	0,0319		
Total	35	320,305			

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,36167	a
0,01	12	7,19667	b
0,10	12	4,83083	c

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

<u>Hari</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Grouping</u>
4	6	8,27000	a
1	6	8,06333	a
3	6	7,33333	b
8	6	6,43167	c
0	6	6,39500	c
10	6	6,28500	c

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

<u>Konsentrasi*Hari</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Grouping</u>
0,00	8	2 12,000	a
0,00	10	2 12,000	a
0,00	4	2 9,190	b
0,00	1	2 8,745	b
0,10	4	2 7,890	c
0,01	1	2 7,850	c
0,00	3	2 7,840	c
0,01	4	2 7,730	c d
0,10	1	2 7,595	c d
0,01	8	2 7,295	c d e
0,10	3	2 7,105	d e f
0,01	3	2 7,055	d e f
0,01	10	2 6,855	e f
0,01	0	2 6,395	f
0,10	0	2 6,395	f
0,00	0	2 6,395	f
0,10	8	2 -0,000	g
0,10	10	2 -0,000	g

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Jumlah mikroba TFC yang terdapat pada keju setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak Daun melinjo dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Dingin ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Konsentrasi	2	191,005	95,5025	3292,56	0,000
Hari	5	183,511	36,7022	1265,35	0,000
Konsentrasi*Hari	10	123,075	12,3075	424,31	0,000
Error	18	0,522	0,0290		
Total	35	498,113			

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi N Mean Grouping

0,0	12	7,11917	a
1,0	12	2,24083	b
0,1	12	2,22500	b

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hari N Mean Grouping

1	6	7,28500	a
0	6	6,39500	b
10	6	4,00000	c
4	6	1,95167	d
3	6	1,87833	d
8	6	1,66000	d

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi*Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi*Hari N Mean Grouping

0,0 10	2	12,000	a
0,0 1	2	7,850	b
1,0 1	2	7,050	c
0,1 1	2	6,955	c
0,0 0	2	6,395	c d
1,0 0	2	6,395	c d
0,1 0	2	6,395	c d

0,0 4	2	5,855	d e
0,0 3	2	5,635	e f
0,0 8	2	4,980	f
1,0 8	2	0,000	g
0,1 8	2	0,000	g
0,1 10	2	-0,000	g
1,0 10	2	-0,000	g
0,1 3	2	-0,000	g
1,0 3	2	-0,000	g
0,1 4	2	-0,000	g
1,0 4	2	-0,000	g

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different

Jumlah mikroba TFC yang terdapat pada keju setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Dingin ($4,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Konsentrasi	2	56,248	28,1238	1261,47	0,000
Hari	5	68,546	13,7091	614,91	0,000
Konsentrasi*Hari	10	176,954	17,6954	793,71	0,000
Error	18	0,401	0,0223		
Total	35	302,149			

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi	N	Mean	Grouping
0,00	12	7,11917	a
0,10	12	5,32583	b
0,01	12	4,07333	c

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Hari

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hari	N	Mean	Grouping
1	6	7,33500	a
0	6	6,39500	b
4	6	6,24500	b
3	6	5,66500	c
10	6	4,00000	d

8 6 3,39667 e

Notes:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Konsentrasi*Hari	N	Mean	Grouping
0,00	10	2 12,000	a
0,00	1	2 7,850	b
0,10	4	2 7,585	b c
0,10	1	2 7,150	c
0,01	1	2 7,005	c
0,01	0	2 6,395	d
0,10	0	2 6,395	d
0,00	0	2 6,395	d
0,00	4	2 5,855	d e
0,01	3	2 5,745	e f
0,00	3	2 5,635	e f
0,10	3	2 5,615	e f
0,01	4	2 5,295	e f g
0,10	8	2 5,210	f g
0,00	8	2 4,980	g
0,01	8	2 0,000	h
0,01	10	2 0,000	h
0,10	10	2 0,000	h

Notes:

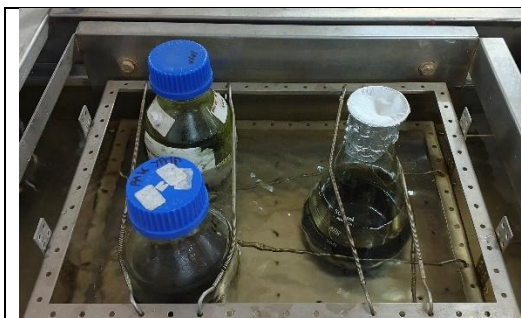
Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran D. Dokumentasi Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo



Keterangan:

- 1: Hasil analisis warna menggunakan chroma meter
- 2: Hasil penentuan kadar air menggunakan *moisture analyzer*
- 3: Hasil penentuan pH menggunakan pH meter
- 4: Hasil penentuan a_w menggunakan a_w meter

Lampiran E. Dokumentasi Proses Pembuatan Ekstrak Daun Melinjo

(1)



(2)



(3)



(4)

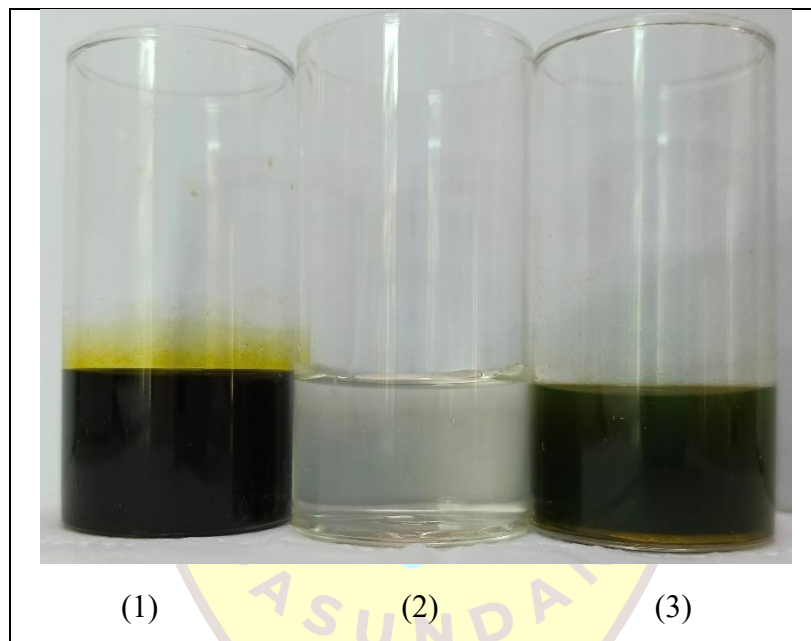


(5)

Keterangan:

- 1: Proses ekstraksi (maserasi) menggunakan *waterbath shaker*
- 2: Suhu dan kecepatan yang digunakan pada *waterbath shaker*
- 3: Proses penyaringan vakum ekstrak
- 4: Proses pemekatan ekstrak menggunakan *rotary vacuum evaporator*
- 5: Hasil ekstrak kasar daun melinjo

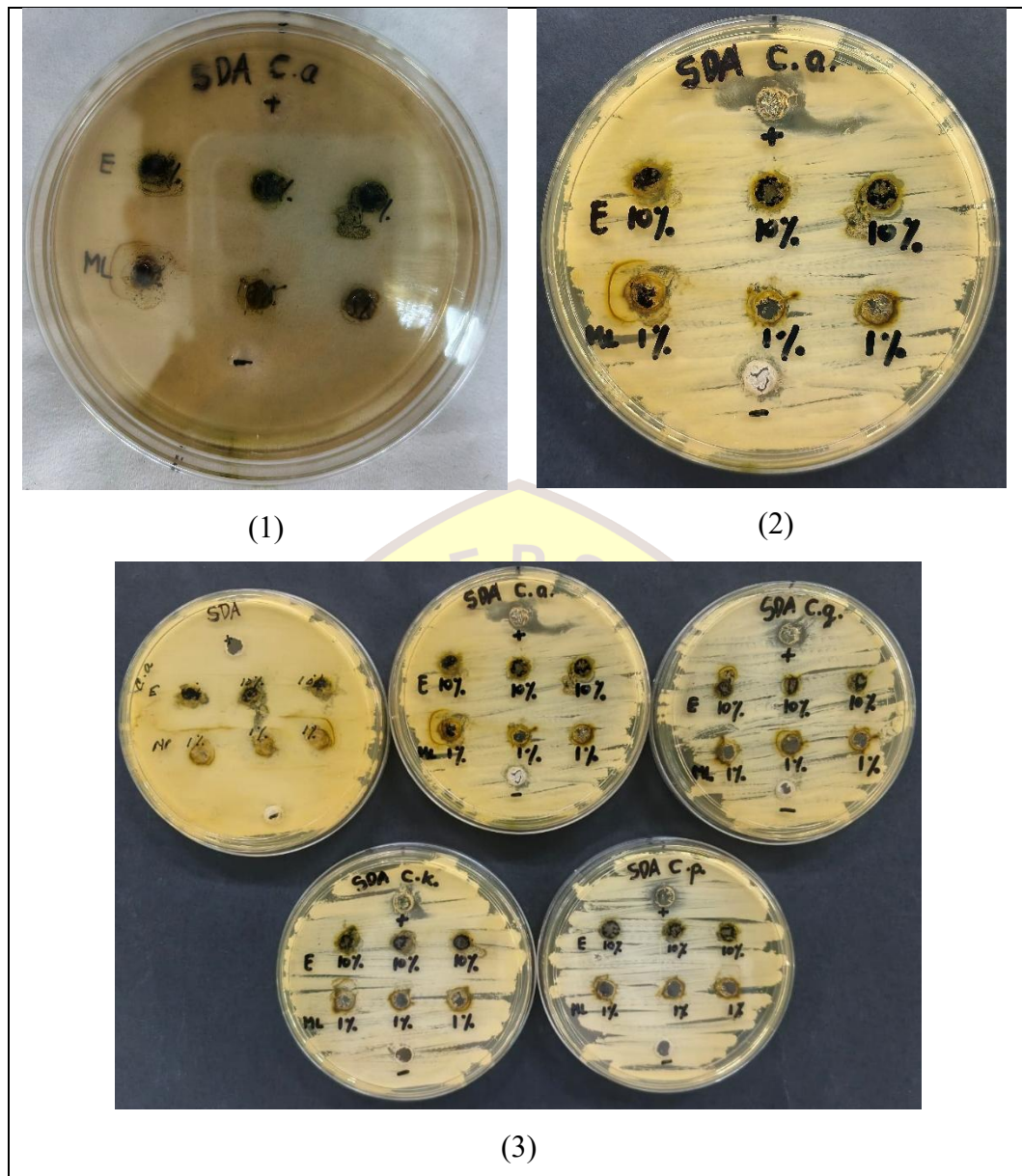
Lampiran F. Dokumentasi Proses Pembuatan ML-AgNPs



Keterangan:

- 1: Ekstrak daun melinjo 10%
- 2: DMSO 10%
- 3: ML-AgNPs 1%

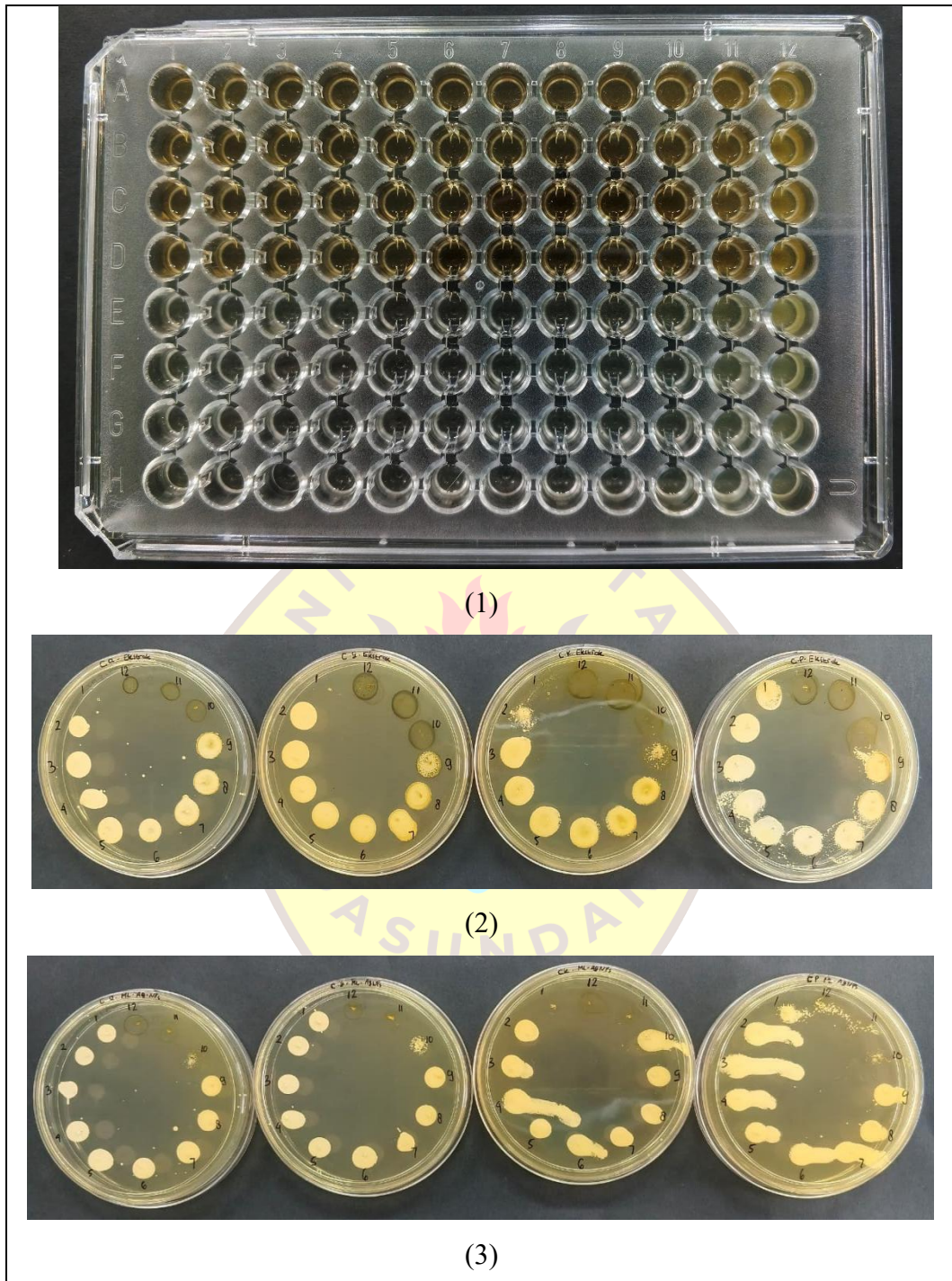
Lampiran G. Dokumentasi Hasil Uji WDA



Keterangan:

- 1: Proses WDA pada *Candida albicans* sebelum inkubasi
- 2: Hasil WDA pada *Candida albicans* setelah inkubasi
- 3: Hasil WDA pada kontrol dan masing-masing *Candida* setelah inkubasi

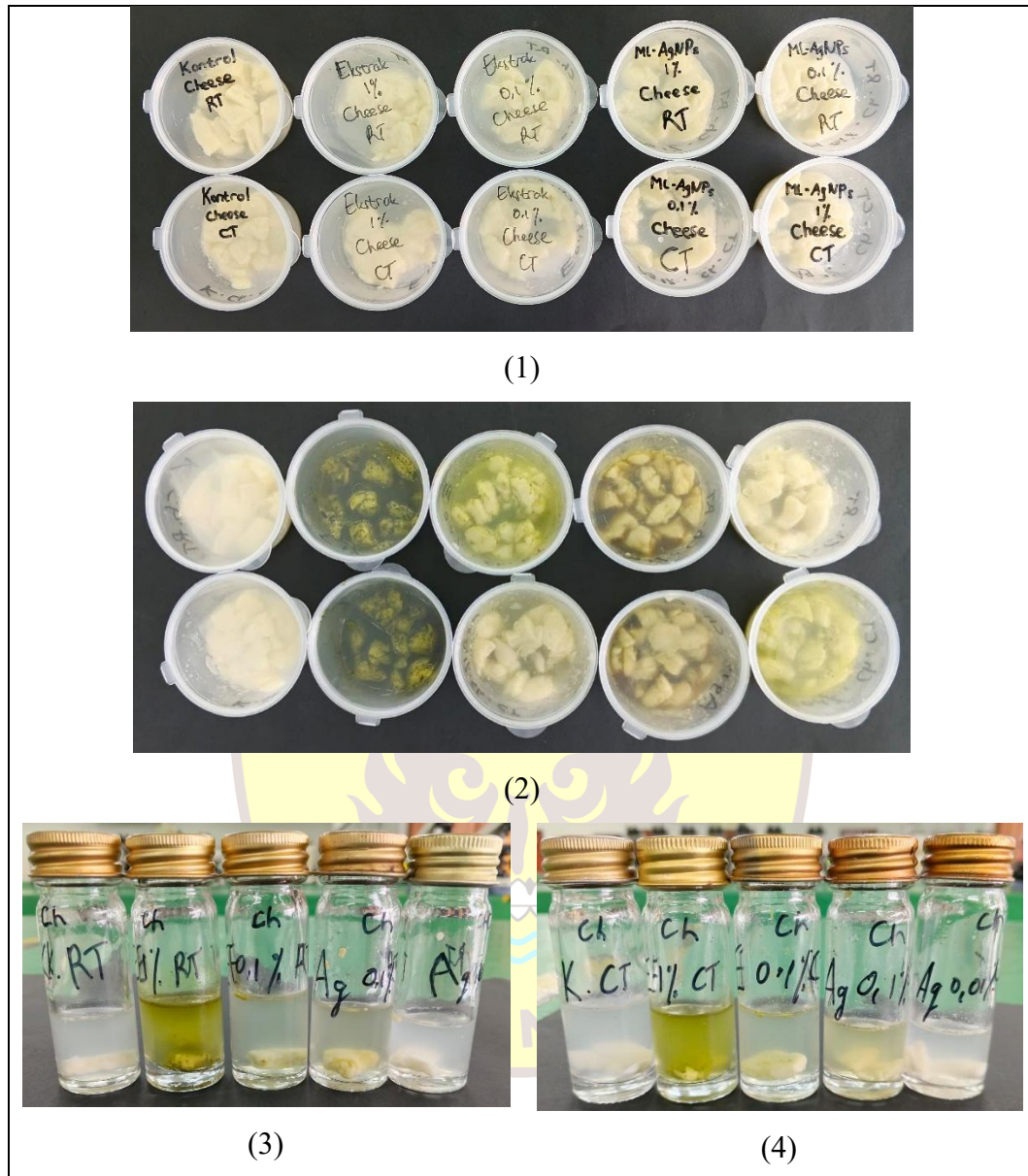
Lampiran H. Dokumentasi Hasil Uji MIC dan MFC



Keterangan:

- 1: Hasil 96-well plate setelah inkubasi
- 2: Hasil MIC dan MFC pada penggunaan ekstrak 10%
- 3: Hasil MIC dan MFC pada penggunaan ML-AgNPs 1%

Lampiran I. Dokumentasi Aplikasi pada Keju

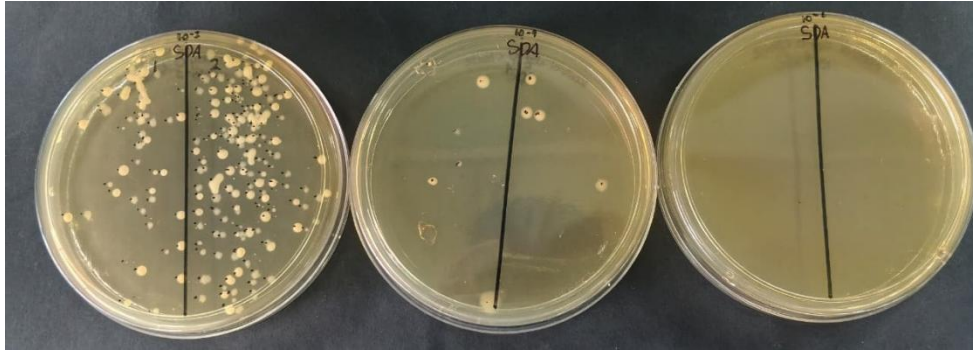


Keterangan:

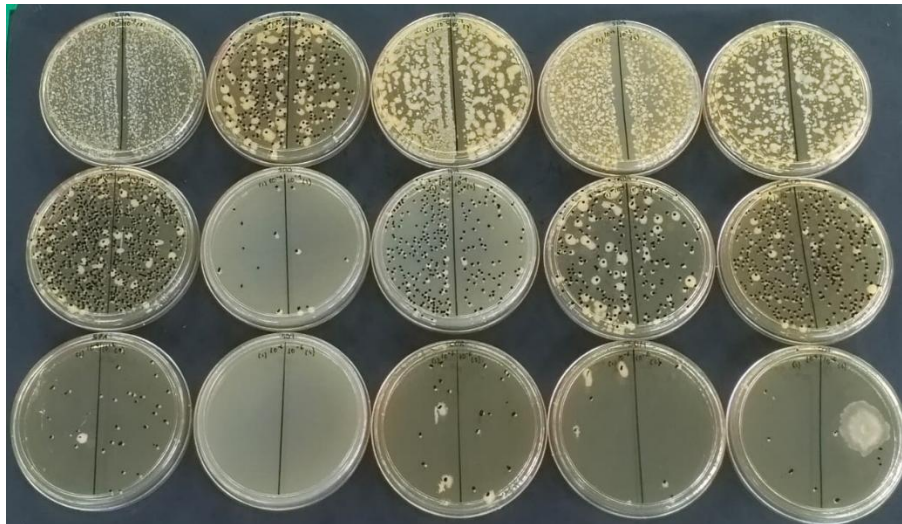
- 1: Proses pewadahan keju untuk masing-masing perlakuan
- 2: Masing-masing keju sudah diberi perlakuan (kontrol, ekstrak, dan ML-AgNPs)
- 3: Hasil penyimpanan keju masing-masing perlakuan pada suhu ruang
- 4: Hasil penyimpanan keju masing-masing perlakuan pada suhu dingin

Lampiran J. Dokumentasi Perhitungan TFC

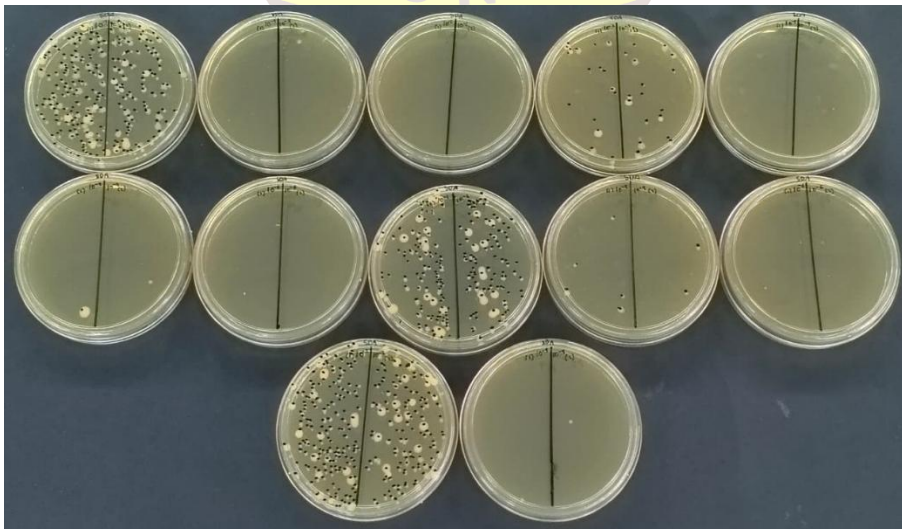
Hari ke-0



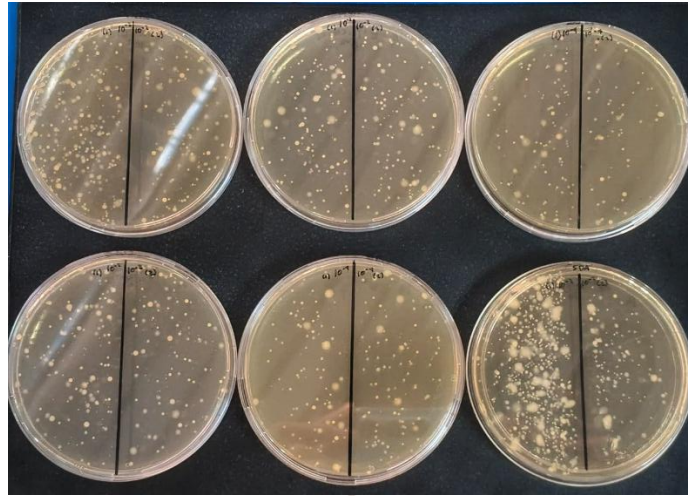
Hari ke-1



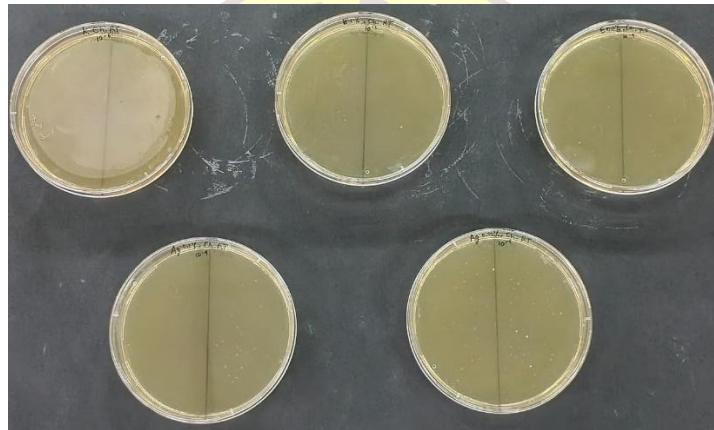
Hari ke-3



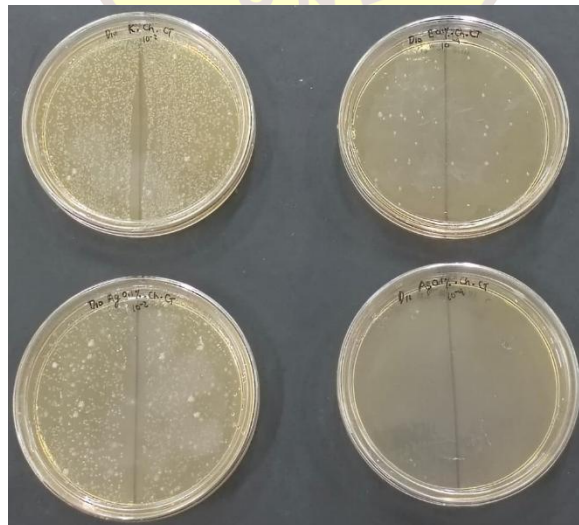
Hari ke-4



Hari ke-8



Hari ke-10



Perhitungan koloni menggunakan *colony counter*

