

**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* DARI SINTESIS HIJAU
NANOPARTIKEL PERAK YANG DIMEDIASI EKSTRAK
DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN PENGARUHNYA
TERHADAP POPULASI MIKROBA PADA TAHU**

TUGAS AKHIR

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

**Oleh
DZAKIRAH ASMA NURULLAH
NPM: 223020057**



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

**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* DARI SINTESIS HIJAU
NANOPARTIKEL PERAK YANG DIMEDIASI EKSTRAK
DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN PENGARUHNYA
TERHADAP POPULASI MIKROBA PADA TAHU**

Oleh

**Nama: Dzakirah Asma Nurullah
NPM: 223020057
(Program Studi Teknologi Pangan)**

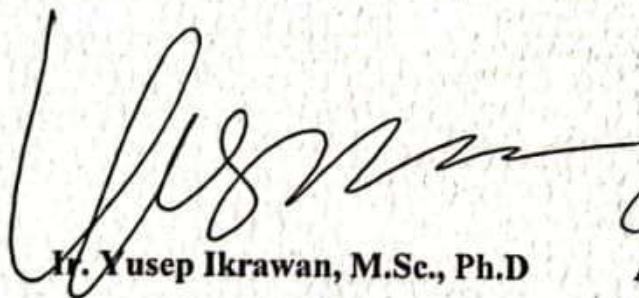
Fakultas Teknik
Universitas Pasundan

Menyetujui
Tim Pembimbing

Tanggal : 1 Mei 2026

Pembimbing I

Pembimbing II



Ir. Yusep Ikrawan, M.Sc., Ph.D



Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi

**AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* DARI SINTESIS HIJAU NANOPARTIKEL
PERAK YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN MELINJO (*Gnetum
gnemon* L.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP POPULASI MIKROBA
PADA TAHU**

LEMBAR PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

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

Oleh
DZAKIRAH ASMA NURULLAH
NPM: 223020057

Menyetujui :

Koordinator Tugas Akhir



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

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTI-*Bacillus* DARI SINTESIS HIJAU NANOPARTIKEL PERAK YANG DIMEDIASI EKSTRAK DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN PENGARUHNYA TERHADAP POPULASI MIKROBA PADA TAHU

Oleh
Dzakirah Asma Nurullah
NPM: 223020057
(Program Studi Teknologi Pangan)

Tahu merupakan produk pangan dengan kadar air tinggi yang rentan terhadap kontaminasi mikroba sehingga menimbulkan isu keamanan pangan. Penggunaan pengawet sintesis dalam jangka panjang berpotensi menimbulkan risiko kesehatan, sehingga diperlukan alternatif pengawet alami, salah satunya ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Namun, efektivitas antibakteri ekstrak tanaman relatif terbatas sehingga perlu ditingkatkan melalui teknologi nanopartikel. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi fisikokimia dan mengekstrak bubuk daun melinjo, mensintesis nanopartikel perak menggunakan ekstrak daun melinjo, menguji aktivitas antibakteri, serta mengevaluasi pengaruh penambahan ekstrak daun melinjo dan Melinjo Leaf Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) terhadap populasi mikroba pada tahu selama penyimpanan. Daun melinjo segar dikeringkan dan dihaluskan menjadi bubuk, kemudian dianalisis karakteristik fisikokimia meliputi warna, kadar air, pH, dan aktivitas air (a_w). Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol absolut 99,5% (1:4 b/v). Sintesis nanopartikel dilakukan dengan mencampurkan 5 mL ekstrak daun melinjo 10% dengan 45 mL larutan $AgNO_3$ 1 mM. Aktivitas antibakteri ekstrak dan ML-AgNPs ditentukan menggunakan metode *Well Diffusion Assay* (WDA), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) terhadap *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, dan *B. megaterium*. Pengaruh penambahan ekstrak daun melinjo (0,10% dan 1,00%) serta ML-AgNPs (0,01% dan 0,10%) terhadap populasi mikroba pada tahu dievaluasi pada suhu ruang ($25 \pm 2^\circ C$) dan suhu dingin ($4 \pm 2^\circ C$) selama 10 hari penyimpanan. Hasil analisis fisikokimia bubuk daun melinjo menunjukkan nilai warna $L^* 41,390 \pm 0,940$, $a^* -3,390 \pm 0,010$, dan $b^* 10,020 \pm 0,660$, kadar air $7,720 \pm 0,320\%$, pH $5,940 \pm 0,010$, serta $a_w 0,580 \pm 0,002$. Rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 8,82%. Aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak daun melinjo 10% menghasilkan zona hambat sebesar $6,83 \pm 0,28$ – $12,67 \pm 2,56$ mm, sedangkan ML-AgNPs 1% sebesar $11,83 \pm 0,57$ – $12,83 \pm 4,04$ mm. Pertumbuhan *Bacillus spp.* dapat dihambat dengan nilai MIC berkisar 0,157–1,570 mg/mL dan dibunuh dengan nilai MBC antara $>5,00$ hingga $>50,00$ mg/mL. Pada aplikasi pangan, kedua perlakuan mampu menghambat pertumbuhan mikroba pada tahu selama penyimpanan 10 hari, baik pada suhu ruang maupun suhu pendinginan. ML-AgNPs 0,10% menunjukkan efektivitas

penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak. Secara keseluruhan, ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs berpotensi sebagai pengawet alami untuk memperpanjang umur simpan tahu, dengan peningkatan efektivitas pada formulasi nanopartikel.

Kata kunci: Aktivitas antibakteri, melinjo (*Gnetum gnemon* L.), ML-AgNPs, nanopartikel, tahu.

SDG : 3 - Kehidupan Sehat dan Kesejahtera

SDG : 12 - Konsumsi dan Produksi yang Bertanggung Jawab



ABSTRACT

ANTI-Bacillus ACTIVITY OF GREEN SYNTHESIS OF MELINJO (Gnetum gnemon L.) LEAF EXTRACT-MEDIATED SILVER NANOPARTICLES (ML-AgNPs) AND ITS EFFECT ON MICROBIAL POPULATION IN TOFU

By

Dzakirah Asma Nurullah

NIM: 223020057

(Department of Food Technology)

*Tofu is a high-moisture food product that is highly susceptible to microbial contamination, leading to food safety concerns. The long-term use of synthetic preservatives may pose health risks; therefore, natural alternatives such as melinjo leaf (Gnetum gnemon L.) extract are increasingly explored. However, the antibacterial effectiveness of plant extracts is relatively limited and needs to be enhanced through nanoparticle technology. This study aimed to characterize the physicochemical properties and extract melinjo leaf powder, synthesize silver nanoparticles using melinjo leaf extract, evaluate antibacterial activity, and assess the effect of melinjo leaf extract and Melinjo Leaf Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) on microbial populations in tofu during storage. Fresh melinjo leaves were dried and ground into powder, followed by physicochemical analysis including color, moisture content, pH, and water activity (a_w). Extraction was carried out using maceration with 99.5% ethanol (1:4 b/v). Silver nanoparticles were synthesized by mixing 5 mL of 10% melinjo leaf extract with 45 mL of 1 mM $AgNO_3$ solution. Antibacterial activity of the extract and ML-AgNPs was evaluated using the well diffusion assay (WDA), minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus megaterium*. The effect of melinjo leaf extract (0.10% and 1.00%) and ML-AgNPs (0.01% and 0.10%) on microbial populations in tofu was evaluated under different storage conditions (room temperature, $25 \pm 2^\circ C$; and chilling temperature, $4 \pm 2^\circ C$) for 10 days. The physicochemical analysis of melinjo leaf powder showed $L^* 41.390 \pm 0.940$, $a^* -3.390 \pm 0.010$, and $b^* 10.020 \pm 0.660$, with moisture content of $7.720 \pm 0.320\%$, pH 5.940 ± 0.010 , and a_w of 0.580 ± 0.002 . The extraction yield was 8.82%. Antibacterial activity showed that 10% melinjo leaf extract produced inhibition zones of 6.83 ± 0.28 – 12.67 ± 2.56 mm, while 1% ML-AgNPs showed inhibition zones of 11.83 ± 0.57 – 12.83 ± 4.04 mm. The growth of *Bacillus* spp. was inhibited at MIC values ranging from 0.157–1.570 mg/mL and was bactericidal at MBC values ranging from >5.00 to >50.00 mg/mL. In the application study, both treatments were able to inhibit microbial growth in tofu during 10 days of storage at both room and chilling temperatures.*

ML-AgNPs (0.10%) showed higher antibacterial effectiveness compared to the extract. Overall, melinjo leaf extract and ML-AgNPs demonstrate potential as natural preservatives to extend the shelf life of tofu, with enhanced effectiveness observed in the nanoparticle formulation.

Keywords: *Antibacterial activity, melinjo (Gnetum gnemon L.), ML-AgNPs, nanoparticles, tofu.*

SDG : 3 - Good Health and Well-Being

SDG : 12 - Responsible Consumption and Production



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 penulisan 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 di tulis dalam Bahasa Indonesia sebagai berikut :

Nurullah, D. A. (2026) : *Aktivitas Anti-Bacillus dari Sintesis Hijau Nanopartikel Perak yang Dimediasi Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) dan Pengaruhnya terhadap Populasi Mikroba pada Tahu*, Tugas Akhir Program Sarjana, Universitas Pasundan.

dan dalam Bahasa Inggris sebagai berikut :

Nurullah, D. A. (2026) : *Anti-Bacillus Activity Of Green Synthesis Of Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Leaf Extract-Mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) And Its Effect On Microbial Population In Tofu*, 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 ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala atas limpahan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir dengan judul “**Aktivitas Anti-*Bacillus* dari Sintesis Hijau Nanopartikel Perak yang Dimediasi Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan Pengaruhnya terhadap Populasi Mikroba pada Tahu**” sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pasundan Bandung.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyusunan tugas akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ir. Yusep Ikrawan, M.Sc., Ph.D sebagai Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan arahan dalam proses penyusunan tugas akhir ini.
2. Assoc. Prof Yaya Rukayadi sebagai Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan arahan dalam proses penyusunan tugas akhir ini.
3. Dr. Yellianty, S.Si., M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang membangun dalam penyusunan tugas akhir ini.
4. Jaka Rukmana S.T., M.T. selaku Ketua Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.
5. Rizal Maulana Ghaffar, S.T., M.T. selaku Koordinator Tugas Akhir Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.
6. Kedua orang tua tercinta Riadi Darwis dan Pupah Komariah, serta Kakak Wisam Rizqullah yang selalu memberi doa serta dukungan secara moral, dan menjadi semangat utama bagi penulis.
7. Kepada diri saya sendiri, Dzakhirah Asma Nurullah yang telah berusaha dengan penuh kesabaran dan ketekunan dalam menyelesaikan seluruh

rangkaian penelitian ini. Terima kasih atas komitmen untuk terus bertahan, berproses, dan menyelesaikan tugas akhir ini hingga tahap akhir.

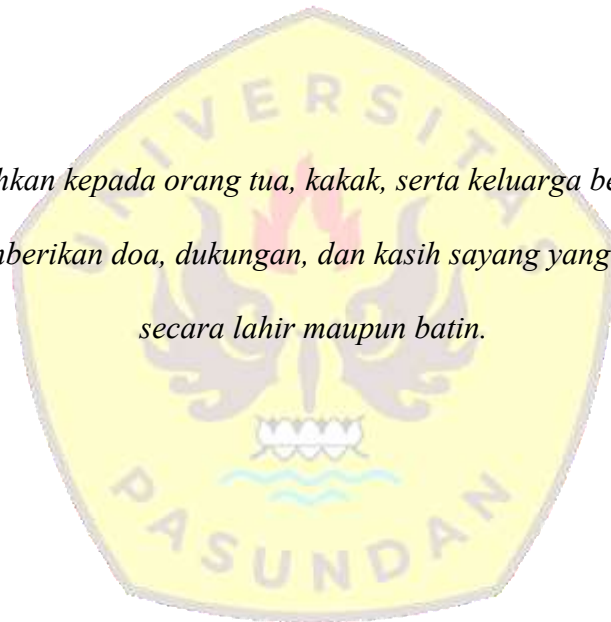
8. Kepada Ibu Shanty dan dr. Hasrini, yang telah memberikan dukungan, perhatian, serta motivasi kepada penulis selama proses penyusunan tugas akhir ini.
9. Kepada Maharani Siti Salsabila, Hasna Taqiyya Muthmainnah, Najwa Fadillah Al-Munawwar, teman-teman UGM Cantik, teman-teman semasa sekolah dan teman-teman halaqah Ustadzah Widia yang hingga saat ini masih mengusahakan untuk senantiasa menjalin komunikasi dan memberikan dukungan serta semangat yang tidak ada hentinya.
10. Kepada Citra Fiqih Rahmah, Charunnisa Ismail, Dena Alifia Az-Zahra, Bassam Shauqi Maskati, Fadlan Mohamad Gibran, Fakhriza Saukan As-Shidiqie, dan Jidan Al-Farizi sebagai teman dekat penulis yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, dan kehadiran yang berarti di setiap tahap perjalanan ini.
11. Kepada Irma Faustina Faizal, Dandy Tiara Putra, Leonardus Calvin Wicaksana, dan Azriel David Budiman sebagai teman seperjuangan selama proses riset di Universiti Putra Malaysia. Terimakasih atas dukungan, semangat, dan kebersamaan yang menjadi bagian penting dalam proses ini.
12. Muhammad Haikal Bin Zailan, Noor Hayatullah bin Noor Mazli, Kung Wan Yuen, Hoi Yuan Xin, Putri Batrisyia Bilqis, Mia Tasha, Elisya, Aisyah, dan Kak Novianti, yang sudah menjadi teman berjuang dan menerima kami dengan baik selama penelitian di Universiti Putra Malaysia.
13. Kepada seluruh pihak yang telah membantu penulisan tugas akhir ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap dengan selesainya tugas akhir ini dapat memberikan dampak positif khususnya bagi penulis, umumnya bagi semua pihak.

Bandung, 21 April 2026

Dzakirah Asma Nurullah

Dipersembahkan kepada orang tua, kakak, serta keluarga besar tercinta yang senantiasanya memberikan doa, dukungan, dan kasih sayang yang tiada henti, baik secara lahir maupun batin.



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	ii
<i>ABSTRACT</i>	v
PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	20
1.1. Latar Belakang	20
1.2. Identifikasi Masalah	23
1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian.....	23
1.4. Manfaat Penelitian	24
1.5. Kerangka Penelitian	24
1.6. Hipotesis Penelitian.....	26
1.7. Waktu dan Tempat Penelitian	27
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	28
2.1. Tahu	28
2.2. Kontaminasi pada Tahu.....	29
2.3. <i>Bacillus spp.</i>	30
2.3.1. <i>B. cereus</i>	31
2.3.2. <i>B. subtilis</i>	32
2.3.3. <i>B. pumillus</i>	33
2.3.4. <i>B. megaterium</i>	34
2.4. Pengawet Pangan	35
2.4.1. Pengawet Sintetis	36
2.4.2. Pengawet Alami	36
2.5. Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	37
2.5.1. Morfologi Melinjo.....	37

2.5.2.	Taksonomi Melinjo	38
2.5.3.	Fitokimia Melinjo	39
2.5.4.	Bioaktivitas Melinjo.....	39
2.6.	Nanopartikel.....	40
2.6.1.	Nanopartikel Perak.....	40
2.6.2.	Nanopartikel perak hasil sintesis hijau yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs).....	43
BAB III METODE PENELITIAN.....		48
3.1.	Bahan dan Alat.....	48
3.1.1.	Bahan	48
3.1.2.	Alat.....	49
3.2.	Metode Penelitian.....	50
3.2.1.	Rancangan Percobaan	50
3.2.2.	Respon Pengujian.....	50
3.2.3.	Analisis Data	51
3.3.	Prosedur Penelitian	53
3.3.1.	Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo	53
3.3.2.	Ekstraksi Daun Melinjo.....	57
3.3.3.	Sintesis Hijau Nanopartikel Perak (ML-AgNPs).....	59
3.3.4.	Prosedur <i>Well Diffusion Assay</i> (WDA).....	61
3.3.5.	Prosedur <i>Minimum Inhibitory Concetration</i> (MIC).....	63
3.3.6.	Prosedur <i>Minimum Bactericidal Concetration</i> (MBC).....	65
3.3.7.	Prosedur Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu	66
3.4.	Jadwal Penelitian.....	68
BAB IV PEMBAHASAN.....		69
4.1.	Penelitian Tahap I “Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo dan Hasil Ekstrak Daun Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)”.....	69
4.1.1.	Analisis fisikokimia bubuk daun Melinjo (<i>G. gnemon</i> L.)	69
4.1.2.	Ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.).....	72
4.2.	Penelitian Tahap II “Aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) dan ML-AgNPs”	74
4.2.1.	Sintesis ML-AgNPs	74
4.2.2.	<i>Well Diffusion Assay</i> (WDA).....	76

4.2.3. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) dan <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	80
4.3. Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Bubuk Daun Melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) dan ML-AgNPs terhadap Tahu Selama Penyimpanan”	84
4.3.1. Pengaruh ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)..	85
4.3.2. Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)	88
4.3.3. Pengaruh ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)	91
4.3.4. Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)	94
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	97
5.1. SIMPULAN	97
5.2. SARAN	98
DAFTAR PUSTAKA	99
LAMPIRAN	108



DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar 1. Tahu.....	29
Gambar 2. <i>B. cereus</i>	32
Gambar 3. <i>B. subtilis</i>	33
Gambar 4. <i>B. pumilus</i>	34
Gambar 5. <i>B. megaterium</i>	35
Gambar 6. Tanaman Melinjo	38
Gambar 7. Daun Melinjo	38
Gambar 8. Metode Sintesis Nanopartikel	41
Gambar 9. Mekanisme Kerja Nanopartikel	42
Gambar 10. Spektrum UV-Vis ML-AgNPs.....	44
Gambar 11. Spektrum FTIR ML-AgNPs.....	45
Gambar 12. Hasil TEM dari ML-AgNPs pada perbesaran (a) 100 nm dan (b) 50 nm	46
Gambar 13. Daun Melinjo Tua (<i>G. gnetum</i> L.).....	48
Gambar 14. Diagram Alir Prosedur Penentuan Kadar Air	53
Gambar 15. Diagram Alir Prosedur Penentuan Aktivitas Air.....	54
Gambar 16. Diagram Alir Prosedur Penentuan Nilai pH.....	55
Gambar 17. Diagram Alir Prosedur Pengukuran Warna	56
Gambar 18. Diagram Alir Ekstraksi Daun Melinjo	58
Gambar 19. Diagram Alir Prosedur Pembuatan Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Daun Melinjo	60
Gambar 20. Diagram Alir <i>Well Diffusion Assay</i> (WDA).....	62
Gambar 21. Diagram Alir <i>Metode Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)....	64
Gambar 22. Diagram Alir <i>Metode Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC). 65	
Gambar 23. Aplikasi Ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu	67
Gambar 24. Bubuk Daun Melinjo	71
Gambar 25. Ekstrak Daun Melinjo	73
Gambar 26. Bahan sintesis ML-AgNPs, Ekstrak daun melinjo 10% (a), AgNO ₃ 1 mM (b), dan ML-AgNPs 1% (c)	75
Gambar 27. Zona hambat kontrol positif (CHX), kontrol negatif (DMSO), ekstrak daun melinjo 10%, dan ML-AgNPs 1%; <i>Bacillus subtilis</i> (a), <i>Bacillus cereus</i> (b).	77
Gambar 28. Hasil uji MIC dan MBC; <i>Bacillus subtilis</i> (a), <i>Bacillus pumilus</i> (b) 81	
Gambar 29. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang (25 ± 2,0°C).....	87

Gambar 30. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).....	90
Gambar 31. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).....	93
Gambar 32. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Dingin ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)	96



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Taksonomi Tanaman Melinjo	39
Tabel 2. Strain Bakteri Uji	49
Tabel 3. Jadwal Penelitian	68
Tabel 4. Karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.).....	70
Tabel 5. Hasil ekstrak daun melinjo.....	73
Tabel 6. Zona penghambatan ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.) dan ML-AgNPs terhadap bakteri genus <i>Bacillus</i>	76
Tabel 7. MIC dan MBC ekstrak daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.), ML-AgNPs, dan CHX terhadap bakteri genus <i>Bacillus</i>	80



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Layout 96 Well plate	108
Lampiran 2. Two-way ANOVA : Inhibition Zone versus Bacteria strands, Concentration	109
Lampiran 3. Analisis of varians (Aplikasi Ekstrak dan ML-AgNPs)	111
Lampiran 4. Dokumentasi Analisis Fisikokimia.....	119
Lampiran 5. Dokumentasi Pembuatan Ekstrak Daun Melinjo.....	120
Lampiran 6. Dokumentasi Pembuatan ML-AgNPs Dengan Ekstrak Daun Melinjo	121
Lampiran 7. Dokumentasi Hasil Uji WDA.....	122
Lampiran 8. Dokumentasi Hasil Uji MIC Dan MBC	122
Lampiran 9. Dokumentasi Aplikasi Ekstrak	123
Lampiran 10. Dokumentasi TPC pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).....	127
Lampiran 11. Dokumentasi TPC pada Suhu Pendinginan ($\pm 2,0^{\circ}\text{C}$).....	134
Lampiran 12. Persetujuan Proyek Penelitian	139



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	Nama	Pemakaian pertama kali pada halaman
ALT	Angka Lempeng Total	86
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	52
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	50
aw	Aktivitas air	21
AgNPs	Sintesis Nanopartikel Perak	22
BPOM	Badan Pengawasan Obat dan Makanan	21
BTP	Bahan Tambahan Pangan	34
BSLA	<i>Brine Shrimp Lethality Assay</i>	47
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>	31
CHX	<i>Chlorhexidine</i>	48
CytK	<i>Cytotoxin K</i>	32
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	26
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	44
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>	34
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida	34
Hbl	<i>Hemolysin BL</i>	32
KLB KP	Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan	21
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>	50
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>	48
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>	48
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	48
MLE	<i>Melinjo Leaf Extract</i>	75
ML-AgNPs	<i>Melinjo Leaf Silver Nanoparticles</i>	24
NA	<i>No Active</i>	75
Nhe	<i>Non-hemolytic enterotoxin</i>	32
PCA	<i>Plate Count Agar</i>	49
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	26
SD	<i>Standard Deviation</i>	51
SNI	Standar Nasional Indonesia	29
SPR	Surface Plasmon Resonance	44
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	44
TNTC	<i>Too Numerous To Count</i>	85
TPC	<i>Total Plate Count</i>	50
UV	<i>Ultraviolet</i>	34

WDA	<i>Well Diffusion Assay</i>	50
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>	28
LAMBANG		
±	<i>Standard Deviation</i>	52
μL	Mikroliter	49
<i>a</i> *	Warna kemerahan/kehijauan	28
<i>b</i> *	Warna kekuningan/kebiruan	28
<i>L</i> *	Kecerahan	28
p	<i>probability value</i>	52



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.

1.1. Latar Belakang

Kontaminasi pangan oleh mikroba seperti bakteri dapat menyebabkan Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan (KLB KP) dengan gejala beragam hingga fatal. Karena itu, keamanan pangan menjadi aspek krusial dalam menjaga kesehatan masyarakat dan isu global yang terus mendapat perhatian. Pangan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen dapat menyebabkan penyakit yang dikenal sebagai *foodborne disease*, yaitu penyakit yang ditularkan melalui konsumsi makanan atau minuman yang tercemar (Apriliansyah et al., 2022). Salah satu genus bakteri yang paling sering ditemukan pada Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan (KLB KP) di Indonesia adalah *Bacillus spp.*, khususnya *B. cereus* (Apriliansyah et al., 2022). Menurut laporan tahunan Badan Pengawasan Pangan Obat dan Makanan BPOM terdapat data yang menunjukkan bahwa pada tahun 2020, *B. cereus* menjadi penyebab 26,67% kasus Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan (KLB KP) yang dilaporkan di Indonesia. Hal ini membuat *B. cereus* dapat bertahan dalam proses pengolahan pangan melalui pembentukan spora, yang kemudian dapat memproduksi toksin penyebab keracunan pangan (*foodborne intoxication*) pada manusia. Salah satu produk pangan yang sangat rentan terhadap kontaminasi bakteri ini adalah tahu. Dengan kandungan protein sekitar 8% dan aktivitas air (a_w) yang tinggi antara 0,89-0,99, tahu menjadi media yang sangat cocok untuk pertumbuhan mikroba. Meskipun proses pembuatan tahu melibatkan pemanasan, spora *B. cereus* dapat bertahan dan kembali aktif pasca-produksi. Selain ancaman patogen dari *B. cereus*, spesies lain seperti *B. subtilis* dan *B. pumilus* juga umum ditemukan sebagai bakteri perusak (*spoilage bacteria*) yang berkontribusi pada pendeknya masa simpan tahu. Kemampuan tersebut dapat menjadikannya membahayakan di mana tahu bisa saja tampak normal secara sensorik (aroma dan visual), namun di dalamnya sudah mengandung bakteri dalam

jumlah yang berisiko menghasilkan toksin berbahaya. Oleh karena itu, keberadaan *Bacillus* spp. Pada produk pangan perlu menjadi perhatian dalam upaya peningkatan kualitas dan keamanan konsumsi pangan masyarakat.

Untuk mencegah kerusakan pangan, diperlukan kondisi yang dapat menghambat reaksi yang tidak diinginkan, salah satunya melalui penambahan bahan pengawet. Berdasarkan Permenkes RI No. 033 Tahun 2012, pengawet adalah bahan tambahan pangan yang berfungsi mencegah atau menghambat kerusakan akibat mikroorganisme. Penggunaannya diizinkan dalam batas aman dan diawasi oleh BPOM. Namun, penyalahgunaan masih sering terjadi, seperti penggunaan melebihi dosis atau memakai zat berbahaya seperti formalin dan boraks yang memiliki risiko terhadap kesehatan konsumen.

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan salah satu komoditas lokal yang mempunyai banyak manfaat bagi pengkonsumsinya mulai dari daun muda, bunga, biji, hingga kulitnya (Haryani et al., 2016). Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan, daun melinjo diketahui memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti alkaloid, tanin, steroid, dan flavonoid (Kining et al., 2022). Kandungan senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakteri, seperti alkaloid yang digunakan sebagai perancah dalam pengembangan obat antibakteri seperti metronidazol dan kuinolon (Cushnie et al., 2014). Dalam penelitian lain juga teridentifikasi adanya metabolit sekunder seperti alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, dan triterpenoid dalam daun melinjo yang berpotensi sebagai antibiotik (Tarigan et al., 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Setiawan dan Widiyanti (2018), menunjukkan hasil bahwa ekstrak etanol daun melinjo (*G. gnemon* L.) mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, yang mengindikasikan adanya aktivitas antibiotik pada ekstrak tersebut. Dalam penelitian Fahdi et al. (2020) terbukti bahwa ekstrak daun melinjo pada konsentrasi 500 mg/ml mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang juga merupakan bakteri Gram-positif. Meskipun ekstrak daun melinjo memiliki aktivitas antibakteri alami, efektivitasnya dapat ditingkatkan melalui pendekatan bioteknologi, salah

satunya dengan sintesis hijau nanopartikel perak (AgNPs) untuk memperkuat daya hambatnya terhadap bakteri.

Untuk meningkatkan efektivitas ekstrak daun melinjo, dapat digunakan pendekatan nanoteknologi melalui sintesis nanopartikel perak (AgNPs). Nanopartikel perak dikenal sebagai agen antibakteri anorganik yang kuat dan non-toksik, karena sifatnya yang biocidal (toksik pada jamur dan bakteri) dan dimanfaatkan sebagai agen antibakteri dan pengawet pada berbagai produk (Zulaicha, 2021). Seiring berkembangnya ilmu dan Teknologi, pendekatan *green synthesis* dalam sintesis nanopartikel perak (AgNPs) menjadi solusi inovatif karena lebih ramah lingkungan, ekonomis, dan menghasilkan produk yang lebih aman dibandingkan dengan metode fisika-kimia (Kim et al., 2016). Metode ini memanfaatkan ekstrak tumbuhan sebagai agen pereduksi alami, khususnya metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin yang berperan penting dalam proses reduksi ion Ag^+ menjadi Ag^0 . (Taba et al., 2019). Dalam penelitian Zulaicha et al. (2021) di mana nanopartikel perak (AgNPs) berhasil disintesis menggunakan ekstrak daun ilalang (*Imperata cylindrica*). Metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut berperan sebagai bioreduktor alami sekaligus *capping agent* yang membantu menjaga kestabilan ukuran nanopartikel. Hal tersebut menjadi sangat relevan, sebab ekstrak daun melinjo yang kaya akan senyawa bioaktif tidak hanya berpotensi sebagai pereduksi alami untuk membentuk AgNPs, tetapi juga memberikan aktivitas antibakteri, sehingga berpotensi menciptakan efek sinergis yang kuat.

Meskipun berbagai upaya pengawetan telah diterapkan, keberadaan *Bacillus spp.* yang mampu membentuk spora menjadikan pengendalian mikroba pada tahu menjadi tantangan besar. Beberapa studi menunjukkan adanya potensi antibakteri dari ekstrak daun melinjo maupun efektivitas nanopartikel perak (AgNPs), namun riset yang secara khusus menggabungkan keduanya melalui pendekatan *green synthesis* dan mengujinya terhadap *Bacillus spp.* masih sangat terbatas. Terlebih lagi, aplikasinya sebagai pengawet pangan alami juga belum banyak dieksplorasi secara mendalam. Oleh karena itu, penelitian ini hadir untuk mengisi celah tersebut dengan menawarkan solusi inovatif yang menggabungkan sumber daya hayati lokal

dan Teknologi ramah lingkungan guna meningkatkan keamanan pangan secara berkelanjutan. Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong dilakukannya penelitian dengan judul “*Aktivitas Anti-Bacillus dari Sintesis Hijau Nanopartikel Perak yang Dimediasi Ekstrak Daun Melinjo (Gnetum gnemon L.) dan Pengaruhnya terhadap Populasi Mikroba pada Tahu.*”

1.2. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka identifikasi masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (*G. gnemon L.*) dan bagaimana hasil ekstraksi bubuk daun melinjo menggunakan pelarut etanol 99,6%?
2. Bagaimana proses sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak daun melinjo (*G. gnemon L.*) serta bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak dan nanopartikel perak hasil sintesis hijau (ML-AgNPs) terhadap *Bacillus spp.*?
3. Bagaimana pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap populasi mikroba pada tahu selama masa penyimpanan pada suhu yang berbeda?

1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengkaji potensi bubuk dan ekstrak daun melinjo (*G. gnemon L.*) sebagai sumber bahan alami dalam sintesis hijau nanopartikel perak, serta mengevaluasi efektivitasnya sebagai agen antibakteri terhadap *Bacillus spp.* dan sebagai pengawet alami dalam upaya meningkatkan keamanan dan mutu tahu selama penyimpanan.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (*G. gnemon L.*) serta mengevaluasi hasil ekstraksi bubuk daun melinjo menggunakan pelarut etanol 99,6%.

2. Mensintesis nanopartikel perak melalui metode sintesis hijau menggunakan ekstrak daun melinjo serta menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo dan nanopartikel perak hasil sintesis hijau (ML-AgNPs) terhadap *Bacillus spp.*
3. Mengevaluasi pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap populasi mikroba pada tahu selama masa penyimpanan pada suhu yang berbeda.

1.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini yaitu:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai karakteristik fisikokimia dari bubuk daun melinjo serta hasil ekstraksi daun melinjo menggunakan pelarut etanol 99,6%.
2. Memberikan informasi mengenai proses sintesis hijau nanopartikel perak (AgNPs) menggunakan ekstrak daun melinjo dan potensi aktivitas antibakterinya dibandingkan dengan ekstrak daun melinjo.
3. Memberikan dasar ilmiah dalam pengembangan agen antimikroba berbasis alami dari ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs sebagai alternatif pengawet alami untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada tahu selama penyimpanan dengan kondisi suhu yang berbeda.

1.5. Kerangka Penelitian

Keamanan pangan di Indonesia menghadapi tantangan yang cukup serius, terutama pada produk pangan populer seperti tahu. Tahu memiliki daya tahan yang sangat singkat, seringkali hanya mampu bertahan selama 3-4 hari, karena kandungan air dan protein yang tinggi menjadi media yang sangat cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme (Mailia et al., 2015). Proses pembusukan ini ditandai dengan munculnya bau busuk akibat degradasi protein menjadi amonia (NH_3) dan potensi produksi mikotoksin oleh kapang (Fatimatuzzahrah et al., 2024). Beberapa literatur mengidentifikasi adanya bakteri patogen pada tahu, salah satunya yaitu *Bacillus spp.* (Sofyan et al., 2016). Akibat dari tingginya risiko pembusukan ini membuat sebagian produsen mengambil langkah pintas dengan menggunakan bahan

pengawet yang dilarang, seperti formalin dan boraks untuk memperpanjang umur simpan dan memperbaiki tekstur produk. Hal tersebut didukung oleh penelitian Ariani et al. (2016), bahwa dari 19 sampel tahu mentah didapatkan bahwa 80% - 100% sampel tahu di beberapa pasar tradisional positif mengandung formalin. Praktik ini dapat menimbulkan risiko serius bagi kesehatan konsumen, sehingga diperlukan alternatif pengawet alami yang aman, efektif, dan ramah lingkungan untuk mengendalikan pertumbuhan mikroba pada tahu.

Salah satu pendekatan yang bisa digunakan untuk mengatasi kontaminasi mikroba adalah penggunaan bahan alami yang bersifat antimikroba. Daun melinjo (*G. gnemon* L.) telah diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin yang memiliki potensi antibakteri (Kining et al., 2022).. Beberapa penelitian menunjukkan menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *S. aureus* (Fahdi et al., 2020) dan *E. coli* (Setiawan dan Widiarti, 2018). Namun, efektivitasnya cenderung masih terbatas jika digunakan langsung sebagai pengawet pangan.

Untuk meningkatkan efektivitas antimikroba dari ekstrak tersebut, pendekatan berbasis Nanoteknologi menjadi salah satu pilihan yang menjanjikan. Nanopartikel perak (AgNPs) dikenal memiliki sifat antimikroba yang sangat kuat dan berspektrum luas, serta efektif pada konsentrasi rendah. AgNPs dapat mengganggu struktur dan fungsi sel mikroba melalui berbagai mekanisme, seperti pembentukan pori pada membran sel, induksi stres oksidatif melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS), pelepasan ion Ag^+ yang bersifat toksik, hingga interaksi langsung dengan DNA dan protein bakteri (Wang et al., 2017). Pendekatan *green synthesis* menggunakan ekstrak tanaman sebagai agen pereduksi alami menawarkan metode yang ramah lingkungan, murah, dan bebas dari residu toksik dibanding metode kimia konvensional (Ahmed et al., 2016). AgNPs bekerja melalui beberapa mekanisme, antara lain induksi stres oksidatif, pelepasan ion Ag^+ yang mengganggu aktivitas enzim dan DNA bakteri, serta kerusakan fisik langsung pada membran sel yang menyebabkan lisis. Dengan mekanisme kerja seperti itu, AgNPs berpotensi tinggi untuk digunakan dalam pengendalian *Bacillus* spp. pada pangan,

khususnya tahu, yang sangat rentan rusak dan mudah tercemar selama penyimpanan.

Dalam proses green synthesis, senyawa bioaktif dalam daun melinjo seperti flavonoid dan tanin berperan ganda: sebagai agen pereduksi ion Ag^+ menjadi Ag^0 dan sekaligus sebagai penstabil (capping agent) untuk menjaga ukuran dan kestabilan partikel (Taba et al., 2019; Ahmad et al., 2024). Kombinasi antara aktivitas antibakteri alami dari ekstrak dan sifat biocidal dari AgNPs diharapkan menciptakan efek sinergis yang lebih kuat dalam menghambat *Bacillus* spp., termasuk *B. cereus*, yang diketahui resisten terhadap berbagai kondisi ekstrem karena kemampuannya dalam membentuk spora.

Meskipun telah ada penelitian mengenai potensi AgNPs dan ekstrak tanaman secara terpisah, masih sangat sedikit kajian yang secara spesifik menggabungkan ekstrak daun melinjo sebagai agen green synthesis dalam pembuatan AgNPs, lalu mengujinya terhadap *Bacillus* spp. serta mengevaluasi aplikasinya sebagai pengawet tahu. Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk memberikan solusi inovatif dalam mengembangkan pengawet pangan alami yang efektif terhadap *Bacillus* spp. pada produk tahu.

1.6. Hipotesis Penelitian

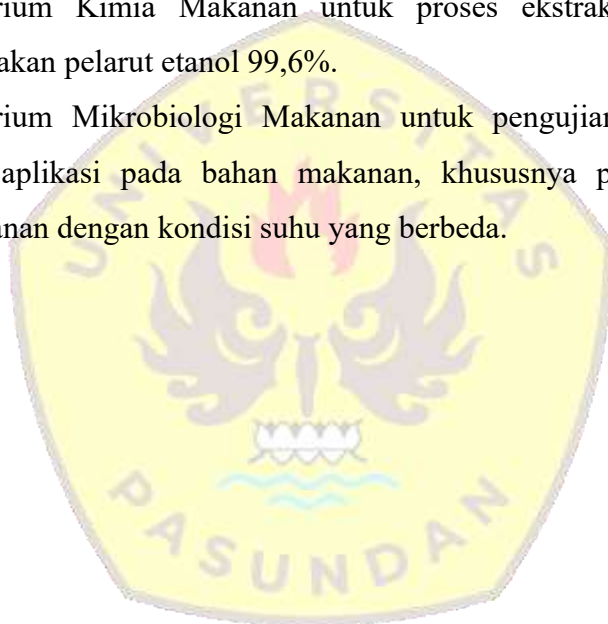
Berdasarkan uraian dalam kerangka pemikiran diduga bahwa :

1. Diduga bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.) memiliki karakteristik fisikokimia tertentu dan dapat diekstrak menggunakan pelarut etanol 99,6% sehingga menghasilkan rendemen ekstrak.
2. Diduga ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) berperan sebagai agen pereduksi dalam sintesis hijau nanopartikel perak (ML-AgNPs) serta menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus* spp., dan aktivitas ML-AgNPs lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun melinjo.
3. Diduga pemberian ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs pada berbagai konsentrasi berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus* spp. pada tahu selama penyimpanan pada suhu yang berbeda.

1.7. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada tanggal 12 Agustus hingga 9 September 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium - Laboratorium Fakultas Ilmu dan Teknologi Pangan, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia dengan rincian:

1. Laboratorium Pemrosesan Makanan untuk pembuatan bubuk daun melinjo dan analisis fisikokimia bubuk daun melinjo meliputi Analisis warna (nilai L^* , a^* , dan b^*), kadar air, nilai pH, dan aktivitas air (a_w).
2. Laboratorium Kimia Makanan untuk proses ekstraksi daun melinjo menggunakan pelarut etanol 99,6%.
3. Laboratorium Mikrobiologi Makanan untuk pengujian antibakteri dan evaluasi aplikasi pada bahan makanan, khususnya pada tahu selama penyimpanan dengan kondisi suhu yang berbeda.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menguraikan mengenai: (2.1.) Tahu, (2.2.) Kontaminan pada Tahu, (2.3.) *Bacillus spp.*, yang terdiri atas (2.3.1.) *B. cereus*, (2.3.2.) *B. subtilis*, (2.3.3.) *B. pumilus*, dan *B. megaterium*, (2.4.) Pengawet Pangan, yang dibedakan menjadi (2.4.1.) Pengawet Sintetik dan (2.4.2.) Pengawet Alami, (2.5.) Melinjo, yang mencakup (2.5.1.) Morfologi Melinjo, (2.5.2.) Taksonomi Melinjo, (2.5.3.) Fitokimia Melinjo, dan (2.5.4.) Bioaktivitas Melinjo, serta (2.6.) Nanopartikel, yang meliputi (2.6.1.) Nanopartikel Perak dan (2.6.2.) Nanopartikel perak hasil sintesis hijau yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs), yang mencakup (2.6.2.1.) Karakterisasi ML-AgNPs dan (2.6.2.2.) Uji Toksisitas ML-AgNPs.

2.1. Tahu

Tahu yang berbahan dasarnya kedelai merupakan salah satu bahan pangan nabati yang dikonsumsi dan dikenal sebagai sumber protein nabati. Kandungan proteinnya yang tinggi menjadikan kedelai sebagai alternatif pengganti protein hewani, khususnya bagi orang yang memiliki alergi terhadap protein hewani atau bagi seorang vegan. Selain protein, kedelai juga mengandung lemak, karbohidrat, vitamin, mineral, serta senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Adapun kedelai mentah memiliki kandungan senyawa antigizi, seperti oligosakarida penyebab flatulensi; yang dapat menimbulkan pembentukan gas berlebih dalam saluran pencernaan dan menyebabkan perut kembung apabila dikonsumsi tanpa proses pengolahan (Suryandari, 2021). Oleh karena itu, proses pengolahan pada kacang kedelai menjadi salah satu tahapan yang cukup penting untuk meningkatkan daya cerna dan nilai gizi kedelai.

Ditinjau dari aspek pangan dan gizi, kedelai merupakan salah satu sumber protein yang cukup terjangkau dari segi biaya dan ketersediaan. Kedelai dapat menghasilkan berbagai jenis produk olahan, salah satunya adalah tahu. Tahu (Gambar 1) merupakan salah satu produk olahan kedelai yang diproses melalui penggumpalan ekstrak kedelai (Andarwulan et al., 2018). Menurut SNI 01-3142-1998 definisi tahu adalah suatu produk makanan berupa padatan lunak yang dibuat

melalui proses pengolahan kedelai (*Glycine* sp.) dengan cara pengendapan proteinnya, dengan atau tanpa penambahan bahan lainnya yang diizinkan.



Gambar 1. Tahu

Komposisi kimia tahu terdiri atas kadar air sekitar 88%, protein sebesar 6%, lemak 3,5%, karbohidrat 1,9%, dan kadar abu 0,6% (Min et al., 2005). Kandungan air dan protein yang tinggi menjadikan tahu sebagai media yang sangat ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme, sehingga daya simpannya cenderung singkat, hanya sekitar 3–4 hari pada suhu ruang (Mailia et al., 2015).

Karakteristik fisik tahu yang baik ditandai dengan tekstur yang halus, kokoh tetapi tidak keras atau kenyal. Tahu terbentuk dari gel protein kedelai, maka jumlah dan kualitas protein dalam susu kedelai sangat memengaruhi hasil akhir dari tahu yang dihasilkan (Poysa dan Woodrow, 2002). Selain itu, kualitas dan tekstur tahu juga dipengaruhi oleh berbagai parameter proses selama pembuatannya, seperti kadar padatan sari kedelai sebelum koagulasi serta penggunaan bahan tambahan seperti natrium bikarbonat. Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa penggunaan natrium bikarbonat mampu menghasilkan tekstur tahu yang lebih halus dan dapat mengurangi bau khas kedelai (*beany flavour*) (Rekha dan Vijayalakshmi, 2013).

2.2. Kontaminasi pada Tahu

Pada proses pembuatan tahu melibatkan tahapan termal seperti pemasakan sari kedelai dan penggumpalan protein untuk mengurangi mikroorganisme, namun beberapa bakteri tetap dapat bertahan (Mailia et al., 2015). Tingginya tingkat

populasi bakteri tersebut dapat menyebabkan penurunan mutu tahu karena terbentuknya metabolit hasil pertumbuhan bakteri, seperti bau busuk, lendir, serta perubahan tekstur. Sumber cemaran bakteri pada tahu dapat berasal dari bahan baku yaitu kedelai dan air, lingkungan produksi, dan juga para pekerja. Lingkungan ini menjadi habitat alami berbagai bakteri, di antaranya *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, dan bakteri pembentuk spora lainnya (Mailia et al., 2015). *S. aureus* umumnya berasal dari kulit, rambut, atau saluran pernapasan manusia (Baird-Parker, 2000), sedangkan *B. cereus* banyak ditemukan pada beras, daging, susu, bumbu, sayuran, dan kacang-kacangan kering (Rajkovic et al., 2013).

Beberapa hasil penelitian Penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa tahu rentan terhadap kontaminasi mikroba. Beberapa bakteri yang terdeteksi pada produk tahu antara lain *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, dan *B. cereus* (Mailia et al., 2015). Menurut SNI 01-3142-1998, batas maksimum cemaran *E. coli* dalam tahu adalah 10^3 CFU/g dan harus bebas dari *Salmonella* pada 25 g sampel. Sementara itu, berdasarkan pedoman dari Food and Drug Administration (FDA) Filipina tahun 2013, batas maksimal *E. coli* dalam tahu adalah <10 CFU/g, *S. aureus* koagulase positif adalah 10^2 CFU/g, dan *B. cereus* sebesar 10^2 CFU/g (Mailia et al., 2015).

Di antara berbagai jenis bakteri kontaminan tersebut, bakteri pembentuk spora dari genus *Bacillus* menjadi perhatian utama karena kemampuannya bertahan terhadap proses pemanasan dan kondisi lingkungan yang ekstrem. Endospora yang dihasilkan memberikan mekanisme pertahanan yang kuat, sehingga bakteri ini tetap bertahan hidup selama proses pengolahan dan penyimpanan tahu. Kondisi tersebut berpotensi menyebabkan penurunan mutu serta meningkatkan risiko keamanan pangan. Oleh karena itu, pengawasan mutu mikrobiologis pada tahu menjadi hal yang sangat penting untuk menjamin keamanan konsumen.

2.3. *Bacillus* spp.

Genus *Bacillus* merupakan kelompok bakteri berbentuk batang dan Gram-positif yang tersebar luas di berbagai habitat, mulai dari tanah hingga lingkungan perairan.

2.3.1. *B. cereus*

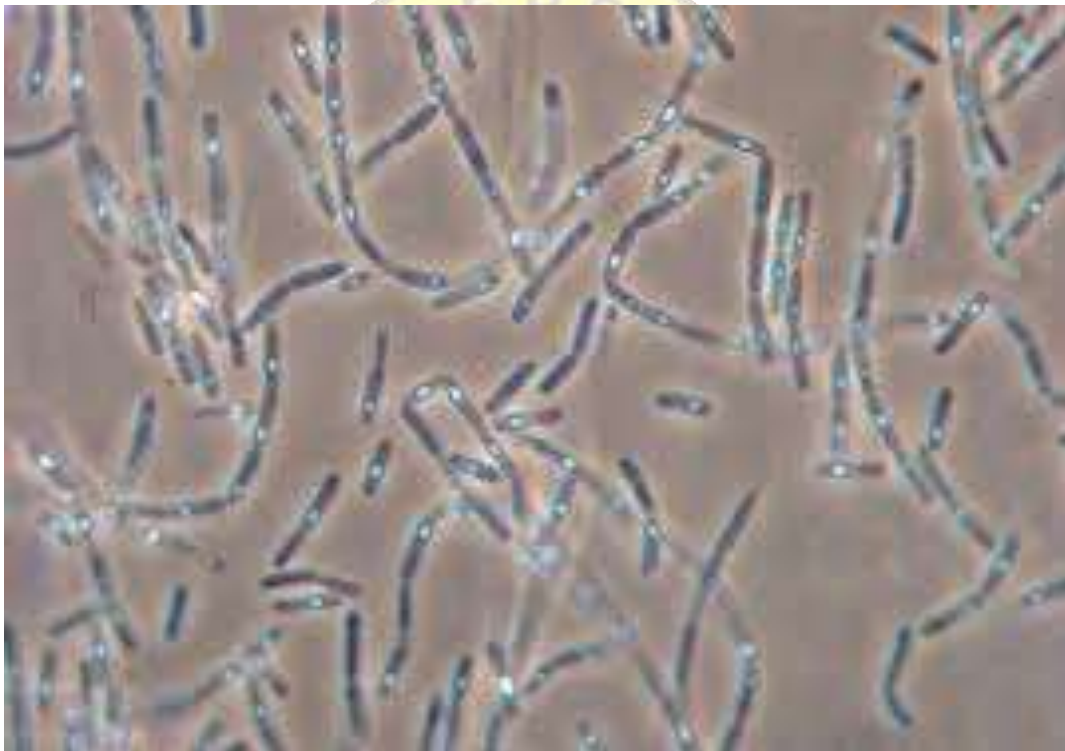
Salah satu spesies yang paling menjadi sorotan dalam keamanan pangan adalah *B. cereus* (Gambar 2), bakteri Gram-positif yang bersifat aerob atau anaerob fakultatif dan mampu memproduksi enzim katalase (Hatmanti, 2000). *B. cereus* umumnya dianggap sebagai bakteri mesofilik dengan suhu pertumbuhan 10–50°C dan suhu optimum 28–37°C, meskipun beberapa variannya mampu berkembang biak di bawah 7°C dan di atas 45°C. Patogen ini juga mampu tumbuh pada pH 4,3–9,3, dengan pH optimum antara 6,0–7,0.

Kemampuannya dalam membentuk spora memungkinkannya bertahan dalam kondisi ekstrem seperti panas, pembekuan, pengeringan, pH rendah, hingga paparan radiasi. Selain itu, *B. cereus* dapat membentuk biofilm yang menyulitkan proses pembersihan dan desinfeksi pada permukaan yang terkontaminasi. Keberadaannya yang umum ditemukan di tanah, lingkungan perairan, bahan organik membusuk, serta saluran usus hewan dan serangga, menjadikan bakteri ini sebagai kontaminan potensial pada berbagai rantai produksi pangan (Apriliansyah et al., 2022).

Menurut Jessbenger et al. (2020) dan Arnesen et al. (2008), *B. cereus* dikenal sebagai bakteri yang dapat menyebabkan dua tipe keracunan pangan yang berbeda. Tipe pertama adalah sindrom emetik (muntah), sebuah intoksikasi yang disebabkan oleh toksin cereulide yang sudah terbentuk sebelumnya di dalam makanan, tipe ini umumnya diasosiasikan dengan makanan kaya pati seperti nasi dan pasta. Tipe kedua adalah sindrom diare, sebuah toksiko-infeksi yang terjadi ketika spora atau sel vegetatif *B. cereus* yang tertelam memproduksi enterotoksin protein seperti hemolysin BL (Hbl), non-hemolytic enterotoxin (Nhe), dan cytotoxin K (CytK) di dalam usus kecil. Dosis infeksi untuk tipe diare diperkirakan antara 10^5 hingga 10^8 CFU/g makanan. Sindrom ini lebih sering dikaitkan dengan makanan kaya protein seperti produk daging, sayuran, saus, dan produk susu.

Produk olahan kedelai merupakan salah satu media yang rentan terhadap kontaminasi *B. cereus*. Dalam penelitian Mustika et al. (2019) ditemukan bahwa

minuman susu kedelai yang dijual di pasar tradisional positif tercemar *B. cereus* dengan jumlah yang melebihi batas aman menurut Standar Nasional Indonesia (SNI). Pada penelitian lain juga menunjukkan bahwa *B. cereus* dapat tumbuh secara signifikan selama proses fermentasi tempe. Hal yang paling dikhawatirkan dalam penelitian tersebut adalah adanya “bahaya tersembunyi” yaitu kontaminasi awal *B. cereus* dalam jumlah rendah dapat menghasilkan produk tempe yang secara sensorik (aroma dan visual) masih dapat diterima oleh konsumen, namun di dalamnya sudah mengandung bakteri dalam jumlah yang berpotensi menghasilkan toksin berbahaya (Emilia et al., 2015). Temuan ini menunjukkan bahwa keamanan produk tidak bisa hanya dinilai dari penampakannya saja, sehingga menegaskan perlunya agen pengawet yang efektif.

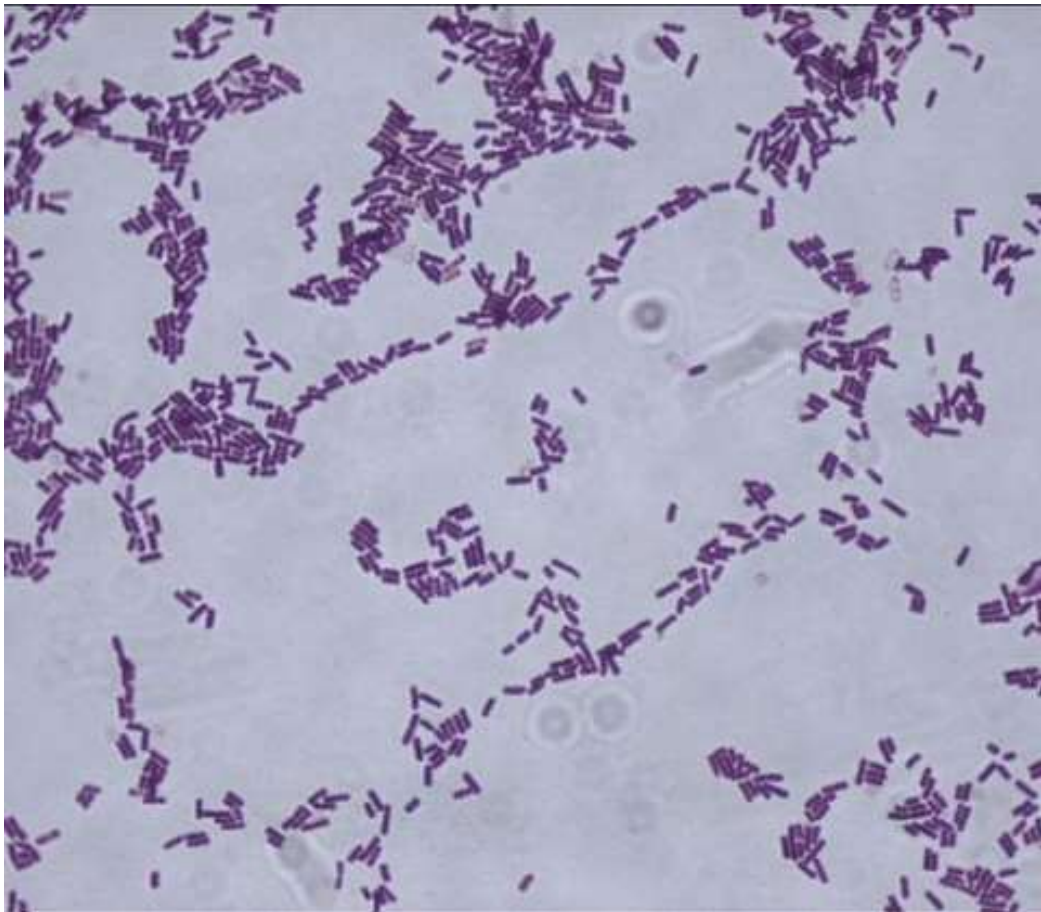


Gambar 2. *B. cereus* (Manikome, 2022)

2.3.2. *B. subtilis*

B. subtilis (Gambar 3) merupakan bakteri Gram-positif berbentuk batang yang bersifat aerob dan banyak ditemukan di alam, seperti pada tanah dan air (Pelczar dan Chan, 1988). Salah satu karakteristik utama dari bakteri ini adalah

kemampuannya dalam membentuk endospora pada kondisi lingkungan yang ekstrem, sehingga memungkinkannya bertahan terhadap variasi suhu, pH, dan salinitas yang ekstrem (Turnbull, 1996). Berbeda dengan *B. cereus*, *B. subtilis* bersifat non-patogen dan non-toksik sehingga memiliki status *Generally Regarded as Safe* (GRAS) dan aman untuk digunakan dalam berbagai aplikasi industri pangan dan bioteknologi (Cartwright, 2009).



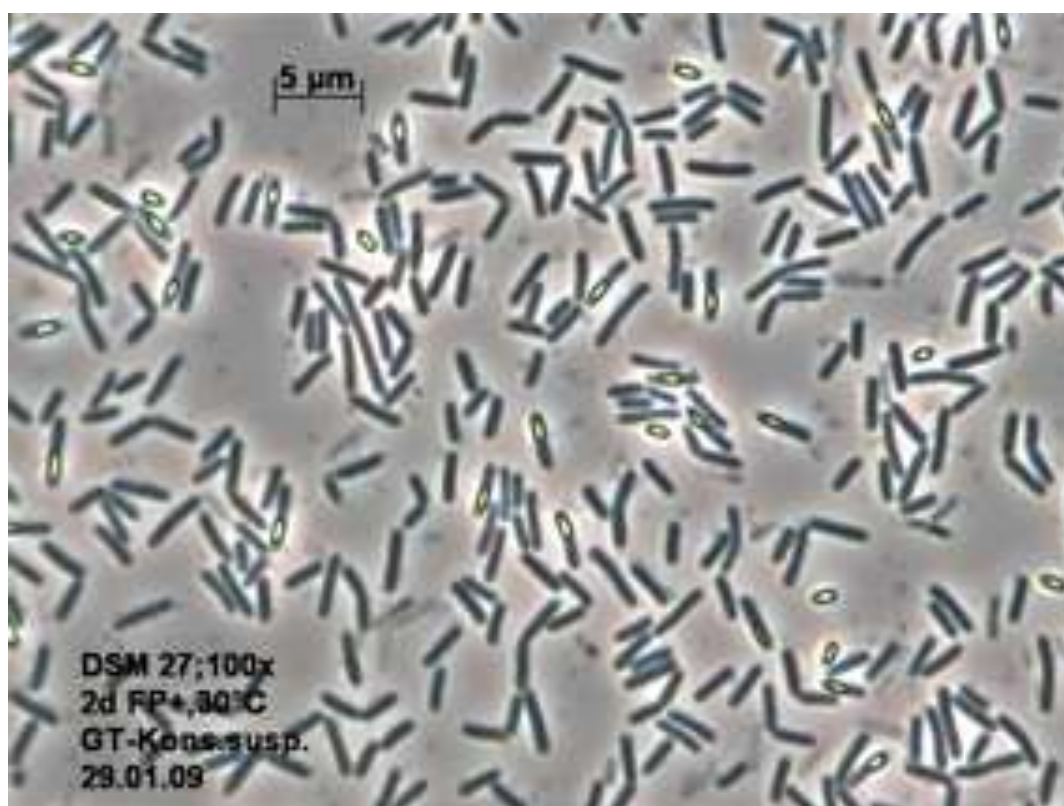
Gambar 3. *B. subtilis* (Hussein et al., 2019)

2.3.3. *B. pumilus*

B. pumilus (Gambar 4) merupakan salah satu spesies dari genus *Bacillus* yang banyak ditemukan di lingkungan seperti tanah, air, dan permukaan tanaman. Spesies ini dikenal memiliki tingkat resistensi yang sangat tinggi terhadap berbagai kondisi lingkungan, bahkan sering kali melebihi spesies *Bacillus* lainnya. Ketahanan tersebut mencakup resistensi terhadap paparan radiasi ultraviolet (UV)

dan gamma, senyawa oksidatif seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), serta berbagai proses sterilisasi kimia, sehingga menjadikannya sebagai kontaminan yang menantang dalam industri farmasi, kosmetik, maupun pangan.

Kemampuan adaptasinya terhadap lingkungan ekstrem diperkuat oleh temuan Arifin et al. (2013), yang berhasil mengisolasi beberapa strain *B. pumilus* dari sampel tanah Antartika. Isolat tersebut menunjukkan sifat psikrotoleran, yaitu kemampuan untuk bertahan dan tetap aktif pada suhu rendah.



Gambar 4. *B. pumilus* (Sumber: Sarda et al., 2025)

2.3.4. *B. megaterium*

B. megaterium (Gambar 5) merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang yang dikenal mampu membentuk endospora untuk bertahan dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Kemampuan adaptasinya yang tinggi dibuktikan dalam penelitian Selvakumar et al. (2022), di mana *B. megaterium* berhasil diisolasi dari sampel tanah di lahan terlantar dengan kandungan nutrisi rendah. Salah satu karakteristik fisiologis unggulan dari *B. megaterium* adalah sifat halotoleran, yaitu kemampuannya untuk tumbuh pada kondisi dengan kadar garam tinggi. Strain *B.*

megaterium yang diisolasi mampu menunjukkan pertumbuhan yang baik pada media dengan konsentrasi NaCl hingga 12%, yang menandakan adanya mekanisme adaptasi yang kuat terhadap tekanan osmotik.



Gambar 5. *B. megaterium* (Perkins, 2011)

2.4. Pengawet Pangan

Pengawetan pangan merupakan salah satu upaya yang dilakukan untuk memperpanjang masa simpan produk dengan menghambat aktivitas mikroorganisme penyebab kerusakan. Penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) menjadi salah satu hal yang umum diterapkan dalam industri pangan. Bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambahkan ke dalam makanan maupun minuman untuk mempengaruhi bentuk pangan dan tidak mempunyai nilai gizi yang sengaja ditambahkan ke dalam pangan pada proses pembuatan, pengolahan, penyiapan, perlakuan, pengemasan dan lain-lain (BPOM, 2019). Salah satu jenis BTP yang umum digunakan untuk memperpanjang umur simpan adalah bahan pengawet.

Menurut Permenkes No. 33 Tahun 2012, Bahan pengawet merupakan salah satu jenis Bahan Tambah Pangan (BTP) yang ditambahkan ke dalam makanan dengan tujuan menghambat fermentasi, pengasaman, atau proses peruraian lain akibat mikroorganisme, sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk. Berdasarkan sumbernya, bahan pengawet diklasifikasikan menjadi pengawet sintetis dan pengawet alami.

2.4.1. Pengawet Sintetis

Pengawet sintetis adalah bahan pengawet yang diproduksi secara kimia dan umum digunakan dalam industri pangan, karena efektivitas dan kestabilannya dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Penggunaan bahan pengawet sintetis seperti formalin, boraks, dan natrium benzoat masih menjadi perhatian serius di Indonesia. Meski beberapa jenis pengawet seperti asam benzoat dan turunannya masih diperbolehkan penggunaannya dalam batas aman, formalin dan boraks termasuk daftar bahan yang dilarang karena memiliki sifat toksik dan berbahaya bagi kesehatan (Rivianto, 2023).

Konsumsi bahan pengawet yang melebihi ambang batas juga dapat menyebabkan berbagai gangguan kesehatan, seperti kerusakan organ, reaksi alergi, hingga efek karsinogenik (Hayati, 2009). Masih kerap terjadi pelanggaran yang dilakukan oleh para produsen dalam penggunaan batas maksimum BTP, khususnya dalam produk pangan tradisional seperti tahu, bakso, dan jajanan pasar (Gama, et al., 2023). Kondisi tersebut menunjukkan dibutuhkan alternatif bahan pengawet yang lebih aman, mudah diperoleh, serta tetap efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada produk pangan.

2.4.2. Pengawet Alami

Tingginya risiko dari bahan pengawet sintetis mencetuskan pentingnya pengembangan pengawet alami sebagai alternatif yang lebih aman. Bahan pengawet alami terurama yang berasal dari tanaman telah banyak dikaji, karena memiliki sifat antimikroba dan antioksidan yang berpotensi menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab pembusukan dan keracunan makanan.

Efektivitas pengawet alami bergantung pada konsentrasi ekstrak dan jenis mikroba, dan kondisi penyimpanan pangan. Sebagai contoh, ekstrak saponin dari batang belimbing wuluh diketahui mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* pada konsentrasi tertentu. Begitu pula ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh yang mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap kedua jenis bakteri tersebut (Latifah, 2008; Faradisa, 2008). Salah satu bahan alami lain yang berpotensi tinggi adalah daun melinjo. Daun ini memiliki kandungan senyawa bioaktif yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram-positif maupun gram negatif, yang menandakan adanya aktivitas antibiotik alami (Fahdi et al., 2020; Setiawan dan Widiarti, 2018).

2.5. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo (*G. gnemon* L.) merupakan salah satu tanaman lokal Indonesia yang seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan, mulai dari daun, bunga, hingga kulit (Haryani et al., 2016). Kandungan senyawa bioaktif di dalamnya menjadikan tanaman ini memiliki potensi sebagai agen antimikroba alami.

2.5.1. Morfologi Melinjo

Tumbuhan melinjo (*G. gnemon* L.) merupakan salah satu spesies tumbuhan berbiji terbuka (Gymnospermae) yang berasal dari Asia Tropik dan Pasifik Barat. Tanaman asli Indonesia ini dapat tumbuh tinggi hingga 15-22 meter dengan sistem akar tunggang dan batang berkayu yang kokoh (Gambar 6). Secara morfologi, melinjo memiliki daun tunggal berbentuk oval dengan ujung tumpul berwarna hijau (Gambar 7). Tanaman ini mampu tumbuh subur pada iklim hutan hujan tropis dan memiliki ketahanan terhadap berbagai rentang suhu serta mampu bertahan pada tanah yang kurang subur (Prajnaparamita et al., 2021; Siregar et al., 2014).



Gambar 6. Tanaman Melinjo



Gambar 7. Daun Melinjo

2.5.2. Taksonomi Melinjo

Secara taksonomi, melinjo (*G. gnemon* L.) dapat diklasifikasikan sebagai tumbuhan berbiji terbuka (Gymnospermae) yang termasuk ke dalam ordo Gnetales. Klasifikasi taksonomi melinjo disajikan pada Tabel 1, sebagai berikut:

Tabel 1. Taksonomi Tanaman Melinjo (Siregar et al., 2014)

Divisi	Spermatophyta
Kelas	Gnetopsida
Ordo	Gnetales
Famili	Gnetaceae
Genus	<i>Gnetum</i>
Spesies	<i>G. gnemon</i> L.

2.5.3. Fitokimia Melinjo

Hampir seluruh bagian tanaman melinjo dapat dimanfaatkan, termasuk daunnya yang kaya akan senyawa bioaktif. Berdasarkan hasil uji fitokimia, daun melinjo diketahui mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid, dan flavonoid (Kining et al., 2022; Tarigan et al., 2019). Senyawa-senyawa tersebut, khususnya flavonoid dan tanin, dikenal memiliki aktivitas biologis penting, termasuk sebagai antimikroba. Tanin dilaporkan mampu merusak struktur dinding sel bakteri melalui interaksi dengan komponen lipofilik yang menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel (Cowan, 1999).

2.5.4. Bioaktivitas Melinjo

Potensi antibakteri dari kandungan senyawa bioaktif pada daun melinjo telah dibuktikan dalam beberapa penelitian. Penelitian yang dilakukan oleh Setiawan dan Widiyanti (2018) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun melinjo mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif *E. coli*. Selain itu, Fahdi et al. (2020) menunjukkan bahwa ekstrak daun melinjo pada konsentrasi 500 mg/ml efektif menghambat bakteri Gram-positif *S. aureus*. Temuan-temuan ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun melinjo memiliki spektrum aktivitas antibakteri yang luas.

Meskipun ekstrak daun melinjo menunjukkan potensi besar sebagai agen antimikroba alami, efektivitasnya dalam aplikasi langsung pada pangan masih menghadapi sejumlah tantangan. Salah satunya adalah ketahanan bakteri patogen seperti *B. cereus* yang memiliki kemampuan membentuk endospora, sehingga lebih

resisten terhadap perlakuan antimikroba. Selain itu, pemanfaatan ekstrak tumbuhan secara tunggal umumnya memerlukan konsentrasi tinggi untuk mencapai daya hambat yang optimal, yang dalam konteks aplikasi pangan dapat menjadi kurang efisien dan tidak praktis. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut sekaligus meningkatkan aktivitas antibakterinya secara signifikan, diperlukan Teknologi lebih lanjut dalam pengembangannya.

2.6. Nanopartikel

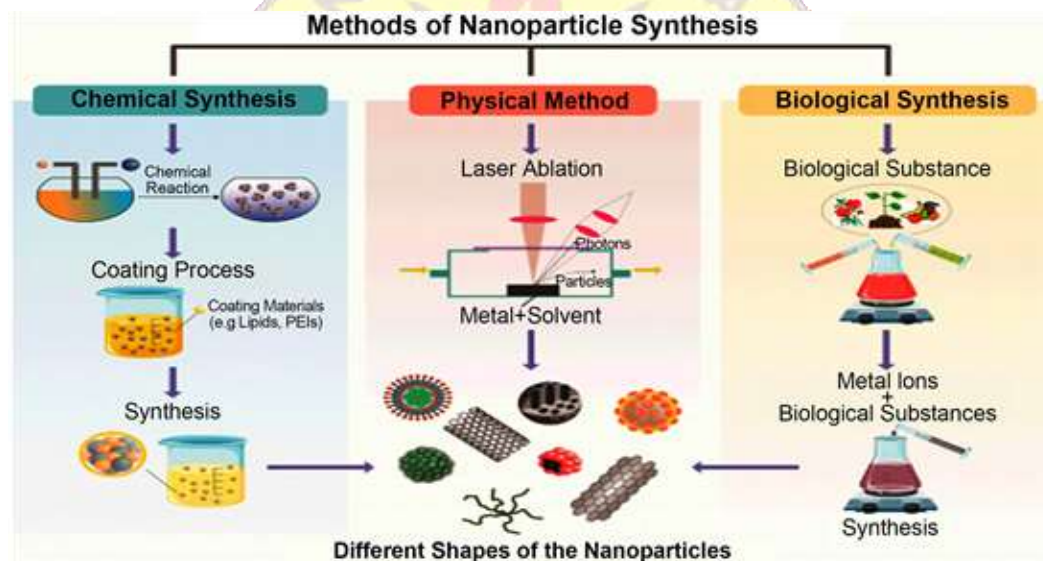
Nanoteknologi merupakan bidang ilmu yang mempelajari dan memanfaatkan material berukuran nano, yakni pada rentang 1 hingga 100 nanometer (Khan et al., 2023; Ahmad et al., 2024; dan Beer et al., 2012). Pada skala ini, material yang disebut sebagai nanopartikel (NPs) menunjukkan sifat fisik, kimia, dan biologis yang berbeda serta lebih unggul dibandingkan material berukuran makro (bulk). Keunggulan tersebut terutama disebabkan oleh luas permukaan relatif yang sangat tinggi, sehingga meningkatkan reaktivitas, kemampuan penetrasi, dan interaksi dengan lingkungan sekitarnya (Ahmad et al., 2024; Beer et al., 2012). Karakteristik ini menjadikan nanopartikel, termasuk nanopartikel logam seperti perak (AgNPs), sangat potensial untuk diaplikasikan sebagai agen antimikroba dalam berbagai bidang, termasuk dalam pengawetan pangan.

2.6.1. Nanopartikel Perak

Di antara berbagai jenis nanopartikel Logam, nanopartikel perak (AgNPs) mendapatkan perhatian khusus karena sifat antimikrobanya yang kuat (Beer et al., 2012; Khan et al., 2023). AgNPs telah terbukti efektif melawan berbagai jenis mikroorganisme patogen, termasuk bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif. Keunggulannya terletak pada kemampuan untuk bekerja pada konsentrasi yang relatif rendah, namun tetap menghasilkan efek antimikroba yang signifikan (Khan et al., 2023).

Sintesis nanopartikel perak (AgNPs) dapat dilakukan melalui berbagai metode (Gambar 8), termasuk metode fisika dan kimia. Namun, pendekatan konvensional ini seringkali membutuhkan energi tinggi, melibatkan bahan kimia berbahaya, dan

menghasilkan limbah yang berpotensi mencemari lingkungan (Ahmad et al., 2024). Sebagai alternatif yang lebih berkelanjutan, dikembangkanlah metode *green synthesis* atau sintesis hijau. Metode ini menggunakan pendekatan biologis yang dinilai lebih ramah lingkungan, hemat biaya, serta aman bagi kesehatan dan ekosistem (Khan et al., 2023). Proses ini umumnya memanfaatkan ekstrak tumbuhan sebagai agen pereduksi dan penstabil (*capping agent*) alami (Zulaicha et al., 2021). Senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, dan polifenol yang terdapat dalam ekstrak berperan penting dalam mereduksi ion perak (Ag^+) menjadi bentuk nanopartikel perak (Ag^0) yang stabil (Taba et al., 2019). Salah satu studi yang berhasil menerapkan pendekatan ini adalah sintesis AgNPs menggunakan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*), yang menghasilkan nanopartikel berbentuk bulat dengan ukuran rata-rata 27,69 nm dan menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap berbagai mikroorganisme patogen (Khan et al., 2023).

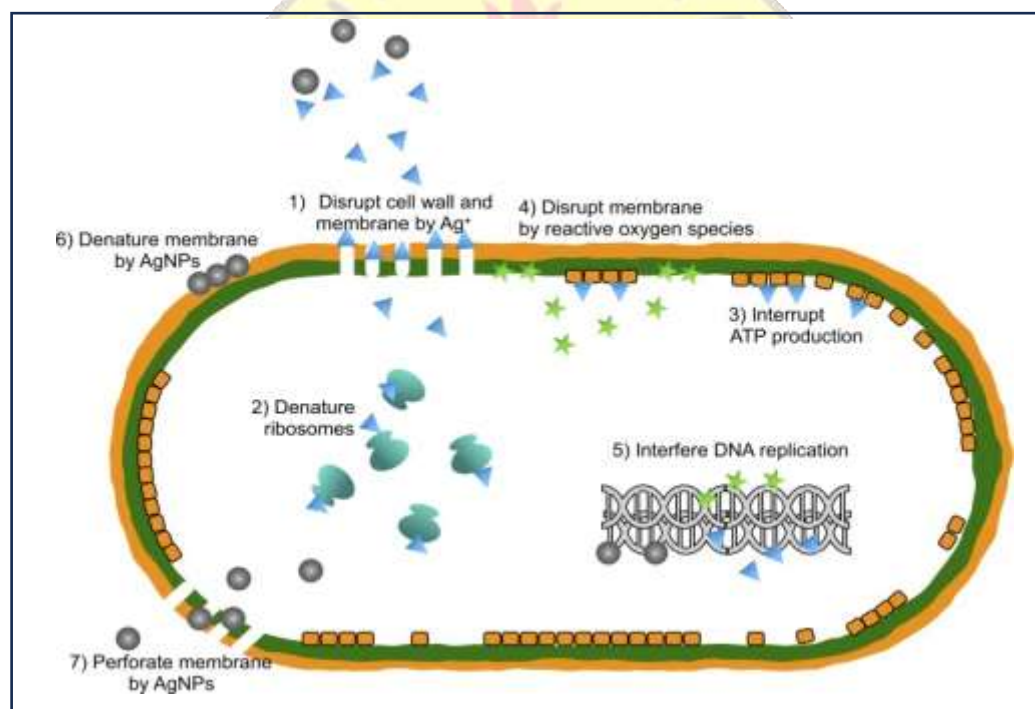


Gambar 8. Metode Sintesis Nanopartikel (Falola, 2022)

Mekanisme kerja nanopartikel perak (Gambar 9) dalam menghambat atau membunuh bakteri bersifat kompleks dan multifaktorial, sehingga menyulitkan bakteri untuk mengembangkan resistensi (Khan et al., 2023). AgNPs dapat berikatan dengan permukaan sel dan protein membran, menyebabkan terbentuknya pori-pori yang merusak integritas membran dan memungkinkan keluarnya komponen intraseluler penting, sehingga menyebabkan kematian sel (Khan et al.,

2023; Ahmad et al., 2024). Selain itu, AgNPs menginduksi stres oksidatif melalui peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), seperti radikal superoksida (O_2^-) dan hidroksil (OH). Akumulasi ROS merusak lipid, protein, dan asam nukleat sel bakteri serta mengganggu fungsi membran (Khan et al. (2023); Ahmad et al. (2024); dan Beer et al. (2012).

Mekanisme lainnya adalah pelepasan ion perak (Ag^+) dari permukaan nanopartikel. Ion ini sangat reaktif dan dapat mengganggu fungsi enzim serta struktur DNA melalui interaksi dengan gugus sulfhidril (-SH), karboksil (-COOH), dan amino (-NH₂) pada protein sel (Ahmad et al., 2024). Penelitian yang dilakukan Beer et al. (2012) menunjukkan bahwa toksisitas AgNPs bergantung pada jumlah ion Ag^+ yang dilepaskan; pada konsentrasi rendah terjadi efek sinergis antara nanopartikel dan ion, sedangkan pada konsentrasi tinggi toksisitas didominasi oleh ion.



Gambar 9. Mekanisme Kerja Nanopartikel (Yin et al., 2020)

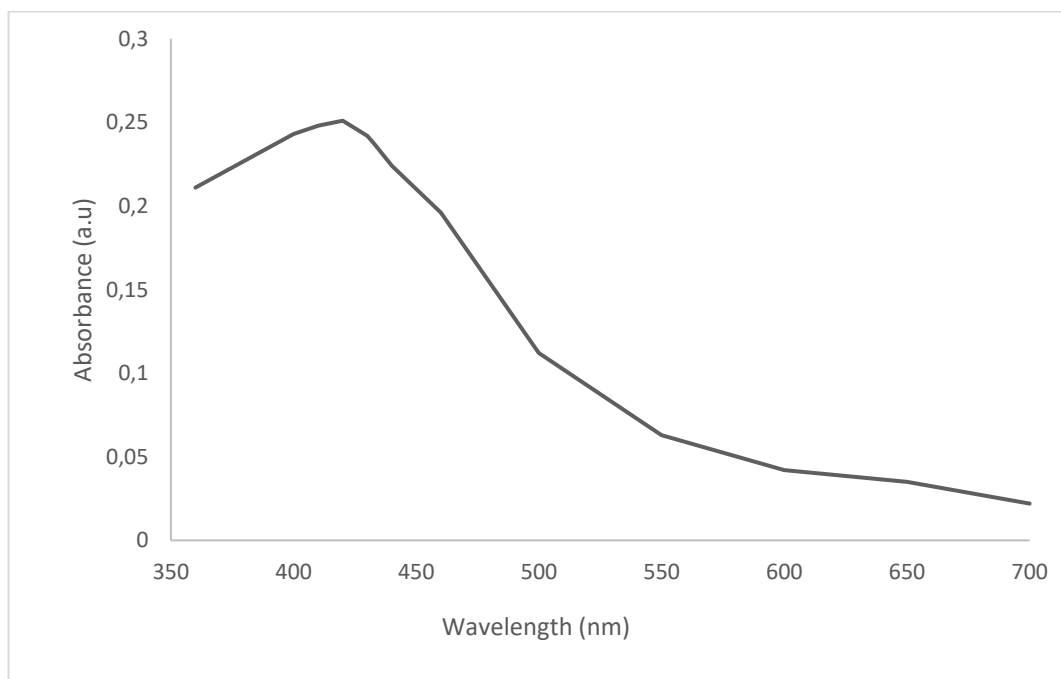
2.6.2. Nanopartikel perak hasil sintesis hijau yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs)

Biosintesis nanopartikel perak menggunakan ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) merupakan pendekatan sintesis hijau (*green synthesis*) yang ramah lingkungan, karena memanfaatkan senyawa bioaktif tanaman sebagai agen pereduksi dan penstabil alami. Adapun tanda terbentuknya nanopartikel ini ditandai secara visual melalui perubahan warna larutan dari cokelat tua menjadi kuning kecoklatan, hal tersebut disebabkan oleh efek *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Senyawa fitokimia seperti flavonoid, polifenol, dan stilbenoid berperan penting sebagai donor elektron dalam proses reduksi ion perak (Ag^+) menjadi perak elemental (Ag^0) sekaligus menjaga kestabilan nanopartikel yang terbentuk.

2.6.2.1. Karakterisasi ML-AgNPs

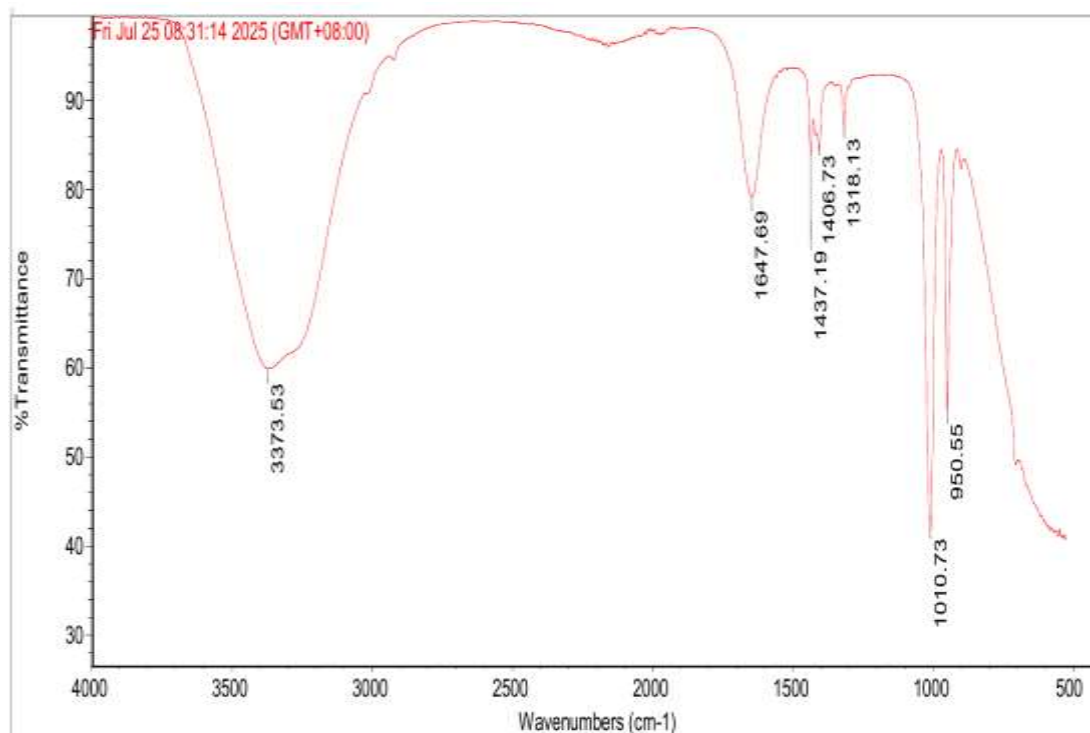
Karakterisasi pada ML-AgNPs dilakukan untuk mengetahui proses pembentukan, komposisi kimia, dan morfologi nanopartikel perak yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian Saidi (2026) karakterisasi ML-AgNPs dilakukan menggunakan spektroskopi UV-Vis, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM).

Spektroskopi UV-Vis (Gambar 10) digunakan untuk mendeteksi adanya pembentukan AgNPs melalui pita absorpsi *Surface Plasmon Resonance* (SPR), hasilnya menunjukkan puncak absorpsi yang menonjol pada kisaran panjang gelombang 420-450 nm; dengan puncak maksimal yang teramati pada 435 nm. Lebarnya puncak pada spektrum mengindikasikan adanya sifat polidispersitas, yaitu variasi ukuran partikel yang terbentuk.



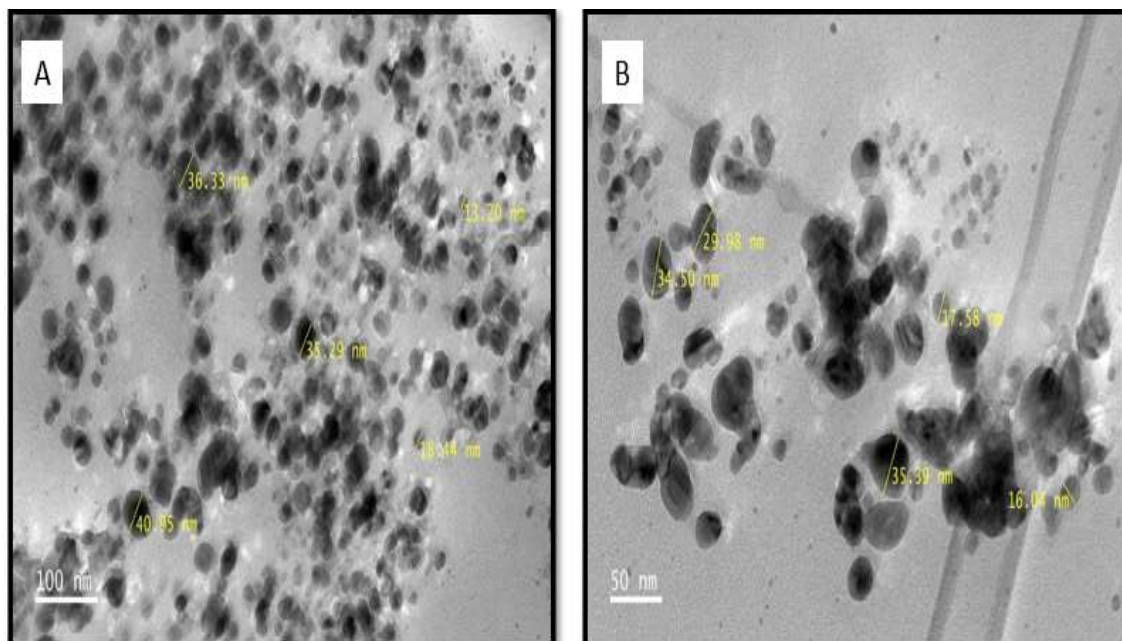
Gambar 10. Spektrum UV-Vis ML-AgNPs. (Saidi, 2026)

Analisis FTIR (Gambar 11) dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi biomolekul yang berperan dalam proses reduksi ion dan pelapisan (*capping*) nanopartikel. Hasil analisis menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada gelombang $3417,09\text{ cm}^{-1}$ yang berasal dari senyawa fenolik dan flavonoid. Adapun gugus karbonil (C=O) teridentifikasi pada $1655,08\text{ cm}^{-1}$ yang berikatan dengan protein atau polifenol. Gugus-gugus tersebut membentuk lapisan pelindung pada permukaan nanopartikel untuk mencegah terjadinya aglomerasi dan meningkatkan stabilitas dan biokompatibilitasnya.



Gambar 11. Spektrum FTIR ML-AgNPs (Saidi, 2026)

Analisis TEM (Gambar 12) digunakan untuk memperoleh informasi mengenai ukuran dan bentuk morfologi nanopartikel. Hasil karakterisasi ini menunjukkan bahwa ML-AgNPs yang dihasilkan sebagian besar memiliki morfologi sfera (bola) dan kuasi-sfera, dengan distribusi ukuran partikel berkisar antara 10 hingga 40 nm. Ukuran partikel dalam skala nanometer ini menunjukkan rasio luas permukaan terhadap volume yang tinggi, yang berkontribusi pada peningkatan efektivitas antibakteri melalui interaksi yang lebih kuat dengan membran sel mikroorganisme.



Gambar 12. Hasil TEM dari ML-AgNPs pada perbesaran (a) 100 nm dan (b) 50 nm (Saidi, 2026)

2.6.2.2. Uji Toksisitas ML-AgNPs

Selain karakterisasi pada ML-AgNPs, dilakukan juga uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Assay* (BSLA). *Brine Shrimp Lethality Assay* (BSLA) merupakan salah satu metode bioassay pendahulu yang diakui secara luas untuk mengevaluasi potensi sitotoksik dan keamanan biologis secara keseluruhan dari suatu zat bioaktif. Penggunaan BSLA ini sangat populer, karena prosedurnya yang cukup sederhana, cepat dan hemat biaya, serta tidak memerlukan kondisi aseptik. Pada metode ini digunakan larva udang air asin (*Artemia salina*) sebagai organisme model untuk memprediksi potensi efek berbahaya dari suatu senyawa sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut pada sistem yang lebih kompleks seperti lini sel mamalia atau uji *in-vivo*.

Pada penelitian Saidi (2026), ketoksikan ML-AgNPs dievaluasi untuk menentukan profil keamanannya sebagai agen antimikroba. Hasil pengujian menunjukkan respons yang bergantung pada konsentrasi dengan nilai LC_{50} sebesar 20,1 mg/mL. Berdasarkan indeks toksisitas Meyer, suatu zat diklasifikasikan sebagai non-toksik jika memiliki nilai LC_{50} di atas 1 mg/mL. Rendahnya tingkat ketoksikan ini

kemungkinan besar disebabkan oleh penggunaan metode sintesis hijau, di mana senyawa fitokimia dari ekstrak daun melinjo berfungsi sebagai agen pelapis (*capping agent*) alami yang meningkatkan biokompatibilitas nanopartikel. ML-AgNPs menunjukkan potensi keamanan dan non-toksik, sehingga memiliki potensi untuk diaplikasikan dalam sistem keamanan pangan.



BAB III METODE PENELITIAN

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

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada proses penelitian ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu bahan utama dan bahan analisis. Bahan utama yang digunakan adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) tua berwarna hijau tua yang didapatkan dari Taman Pertanian Putra, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia (Gambar 13) dan bahan penunjang yaitu tahu yang dibeli dari The Centrum Mall, Serdang, Selangor, Malaysia.



Gambar 13. Daun Melinjo Tua (*G. gnemon* L.)

Adapun bahan analisis yang digunakan, sebagai berikut: Etanol absolut 99,5%, air destilasi (*Distilled water*), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Insitute of Bioscience, UPM, Serdang, Selangor, Malaysia), *Chlorhexidine* (CHX) (Oxoid Ltd., United Kingdom), *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Oxoid Ltd., United Kingdom), *Silver Nitrate Solution* (AgNO_3) (Smart-Lab., Selangor, Malaysia), *Muller-Hinton Broth* (MHB) (Oxoid Ltd., United Kingdom), *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid Ltd.,

United Kingdom), garam buffer fosfat (Hampshire, England), dan pembanding (Standar McFarland 0,5).

Bakteri uji diperoleh dari American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) dan disimpan di Laboratory of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Universiti Putra Malaysia. Bakteri uji yang digunakan meliputi:

Tabel 2. Strain Bakteri Uji

Strain Bakteri	Sumber
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 14884
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581

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

3.1.2. Alat

Peralatan yang digunakan meliputi: pisau, oven, *Electric Oven Dryer YXD2A BDO-10* (Shanghai Yiheng Scientific Instruments Co., Ltd., China), blender (*Panasonic MK-5087M*, Panasonic Corporation, Osaka, Jepang), penggaris, *hand sealer machine*, plastik, botol steril, *universal bottle*, refrigerator, neraca digital (*Mettler Toledo*, Ohio, USA), *A&D MX-50 moisture analyser* (A&D Co. Ltd., Tokyo, Japan), *CR400 Chroma meter* (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan), *3510 Jenway pH meter* (Cole-Parmer Instrument Co., Staffordshire, United Kingdom), *Aqualab Water Activity Analyzer* (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA), *tarred dish*, kertas saring *Whatman No. 2* steril (Whatman International Ltd., Middlesex, Inggris), erlenmeyer, corong, labu Buchner, labu didih, pompa aspirator (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Jepang), *Rotary Vacuum Evaporator Heidolph Laborota 4000* (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Jerman), *C24 incubator shaker* (Edison, NJ, USA), inkubator, autoclave, cawan Petri, *cotton bud*, mikropipet (10 µL, 100 µL, 1000 µL), *pipette tips* (10 µL, 100 µL, 1000 µL), *glass Pasteur pipette* 6 mm, *magnetic stirrer*, *96 well plate*, pinset, *Eppendorf tube*, *media plate*, *vortex*, dan aluminium foil.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan melalui tiga tahapan utama, yaitu:

Tahap I. Pembuatan Sampel

Tahap ini terdiri dari 2 prosedur, yaitu analisis fisikokimia bubuk daun melinjo dan pembuatan ekstrak daun melinjo dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 99,6%.

Tahap II. Sintesis ML-AgNPs dan Uji Aktivitas Antibakteri

Tahap ini terdiri atas 4 proses, yaitu proses sintesis hijau nanopartikel perak yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs). *Well Diffusion Assay* (WDA) untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) untuk menentukan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus spp.*, serta *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) untuk menentukan konsentrasi terendah yang mampu membunuh *Bacillus spp.*

Tahap III. Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu

Tahap ini dilakukan dengan perendaman sampel tahu dalam larutan ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs pada konsentrasi tertentu sebagai perlakuan antimikroba. Selanjutnya, dilakukan analisis jumlah mikroba menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk mengevaluasi pertumbuhan *Bacillus spp.* selama penyimpanan.

3.2.2. Respon Pengujian

Respon atau parameter yang diukur dalam penelitian ini meliputi:

Tahap I. Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo dan Ekstrak Daun Melinjo

Parameter yang dianalisis meliputi kadar air (%), aktivitas air (a_w), nilai pH, warna (nilai L^* , a^* , b^*), dan rendemen ekstrak daun melinjo.

Tahap II. Sintesis ML-AgNPs dan Uji Aktivitas Antibakteri

Parameter yang diamati meliputi:

1. Sintesis ML-AgNPs

2. *Well Diffusion Assay* (WDA), yaitu pengukuran diameter zona hambat (mm) yang terbentuk di sekitar sumuran sebagai indikator aktivitas antibakteri.
3. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), yaitu konsentrasi terendah ekstrak daun melinjo atau ML-AgNPs yang mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus spp.*, ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada media uji.
4. *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), yaitu konsentrasi terendah ekstrak daun melinjo atau ML-AgNPs yang mampu membunuh *Bacillus spp.*, ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada media agar.

Tahap III. Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu

Parameter yang dianalisis adalah jumlah total mikroba menggunakan metode Total Plate Count (TPC) selama masa penyimpanan. Hasil dinyatakan dalam satuan Log_{10} CFU/g.

3.2.3. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan pendekatan kuantitatif, meliputi statistik deskriptif, analisis varians (ANOVA), dan uji lanjut menggunakan metode Tukey untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antar perlakuan. Seluruh pengolahan data dilakukan menggunakan perangkat lunak Minitab dan Microsoft Excel.

Statistik deskriptif digunakan untuk menggambarkan karakteristik data melalui parameter numerik seperti nilai rata-rata (mean) dan standar deviasi (SD). Analisis ini bertujuan memberikan gambaran awal mengenai distribusi dan kecenderungan data sebelum dilakukan pengujian hipotesis secara inferensial.

Untuk mengevaluasi pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati, digunakan analisis varians dua arah (Two-Way ANOVA). Analisis ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh faktor konsentrasi dan suhu penyimpanan, serta interaksi antara kedua faktor tersebut terhadap jumlah mikroba pada tahu. Apabila

hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Tukey pada tingkat signifikansi 5% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan secara spesifik. Seluruh hasil pengujian disajikan dalam bentuk nilai rata-rata \pm standar deviasi dari pengulangan percobaan yang dilakukan.

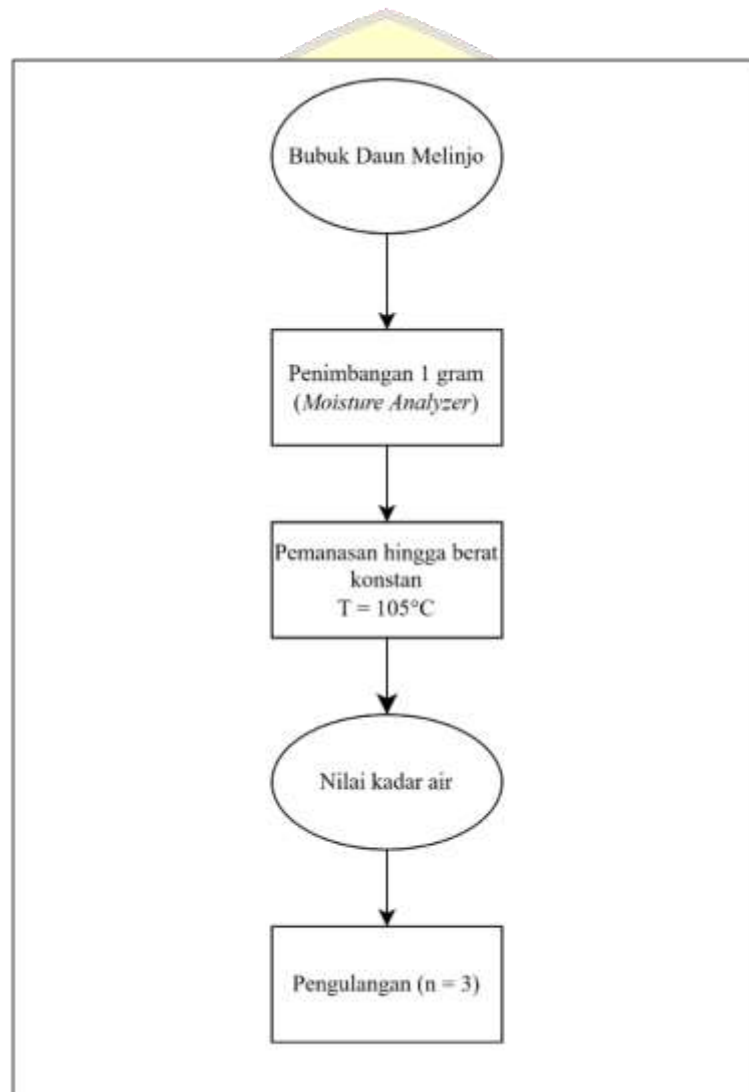


3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo

3.3.1.1. Penentuan Kadar Air

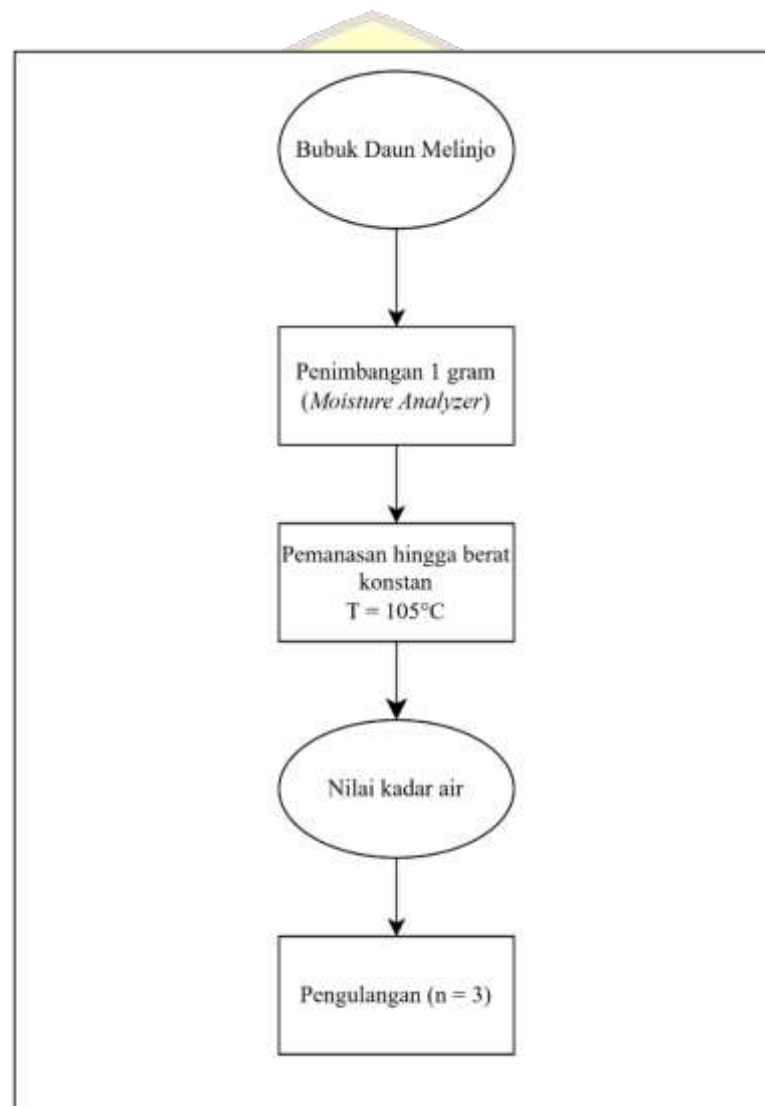
1. Sebanyak 1 gram bubuk daun melinjo ditimbang menggunakan moisture analyzer (A&D MX-50, A&D Co. Ltd., Tokyo, Japan).
2. Sampel dipanaskan pada suhu 105°C hingga mencapai berat konstan.
3. Nilai kadar air dinyatakan dalam persen (%) berdasarkan selisih bobot sebelum dan sesudah pemanasan.
4. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Secara skematik disajikan pada Gambar 14.



Gambar 14. Diagram Alir Prosedur Penentuan Kadar Air

3.3.1.2. Penentuan Aktivitas Air

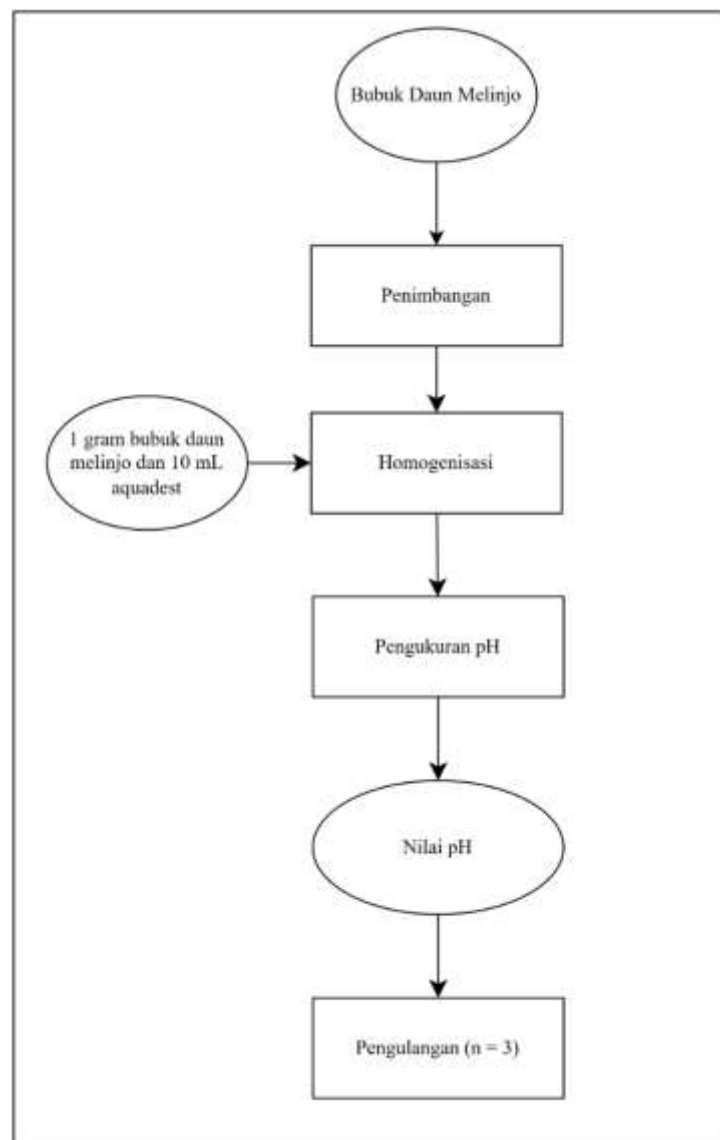
1. Bubuk daun melinjo dimasukkan ke dalam cawan sampel pada alat Aqualab Water Activity Analyzer (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA).
2. Sampel diratakan hingga menutupi dasar cawan secara merata.
3. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang hingga diperoleh pembacaan yang stabil.
4. Nilai aktivitas air (a_w) yang ditampilkan pada alat dicatat.
5. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Secara skematik disajikan pada Gambar 15.



Gambar 15. Diagram Alir Prosedur Penentuan Aktivitas Air

3.3.1.3. Pengukuran pH

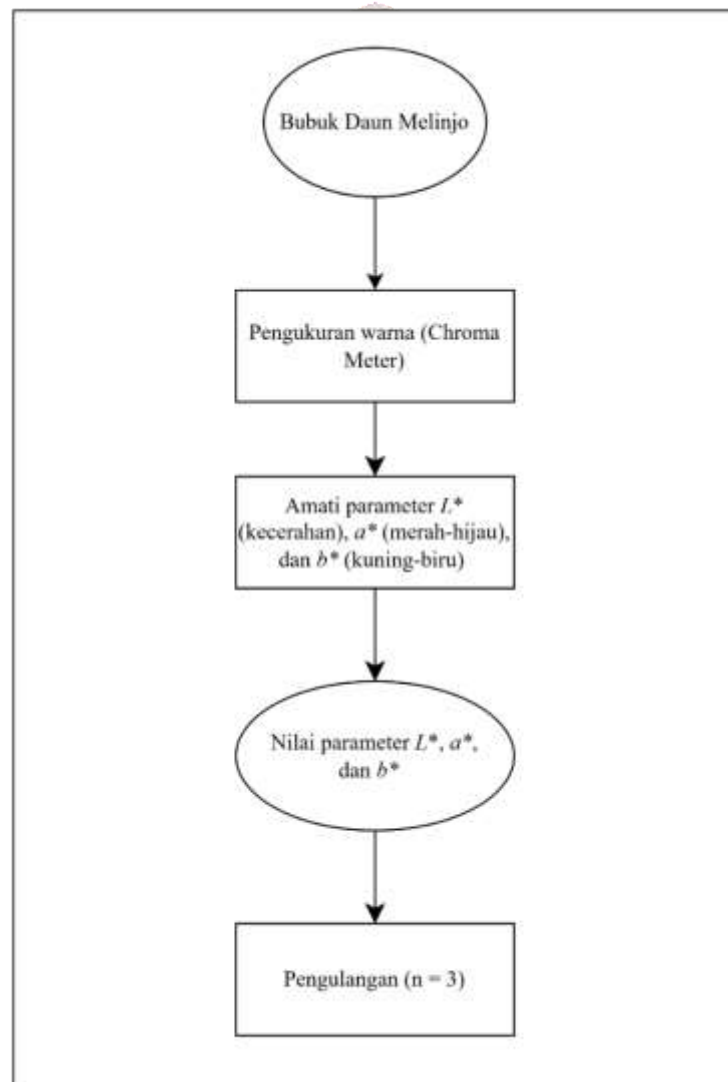
1. Sebanyak 1 gram bubuk daun melinjo ditimbang dan ditambahkan 10 mL air destilasi, kemudian dihomogenkan sehingga terbentuk suspensi yang merata.
2. Nilai pH diukur menggunakan pH meter (3510 Jenway pH meter, Cole-Parmer Instrument Co., Staffordshire, United Kingdom) yang telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer standar pH 4,0 dan 7,0.
3. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Secara skematik disajikan pada Gambar 16.



Gambar 16. Diagram Alir Prosedur Penentuan Nilai pH

3.3.1.4. Analisis Warna

1. Bubuk daun melinjo ditempatkan pada permukaan datar dan diratakan untuk memastikan homogenitas permukaan sampel.
2. Pengukuran warna dilakukan menggunakan CR400 Chroma Meter (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan).
3. Parameter warna yang diamati meliputi nilai L^* (kecerahan), a^* (intensitas merah-hijau), dan b^* (intensitas kuning-biru).
4. Setiap pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk memperoleh nilai rata-rata yang representatif. Secara skematik disajikan pada Gambar 17.



Gambar 17. Diagram Alir Prosedur Pengukuran Warna

3.3.2. Ekstraksi Daun Melinjo

1. Penimbangan Sampel

Sebanyak 50 gram bubuk daun melinjo ditimbang menggunakan neraca digital sebagai bahan untuk proses ekstraksi.

2. Proses Ekstraksi (Maserasi)

Bubuk daun melinjo sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 200 mL etanol 99,6% dengan rasio 1:4 (b/v). Campuran ditutup menggunakan aluminium foil untuk mencegah penguapan pelarut, kemudian dimaserasi pada suhu 30°C selama 24 jam menggunakan incubator shaker dengan kecepatan 70 rpm untuk memastikan proses difusi dan pelarutan senyawa bioaktif berlangsung optimal.

3. Penyaringan

Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring menggunakan corong kaca dan kertas saring Whatman No. 1 dengan bantuan pompa aspirator untuk memisahkan filtrat dari residu padatan. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan untuk tahap pemekatan.

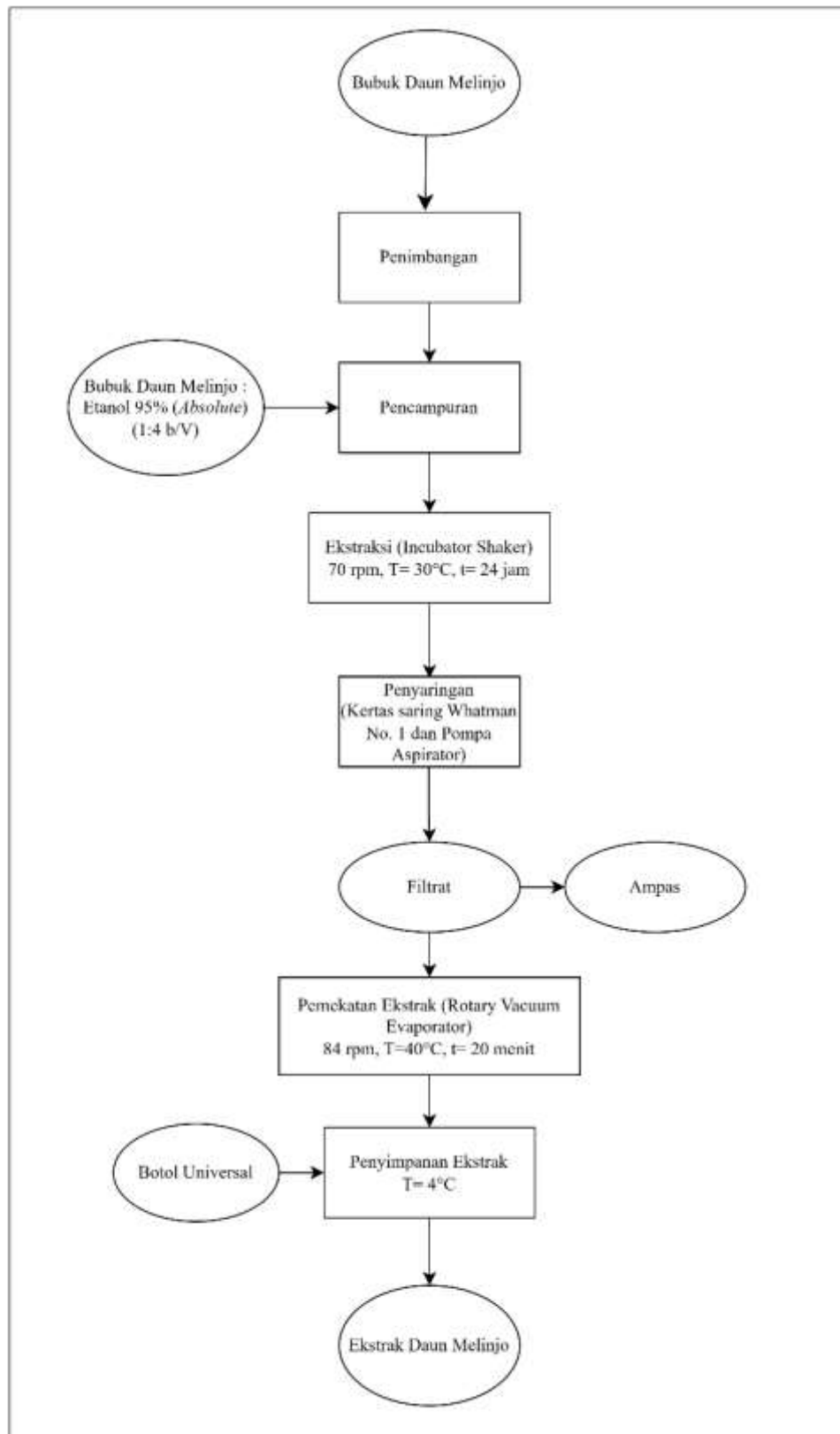
4. Pemekatan Ekstrak

Filtrat diuapkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 40°C dengan kecepatan 84 rpm selama 20 menit hingga diperoleh ekstrak kental daun melinjo. Proses ini dilakukan untuk menghilangkan pelarut etanol dan memperoleh ekstrak terkonsentrasi.

5. Penyimpanan Ekstrak

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang, kemudian dipindahkan ke dalam botol universal steril dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan untuk tahap sintesis nanopartikel dan pengujian selanjutnya. Skema proses ditunjukkan pada Gambar 18. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut:

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



Gambar 18. Diagram Alir Ekstraksi Daun Melinjo

3.3.3. Sintesis Hijau Nanopartikel Perak (ML-AgNPs)

1. Pembuatan Ekstrak Daun Melinjo 10%

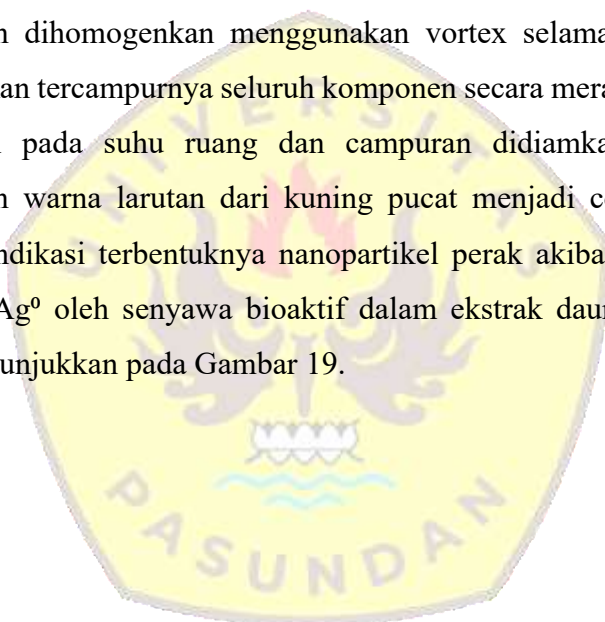
Ekstrak kasar bubuk daun melinjo ditimbang sebesar 1 gram dan ditambahkan pelarut DMSO 10% sebanyak 10 gram, kemudian diaduk dan dihasilkan ekstrak daun melinjo 10%.

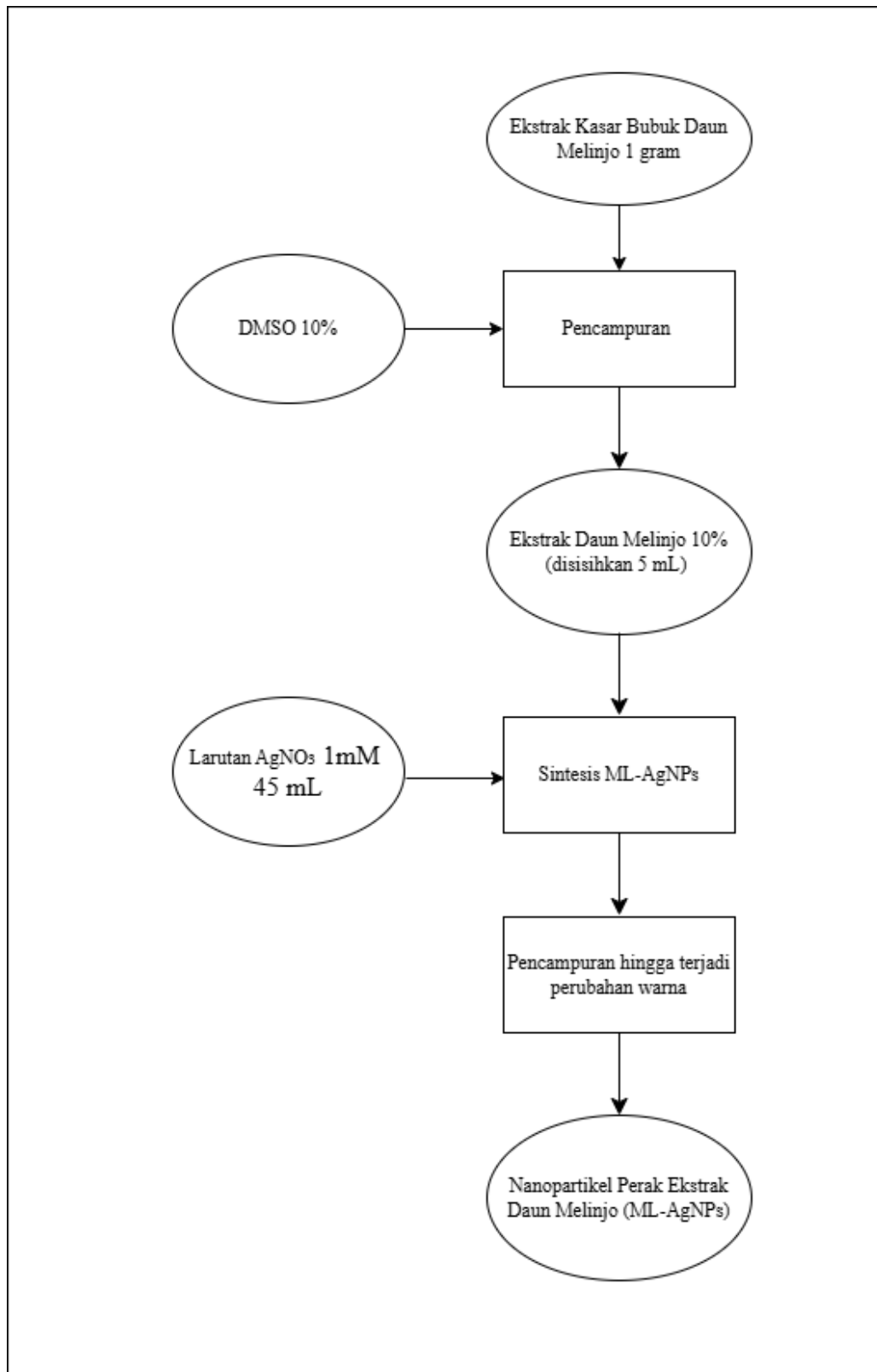
2. Persiapan Reagen

Sebanyak 5 mL larutan ekstrak daun melinjo konsentrasi 10% dicampurkan dengan 45 mL larutan perak nitrat (AgNO_3) 1 mM di dalam universal bottle steril, sehingga diperoleh rasio campuran 1:9 (v/v).

3. Proses Sintesis ML-AgNPs

Campuran dihomogenkan menggunakan vortex selama ± 1 menit untuk memastikan tercampurnya seluruh komponen secara merata. Proses sintesis dilakukan pada suhu ruang dan campuran didiamkan hingga terjadi perubahan warna larutan dari kuning pucat menjadi coklat kemerahan sebagai indikasi terbentuknya nanopartikel perak akibat reduksi ion Ag^+ menjadi Ag^0 oleh senyawa bioaktif dalam ekstrak daun melinjo. Skema proses ditunjukkan pada Gambar 19.

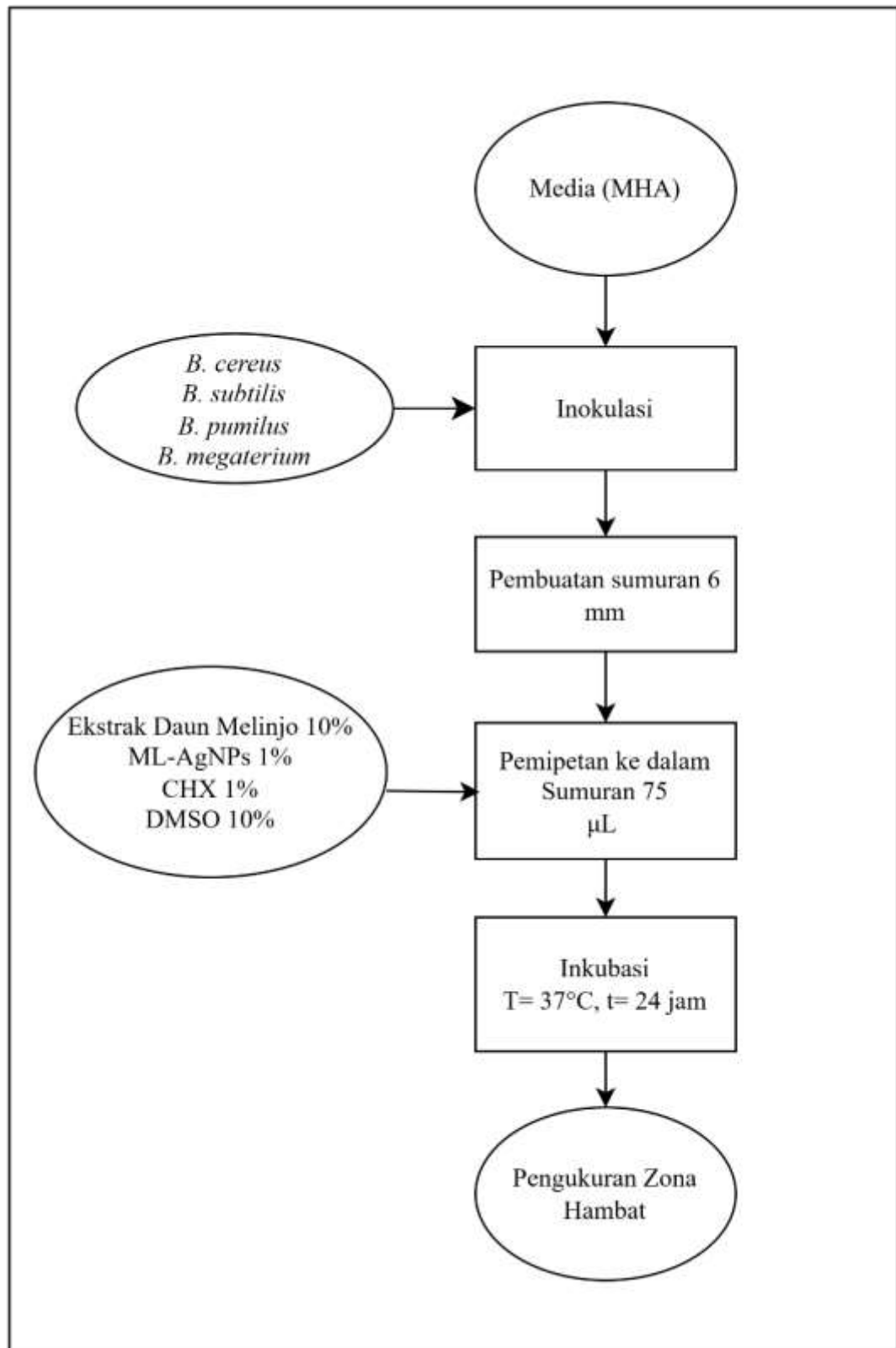




Gambar 19. Diagram Alir Prosedur Pembuatan Sintesis Hijau Nanopartikel Perak Daun Melinjo

3.3.4. Prosedur Well Diffusion Assay (WDA)

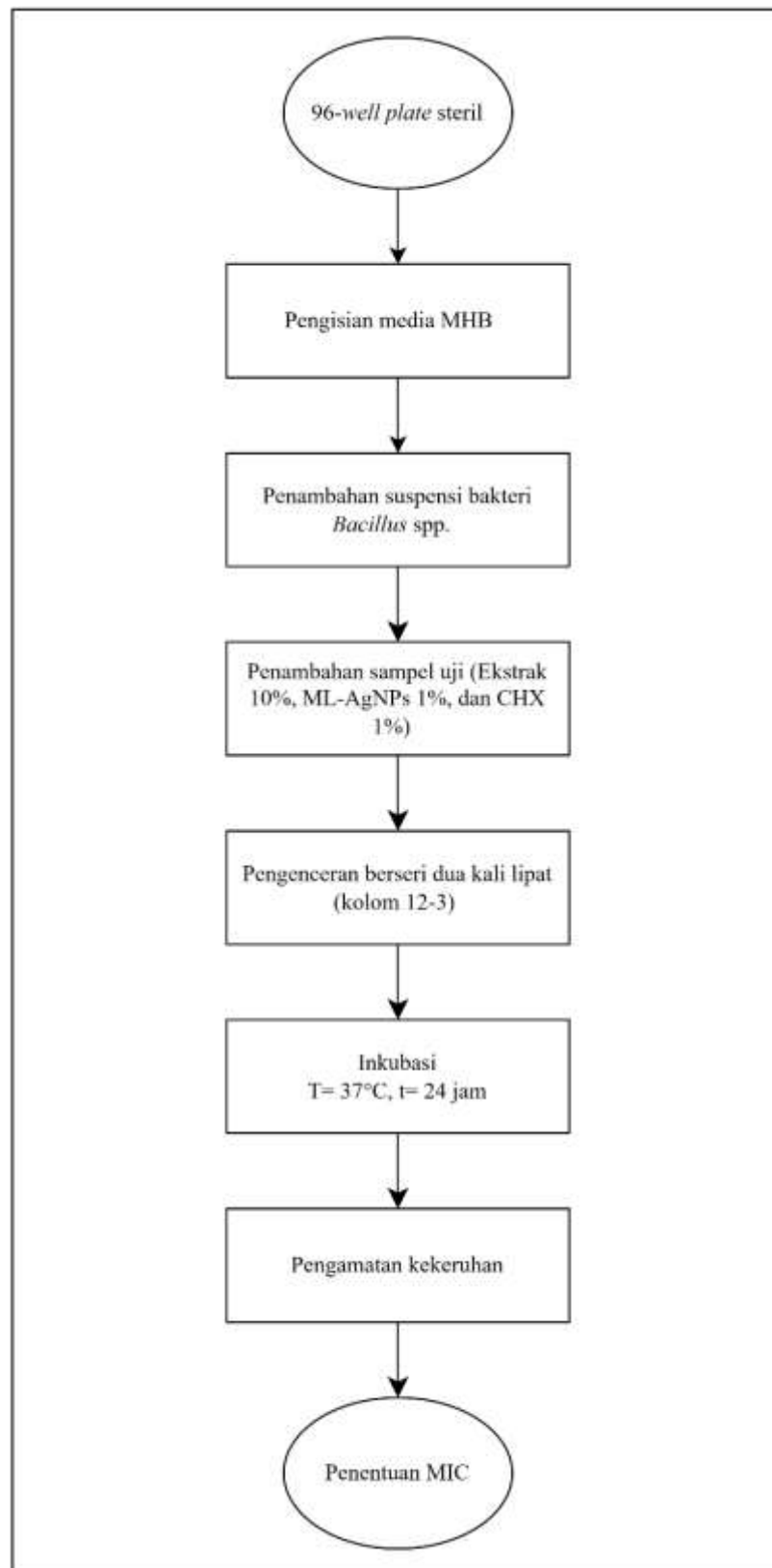
1. Media Mueller-Hinton Agar (MHA) disiapkan dan dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dibiarkan memadat. Larutan chlorhexidine (CHX) 1% digunakan sebagai kontrol positif dan larutan Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% sebagai kontrol negatif. Sampel uji yang digunakan meliputi ML-AgNPs konsentrasi 1% dan ekstrak daun melinjo konsentrasi 10%. Bakteri uji yang digunakan adalah *B. cereus* ATCC 33019, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* ATCC 14884, dan *B. megaterium* ATCC 14581.
2. Isolat bakteri diinokulasikan secara merata pada permukaan media MHA menggunakan cotton bud steril.
3. Sumuran dengan diameter ± 6 mm dibuat pada media yang telah diinokulasi menggunakan glass Pasteur pipette steril. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 75 μ L sampel uji. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak tiga ulangan (tiga sumuran). Satu sumuran diisi dengan DMSO 10% sebagai kontrol negatif dan satu sumuran lainnya diisi dengan CHX 1% sebagai kontrol positif.
4. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Setelah inkubasi, diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur menggunakan penggaris dalam satuan milimeter (mm) sesuai dengan pedoman CLSI (2012). Skema proses ditunjukkan pada Gambar 20.



Gambar 20. Diagram Alir Well Diffusion Assay (WDA)

3.3.5. Prosedur *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

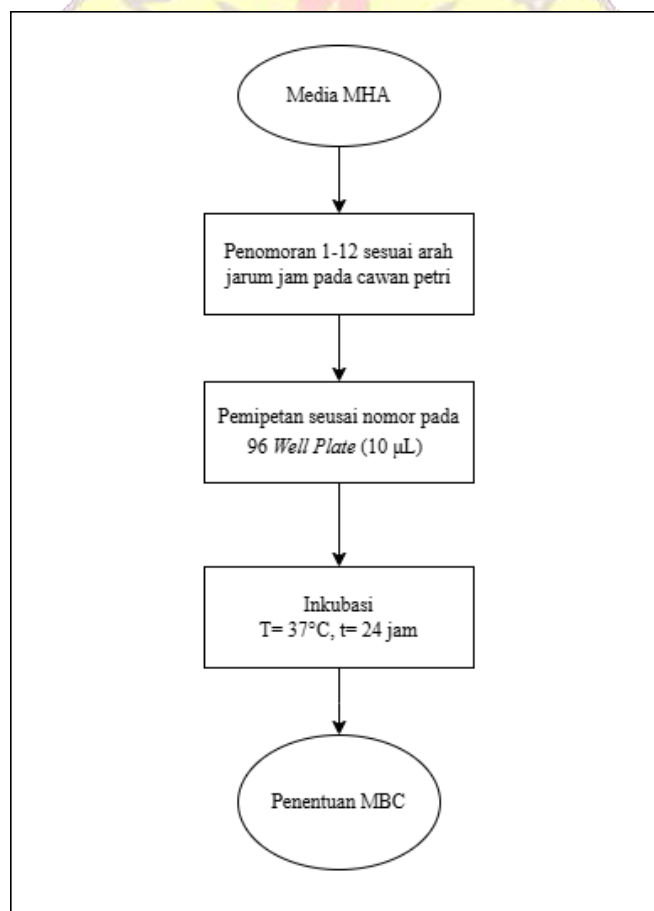
1. Uji MIC dilakukan menggunakan microplate 96-sumur steril dengan sampel uji berupa ekstrak daun melinjo konsentrasi 10% dan ML-AgNPs konsentrasi 1%. Setiap plate terdiri atas kontrol negatif (100 μ L MHB tanpa bakteri), kontrol positif (100 μ L MHB + 100 μ L inokulum bakteri), dan sumur perlakuan.
2. Media Mueller-Hinton Broth (MHB) steril sebanyak 100 μ L dimasukkan ke setiap sumur.
3. Suspensi bakteri ditambahkan sebanyak 100 μ L ke dalam sumur kolom 12 hingga kolom 2.
4. Sebanyak 100 μ L sampel uji dengan konsentrasi tertinggi dimasukkan ke kolom 12, kemudian dilakukan pengenceran berseri dua kali lipat (*two-fold serial dilution*) hingga kolom 3 untuk memperoleh variasi konsentrasi yang lebih rendah. Dengan demikian, setiap sumur perlakuan mengandung 100 μ L sampel dan 100 μ L inokulum bakteri dengan total volume 200 μ L.
5. Pada baris terpisah, prosedur yang sama dilakukan menggunakan 100 μ L larutan chlorhexidine (CHX) sebagai kontrol positif antibiotik.
6. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Setelah inkubasi, hasil diamati secara visual. Nilai MIC ditentukan sebagai konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan kekeruhan (tidak terdapat pertumbuhan bakteri). Skema proses ditunjukkan pada Gambar 21.



Gambar 21. Diagram Alir Metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

3.3.6. Prosedur *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

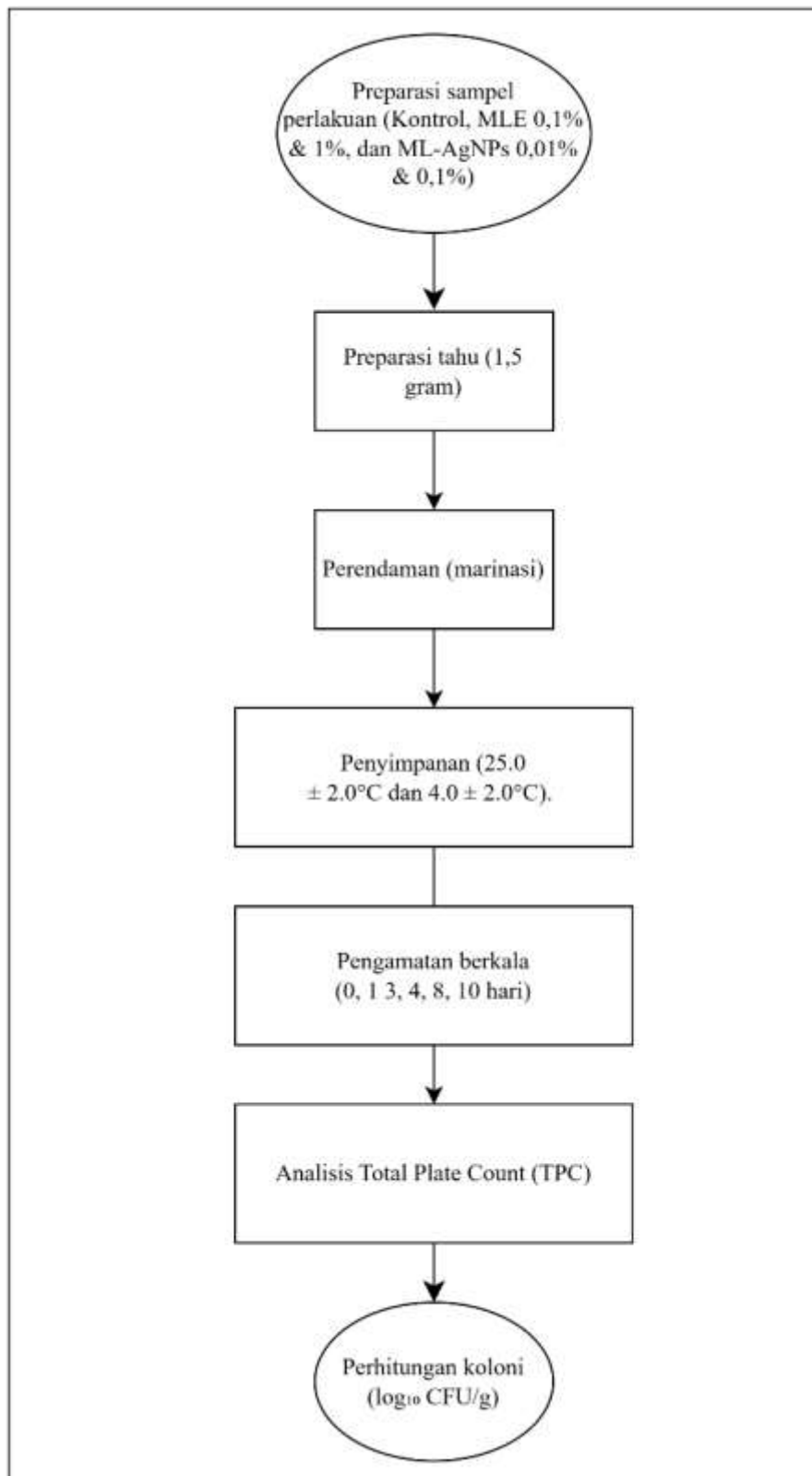
1. Media Mueller-Hinton Agar (MHA) disiapkan dan dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dibiarkan memadat.
2. Bagian belakang cawan petri diberi penandaan sesuai nomor kolom pada *96-well plate* (1–12) untuk mempermudah identifikasi perlakuan.
3. Sebanyak 10 μL suspensi dari setiap sumur pada pelat MIC dipipet dan diinokulasikan secara terpisah ke permukaan media MHA sesuai dengan nomor masing-masing.
4. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Setelah inkubasi, pertumbuhan koloni diamati secara visual. Nilai MBC ditentukan sebagai konsentrasi terendah dari sampel yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media MHA, sesuai dengan pedoman CLSI (2012). Skema proses ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Diagram Alir Metode *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

3.3.7. Prosedur Aplikasi Ekstrak Daun Melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu

1. Sampel perlakuan disiapkan dengan variasi konsentrasi sebagai berikut: kontrol (0%), ekstrak daun melinjo 0,1%, ekstrak daun melinjo 1%, ML-AgNPs 0,01%, dan ML-AgNPs 0,1%.
2. Tahu dipotong menjadi bagian dengan berat $\pm 1,5$ gram per sampel, kemudian masing-masing ditempatkan dalam wadah steril.
3. Setiap potongan tahu direndam (marinasi) dalam larutan sesuai dengan konsentrasi perlakuan masing-masing selama waktu yang ditentukan hingga seluruh permukaan tahu terendam secara merata.
4. Sampel kemudian disimpan selama 10 hari pada dua kondisi suhu, yaitu suhu ruang ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) dan suhu pendinginan ($4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$).
5. Pengamatan dilakukan pada waktu penyimpanan 0 jam, 1 hari, 3 hari, 4 hari, 8 hari, dan 10 hari. Analisis total mikroba dilakukan menggunakan metode Total Plate Count (TPC) pada media Plate Count Agar (PCA).
6. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter dan dinyatakan dalam satuan Log_{10} CFU/g (Yusoff et al., 2015). Skema proses ditunjukkan pada Gambar 23.



Gambar 23. Aplikasi Ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap Tahu

BAB IV PEMBAHASAN

Bab ini menguraikan mengenai: (4.1.) Penelitian Tahap I “Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo dan Hasil Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)”, (4.1.1.) Analisis fisikokimia bubuk daun Melinjo (*G. gnemon* L.), (4.1.2.) Ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.), (4.2.) Penelitian Tahap II “Proses Sintesis ML-AgNPs dan Aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) dan ML-AgNPs”, (4.2.1.) Proses Sintesis ML-AgNPs, (4.2.2.) Well Diffusion Assay (WDA), (4.2.3.) Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC), (4.3.) Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Bubuk Daun Melinjo (*G. gnemon* L.) dan ML-AgNPs terhadap Tahu Selama Penyimpanan”, (4.3.1.) Pengaruh ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), (4.3.2.) Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), (4.3.3.) Pengaruh ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), dan (4.3.4.) Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).

4.1. Penelitian Tahap I “Analisis Fisikokimia Bubuk Daun Melinjo dan Hasil Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)”

4.1.1. Analisis fisikokimia bubuk daun Melinjo (*G. gnemon* L.)

Pada penelitian ini, bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.) (Gambar 24) dilakukan analisis dengan parameter fisik dan kimia. Cakupan analisis yang dilakukan pada bubuk daun melinjo yaitu analisis warna, kadar air, pH, dan aktivitas air (a_w). Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L)

Karakteristik fisikokimia bubuk daun melinjo (<i>G. gnemon</i> L.)		Nilai
Warna	L^*	$41,390 \pm 0,940$
	a^*	$-3,390 \pm 0,010$
	b^*	$10,020 \pm 0,660$
Kadar Air (%)		$7,720 \pm 0,320$
pH		$5,940 \pm 0,010$
Aktivitas Air (a_w)		$0,580 \pm 0,002$

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

4.1.1.1. Warna bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.)

Analisis warna bubuk daun melinjo didasarkan pada nilai L^* (*Lightness*), a^* (*Redness/Greenish*), dan b^* (*Yellowness/Blueness*). Menurut Fitriani et al. (2021) parameter L^* menunjukkan tingkat kecerahan sampel dengan rentang dari nilai 0 hingga 100 yang menunjukkan kecenderungan warna cerah. Parameter a^* menunjukkan spektrum warna dari hijau (nilai negatif) hingga merah (nilai positif). Adapun parameter b^* menunjukkan spektrum warna dari biru (nilai negatif) hingga kuning (nilai positif).

Berdasarkan Tabel 4, didapatkan hasil analisis warna dengan nilai L^* $41,39 \pm 0,94$ yang menunjukkan bahwa bubuk daun melinjo memiliki tingkat kecerahan yang relatif rendah atau cenderung gelap. Nilai a^* dengan hasil negatif (-3.39) mengindikasikan kecenderungan warna hijau, sedangkan nilai b^* positif (10.02) menunjukkan adanya dominasi warna kuning. Menurut Mardiana (2025), warna hijau yang cenderung gelap ini menunjukkan adanya pigmen klorofil dan senyawa fenolik pada daun melinjo. Senyawa fenolik ini memiliki peran sebagai donor elektron dalam proses reduksi ion Ag^+ menjadi Ag^0 pada sintesis nanopartikel perak.



Gambar 24. Bubuk Daun Melinjo

4.1.1.2. Kadar air bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.)

Pada tabel 4 disajikan data hasil analisis kadar air bubuk daun melinjo yaitu $7,72 \pm 0,32\%$, angka tersebut telah memenuhi syarat kualitas simplisia. Menurut Soetarno dan Soediro (1997), yang menyatakan bahwa kadar air simplisia sebaiknya tidak boleh melebihi 10% untuk mencegah kontaminasi kapang dan degradasi enzimatik. Kadar air yang rendah berperan penting dalam menjaga stabilitas senyawa bioaktif dengan menurunkan aktivitas enzimatik dan pertumbuhan mikroorganisme selama penyimpanan. Selain itu, kandungan air yang terdapat dalam bahan pangan juga dapat mempengaruhi penampakan, kesegaran, dan daya tahan pada bahan pangan (Winarno, 2008).

4.1.1.3. pH bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.)

Berdasarkan tabel 4, bubuk daun melinjo menunjukkan nilai pH sebesar $5,94 \pm 0,01$. Nilai ini berada dibawah nilai pH netral (7.0), sehingga dapat dikategorikan bahwa bubuk daun melinjo tersebut tergolong asam. Nilai pH yang rendah dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim yang berakibat pada penurunan jumlah pertumbuhan bakteri (Pelczar et al, 1988).

4.1.1.4. Aktivitas air bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.)

Bubuk daun melinjo memiliki aktivitas air (a_w) sebesar $0,580 \pm 0,002$. Jumlah air bebas (a_w) pada produk pangan biasanya digunakan oleh organisme mikro seperti kapang, khamir, dan bakteri untuk tumbuh serta meningkatkan kemungkinan terjadinya reaksi kimia maupun enzimatis selama masa penyimpanan (Eskin dan Robinson, 2010). Adapun range nilai aktivitas air yaitu 0 – 1, dimana semakin besar nilai aktivitas air maka semakin kecil daya tahan bahan pangan; begitupun sebaliknya semakin kecil nilai aktivitas air maka semakin lama daya simpan bahan pangan. Setiap Mikroorganisme memiliki nilai a_w minimal untuk dapat tumbuh dengan baik, di antaranya nilai a_w pada bakteri yaitu 0,90; pada khamir yaitu 0,80 – 0,90; dan pada kapang 0,60 – 0,70. (Leviana dan Paramita, 2017).

4.1.2. Ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.)

Pada pembuatan ekstrak daun melinjo digunakan 50 gram bubuk daun melinjo, kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol absolut 99,5%. Penggunaan pelarut etanol pada proses ekstraksi ini didasarkan pada sifatnya yang polar, sehingga efektif untuk menarik senyawa fenolik dan flavoid dari jaringan tanaman (Hakim dan Saputri, 2020). Pada Tabel 5, diperoleh hasil dari proses ekstraksi bubuk daun melinjo. Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa ekstrak memiliki warna hijau gelap dan kental, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. Ekstrak Daun Melinjo

Tabel 5. Hasil ekstrak daun melinjo

Sampel bubuk daun melinjo	50 g
Pelarut ekstrak	200 mL
Hasil ekstrak yang didapat	4,41 g
Persentase hasil ekstrak	8,82%

Proses ekstraksi menggunakan sampel bubuk daun melinjo (*G. gnemon* L.) sebanyak 50 gr dan etanol 99,5% 200 mL menghasilkan ekstrak daun melinjo yang kental dan berwarna hijau gelap dengan berat 4,41 gr atau rendemen sebesar 8,82%. Rendemen yang dihasilkan lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Tarigan et al. (2019), yang mencapai 13,83%. Perbedaan hasil rendemen dipengaruhi oleh jenis pelarut, konsentrasi pelarut, ukuran simplisia, dan waktu

ekstraksi (Suryanto, 2009). Meskipun rendemen lebih rendah, penggunaan etanol absolut tetap dianggap efektif, karena mampu menghasilkan ekstrak kental yang kaya akan senyawa fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, dan tanin yang memiliki potensi antibakteri (Yasni et al., 2009).

4.2. Penelitian Tahap II “Aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) dan ML-AgNPs”

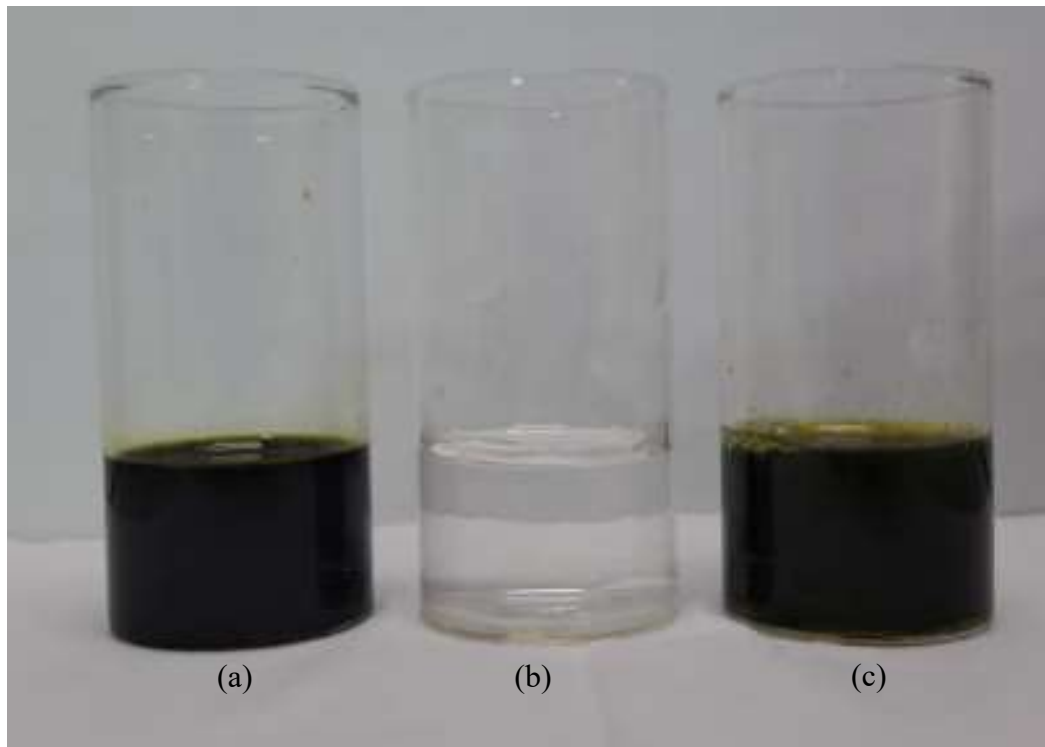
Penelitian tahap II terdiri dari Sintesis ML-AgNPs, *Well Diffusion Assay* (WDA), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC).

4.2.1. Sintesis ML-AgNPs

Sintesis nanopartikel perak berbasis ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs) dilakukan menggunakan metode *green synthesis*. Dalam proses ini, larutan perak nitrat (AgNO_3) berperan sebagai prekursor yang menyediakan ion perak (Ag^+), yang kemudian direduksi menjadi perak elemental (Ag^0) oleh senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun melinjo (Pooley, 1982). Senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan senyawa fenolik diketahui memiliki kemampuan sebagai donor elektron dalam proses reduksi tersebut. Selain berperan sebagai agen pereduksi, senyawa bioaktif dalam ekstrak daun melinjo juga berfungsi sebagai *capping agent* yang membantu menstabilkan nanopartikel agar tetap berada dalam ukuran nano dan tidak mengalami agregasi berlebihan (Ahmad et al., 2024).

Indikasi keberhasilan sintesis ML-AgNPs ditandai dengan adanya perubahan warna larutan setelah penambahan ekstrak daun melinjo ke dalam larutan AgNO_3 . Semakin tinggi konsentrasi AgNO_3 maka semakin terlihat perubahan warna yang signifikan (Rashid et al., 2014). Larutan yang semula berwarna hijau berubah menjadi coklat atau kecoklatan, yang merupakan indikator terbentuknya nanopartikel perak. Perubahan warna ini berkaitan dengan fenomena *Surface Plasmon Resonance* (SPR), yaitu interaksi antara elektron bebas pada permukaan nanopartikel dengan gelombang cahaya, yang menghasilkan karakteristik warna khas pada nanopartikel perak (Skiba et al., 2019).

Pada penelitian ini, ekstrak daun melinjo yang awalnya berwarna hijau tua pekat (Gambar 26a) setelah ditambahkan larutan AgNO_3 1 mM (Gambar 26b) mengalami perubahan warna menjadi hijau kecoklatan (Gambar 26c), yang mengindikasikan terbentuknya nanopartikel perak.



Gambar 26. Bahan sintesis ML-AgNPs, Ekstrak daun melinjo 10% (a), AgNO_3 1 mM (b), dan ML-AgNPs 1% (c)

4.2.2. Well Diffusion Assay (WDA)

Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan menggunakan metode *Well Diffusion Assay* (WDA) dengan dua perlakuan, yaitu 10% ekstrak daun melinjo dan 1% ML-AgNPs. Digunakan *Clorhexidin* 1% sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ditampilkan pada Tabel 6 dan Gambar 27.

Tabel 6. Zona penghambatan ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) dan ML-AgNPs terhadap bakteri genus *Bacillus*

Strain Bakteri	Rata-Rata Zona Hambat (mm)			
	MLE (10%)	ML-AgNPs (1%)	CHX (1%)	DMSO (10%)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	11,17 ± 3,55 ^a	12,17 ± 1,53 ^a	7,50 ± 0,00	NA
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6,83 ± 0,28 ^a	12,83 ± 4,04 ^a	8,00 ± 0,00	NA
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	12,67 ± 2,56 ^a	12,33 ± 1,04 ^a	8,00 ± 0,00	NA
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	11,33 ± 4,54 ^a	11,83 ± 0,57 ^a	7,50 ± 0,00	NA

Keterangan:

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

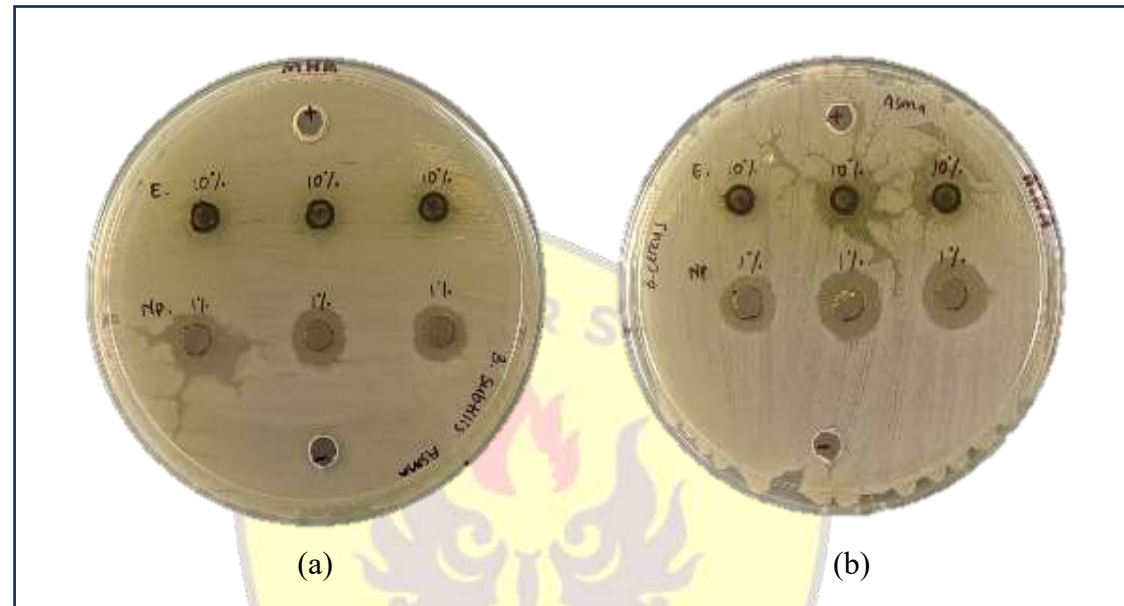
MLE: Melinjo *Leaf Extract*

ML-AgNPS: Melinjo *Leaf Silver Nanoparticles*

NA: No Active (tidak ada hambatan)

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

Nilai rata-rata ± standar deviasi dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan (p<0,05).



Gambar 27. Zona hambat kontrol positif (CHX), kontrol negatif (DMSO), ekstrak daun melinjo 10%, dan ML-AgNPs 1%; *Bacillus subtilis* (a), *Bacillus cereus* (b).

Berdasarkan analisis statistik, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara perlakuan ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs terhadap diameter zona hambat pada masing-masing bakteri uji.

Zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran menunjukkan adanya daya hambat pertumbuhan bakteri dengan diameter berkisar $6,83 \pm 0,28$ mm hingga $12,83 \pm 4,04$ mm. Pada perlakuan 1% ML-AgNPs memberikan efek penghambatan paling kuat terhadap *B. subtilis* dengan diameter $12,83 \pm 4,04$ mm, kemudian *B. cereus* ($12,17 \pm 1,53$ mm), *B. pumilus* ($12,33 \pm 1,04$ mm), dan *B. megaterium* ($11,83 \pm 0,57$ mm). Sementara itu, 10% ekstrak daun melinjo juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik, dengan daya hambat tertinggi terhadap *B. pumilus* ($12,67 \pm 2,56$ mm), lalu *B. megaterium* ($11,33 \pm 4,54$ mm) dan *B. cereus* ($11,17 \pm 3,55$ mm), dan *B. subtilis* ($6,83 \pm 0,28$ mm). Nilai zona hambat pada 1% CHX berkisar $7,5 \pm 0,00$ mm hingga $8,00 \pm 0,00$ mm, sedangkan 10% DMSO tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat (NA).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa baik ekstrak daun melinjo maupun ML-AgNPs memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri genus *Bacillus*, yang terlihat dari adanya variasi ukuran zona hambat yang terbentuk pada setiap bakteri uji. Perbedaan ukuran zona hambat tersebut menunjukkan adanya perbedaan respons terhadap perlakuan yang diberikan. Adanya zona hambat pada perlakuan ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs menunjukkan bahwa kedua bahan tersebut mengandung komponen aktif yang bersifat antibakteri. Sebaliknya, perlakuan DMSO tidak menunjukkan terbentuknya zona bening, sehingga dapat disimpulkan bahwa pelarut tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Aktivitas antibakteri tersebut diduga berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, dan saponin yang dapat merusak membran sel bakteri.

Beberapa studi menunjukkan efektivitas ekstrak daun melinjo dalam menghambat beberapa jenis bakteri, penelitian yang dilakukan oleh Tarigan et al (2019), bahwa variasi konsentrasi gel ekstrak daun melinjo efektif dalam menghambat *Staphylococcus aureus*, dihasilkan dengan zona hambat tertinggi mencapai 13,08

mm pada konsentrasi 80%. Penelitian lain yang dilakukan Arsanti dan Setiawan (2017) juga menemukan bahwa ekstrak etanol daun melinjo mampu membentuk zona hambat yang signifikan terhadap *Staphylococcus epidermidis* hingga 33,9 mm pada konsentrasi 75%. Dalam penelitian lain juga mengonfirmasi adanya aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* (Taroreh et al., 2016; Setiawan dan Widianti, 2018). Berdasarkan temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa daun melinjo memang memiliki senyawa bioaktif dengan spektrum antibakteri yang luas. Secara umum, bakteri Gram positif seperti genus *Bacillus* dan *Staphylococcus* memiliki kecenderungan yang lebih rentan terhadap senyawa antimikroba, karena struktur dinding sel Gram positif lebih sederhana sehingga senyawa antimikroba lebih mudah masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja (Pelczar dan Chan, 1988).



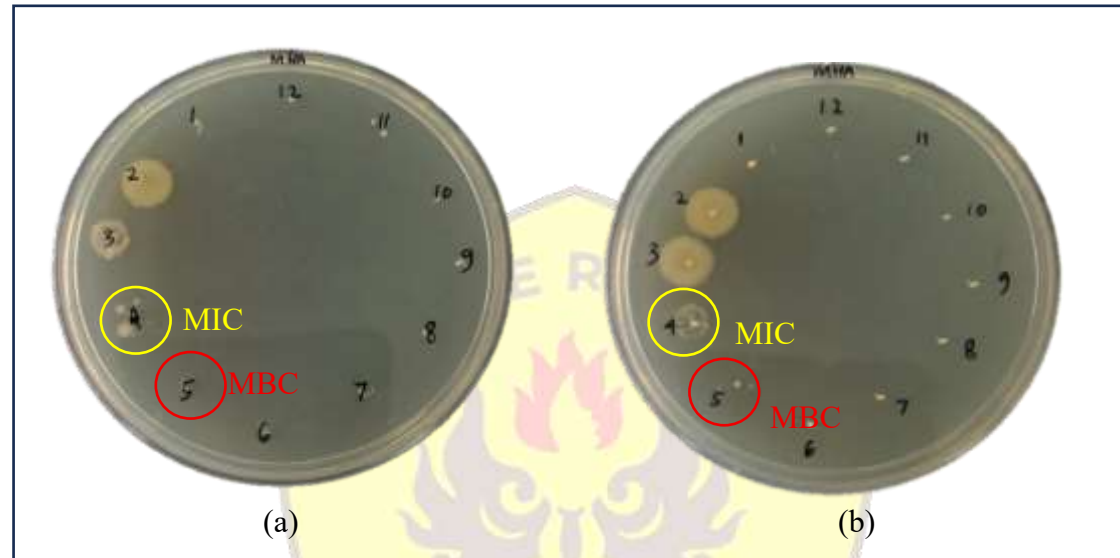
4.2.3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Nilai MIC adalah konsentrasi zat antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan MBC adalah konsentrasi zat antimikroba terendah yang mampu membunuh mikroorganisme (Elifah, 2010). Pada pengujian ini digunakan metode *two-fold microdilution*. Chlorhexidine (CHX) 1% digunakan sebagai kontrol positif. Hasil pengujian MIC dan MBC ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) konsentrasi 10% dan ML-AgNPs konsentrasi 1% disajikan pada Tabel 7 dan Gambar 28.

Tabel 7. MIC dan MBC ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.), ML-AgNPs, dan CHX terhadap bakteri genus *Bacillus*

Bacteria strains	MLE (10%)			ML-AgNPs (1%)			CHX (1%)			Enhancement MIC
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	keterangan	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	keterangan	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	keterangan	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	1,560	>50,00	bakterio statik	0,313	>5,00	bakterio statik	0,156	0,625	bakterio statik	5×
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1,560	50,00	bakterio statik	0,156	>5,00	bakterio statik	0,020	0,039	bakterio statik	10×
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	1,560	25,00	bakterio statik	0,313	>5,00	bakterio statik	0,020	0,039	bakterio statik	5×
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	1,560	>50,00	bakterio statik	0,313	>5,00	bakterio statik	0,039	0,078	bakterio statik	5×

Keterangan: ATCC: *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA); MIC = MBC: menunjukkan efek bakterisida; MIC > MBC: menunjukkan efek bakteriostatik; MIC < MBC: menunjukkan error pada penelitian.



Gambar 28. Hasil uji MIC dan MBC; *Bacillus subtilis* (a), *Bacillus pumilus* (b)

Susunan 96 well plate pada pengujian MIC dan MBC ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) 10% terhadap bakteri *Bacillus* terdiri atas kolom 1 sebagai kontrol negatif (1) dan kolom 2 sebagai kontrol positif (2). Kolom 3 hingga 12 masing-masing berisi variasi konsentrasi ekstrak, yaitu 0,09 mg/mL (3), 0,20 mg/mL (4), 0,39 mg/mL (5), 0,78 mg/mL (6), 1,56 mg/mL (7), 3,13 mg/mL (8), 6,25 mg/mL (9), 12,50 mg/mL (10), 25,00 mg/mL (11), dan 50,00 mg/mL (12), yang ditambahkan media MHB dan inokulum bakteri. Pada pengujian ML-AgNPs 1%, susunan 96 well plate juga terdiri atas kolom 1 sebagai kontrol negatif (1) dan kolom 2 sebagai kontrol positif (2), sedangkan kolom 3 hingga 12 berisi variasi konsentrasi ML-AgNPs, yaitu 0,009 mg/mL (3), 0,02 mg/mL (4), 0,039 mg/mL (5), 0,078 mg/mL (6), 0,156 mg/mL (7), 0,313 mg/mL (8), 0,63 mg/mL (9), 1,30 mg/mL (10), 2,50 mg/mL (11), dan 5,00 mg/mL (12), yang juga ditambahkan media MHB dan inokulum bakteri.

Pada Tabel 7, ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) menunjukkan aktivitas bakteriostatik terhadap seluruh bakteri genus *Bacillus* yang diuji. Antibakteri merupakan zat yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri melalui gangguan terhadap metabolisme sel mikroba (Utami, 2017). Aktivitas antibakteri dapat dibedakan menjadi bakteriostatik dan bakterisidal. Aktivitas bakteriostatik merupakan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri tanpa membunuhnya secara langsung (Irmayanti, 2024).

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai MIC ekstrak daun melinjo 10% adalah 1,570 mg/mL dengan nilai MBC berkisar antara 25,00 hingga >50,00 mg/mL. Di antara bakteri yang diuji, *B. pumilus* teridentifikasi sebagai bakteri yang paling sensitif terhadap perlakuan ekstrak, yang ditandai dengan nilai MBC terendah yaitu 25,00 mg/mL, kemudian diikuti oleh *B. subtilis* dengan nilai MBC 50 mg/mL. Sementara itu, *B. cereus* dan *B. megaterium* menunjukkan tingkat resistensi yang lebih tinggi dengan nilai MBC lebih dari 50,00 mg/mL.

Berdasarkan penelitian Trisha et al. (2024), ekstrak etanol daun melinjo (*G. gnemon* L.) menunjukkan aktivitas bakteriostatik terhadap beberapa bakteri uji dengan rentang nilai MIC sebesar 6,25-25,00 mg/mL dan nilai MBC antara 12,5 hingga >50 mg/mL. Pada penelitian tersebut, bakteri gram positif seperti *B. pumilus* dan *B. megaterium* menunjukkan sensitivitas yang relatif lebih tinggi dibandingkan bakteri gram negatif, yang ditunjukkan oleh nilai MIC yang lebih rendah. Hal ini berselarasan dengan hasil penelitian bahwa ekstrak daun melinjo cenderung menghambat pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan membunuh secara langsung.

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekstrak daun melinjo memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dengan nilai MIC yang relatif tinggi, yaitu 640 mg/mL. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa efektivitas antibakteri dapat bervariasi tergantung pada jenis bakteri, konsentrasi, dan metode ekstraksi yang digunakan (Dayoh et al., 2021). Pada penelitian yang dilakukan Parhusip et al. (2011) menunjukkan bahwa ekstrak dari bagian lain tanaman melinjo, seperti biji

dan kulit memiliki aktivitas antibakteri pada beberapa bakteri, termasuk *B. cereus* dan *S. aureus* yang ditunjukkan dengan nilai MIC dan MBC yang lebih rendah. Penemuan tersebut menjadi bukti bahwa perbedaan bagian dalam suatu tanaman yang digunakan dapat mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif dan efektivitas antibakterinya.

Sebagai pembanding, larutan ML-AgNPs 1% menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun melinjo 10%. Hal ini ditunjukkan oleh nilai MIC yang lebih rendah, yaitu berkisar antara 0,157 hingga 0,313 mg/mL, dengan nilai MBC >5 mg/mL. Pada pengujian menggunakan larutan ML-AgNPs, *B. subtilis* teridentifikasi sebagai bakteri yang paling sensitif terhadap perlakuan dengan nilai MIC sebesar 0,157 mg/mL, sedangkan *B. pumilus*, *B. cereus*, dan *B. megaterium* menunjukkan tingkat sensitivitas yang lebih rendah dengan nilai MIC sebesar 0,313 mg/mL.

Peningkatan aktivitas antibakteri pada ML-AgNPs dibandingkan ekstrak ditandai dengan penurunan nilai MIC sekitar 5-10 kali lipat. Hal ini menunjukkan bahwa proses sintesis nanopartikel mampu meningkatkan efektivitas antibakteri secara signifikan. Peningkatan tersebut berkaitan dengan ukuran partikel yang lebih kecil dan luas permukaan yang lebih besar, sehingga meningkatkan interaksi antara nanopartikel dengan sel bakteri (Ahmad et al., 2024 dan Beer et al., 2012).

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa CHX 1% memiliki aktivitas antibakteri yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun melinjo dan larutan ML-AgNPs, dibuktikan dengan nilai MIC dan MBC yang jauh lebih rendah. *Chlorhexidin* (CHX) merupakan senyawa antimikroba murni yang dirancang untuk merusak membran sel bakteri secara efisien (Mathur et al, 2011).

Sebaliknya, ekstrak daun melinjo merupakan campuran dari berbagai senyawa fitokimia, di mana konsentrasi senyawa aktifnya dapat sangat bervariasi tergantung pada faktor geografis, waktu panen, dan metode ekstraksi (Saad et al, 2011). Efektivitas nanopartikel juga bergantung pada laju pelepasan ion Ag⁺ yang berperan dalam mekanisme antibakteri (Raghav et al, 2025).

Perbedaan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa proses pengolahan bahan, termasuk ekstraksi dan sintesis bahan memiliki peranan penting dalam menentukan efektivitas antibakteri yang dihasilkan. Dengan demikian, meskipun pada penelitian ini ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs belum melampaui efektivitas CHX, keduanya tetap memiliki potensi sebagai antibakteri alami.

4.3. Penelitian Tahap III “Aplikasi Ekstrak Bubuk Daun Melinjo (*G. gnemon* L.) dan ML-AgNPs terhadap Tahu Selama Penyimpanan”

Tahu merupakan produk pangan dengan kadar air dan protein yang tinggi, sehingga menjadi media yang sangat ideal untuk pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Selain mempercepat proses pembusukan yang dapat menurunkan kualitas dan masa penyimpanan, pertumbuhan mikroorganisme juga dapat menimbulkan risiko keamanan pangan karena adanya bakteri patogen (Hadi et al, 2022). Keamanan pangan merupakan aspek fundamental dalam produksi tahu. Kualitas produk tidak hanya ditentukan oleh kandungan proteinnya, tetapi oleh ada atau tidaknya cemaran mikrobiologis. Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3142-1998 tentang Syarat Mutu Tahu, bahwa produk tahu yang baik dan aman dikonsumsi harus memiliki kenampakan normal, tidak berlendir, dan bebas dari jamur atau bakteri. Dalam standar tersebut juga menetapkan batas cemaran mikroba, yang menegaskan pentingnya pengendalian pertumbuhan mikroba selama produksi dan penyimpanan.

Dalam penelitian ini, dilakukan analisis pengaruh ekstrak daun melinjo 1% dan 0.1% dan larutan ML-AgNPs 0.1% dan 0.01% pada penyimpanan sampel tahu yang diamati pada dua kondisi suhu yang berbeda yaitu suhu ruangan ($25 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$) dan suhu pendinginan ($4.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$) dengan rentang penyimpanan (0 hari, 1 hari, 3 hari, 4 hari, 8 hari, dan 10 hari). Untuk mengevaluasi jumlah mikroba pada sampel, umumnya digunakan metode *Total Plate Count* (TPC) atau yang dikenal juga sebagai Angka Lempengan Total (ALT) dengan menggunakan teknik tuang (pour plate) (Pelczar dan Chan, 1988). Prosedur ini didasarkan pada perhitungan jumlah koloni yang tumbuh pada media non-selektif *Plate Count Agar* (PCA) sehingga mendukung pertumbuhan mayoritas bakteri. Koloni yang terbentuk setelah

inkubasi kemudia dihitung, dengan pendugaaan bahwa setiao koloni berasal dari satu sel mikroba hidup. Jumlah mikroba ini dinyatakan dalam satuan *Colony Forming Units* per mililiter (CFU/mL). Untuk memastikan data yang didapatkan akurat, setiap pengujian dilakukan secara duplo ($n=2$).

4.3.1. Pengaruh ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Hasil yang ditunjukkan pada Gambar 29 menunjukkan pengaruh penambahan ekstrak daun melinjo (0,00%, 0,10%, dan 1,00%) terhadap jumlah total mikroba (Total Plate Count/TPC) pada tahu selama penyimpanan pada suhu ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) selama 10 hari. Secara umum, seluruh perlakuan menunjukkan penurunan jumlah mikroba pada hari ke-1, yang menandakan adanya aktivitas penghambatan pada tahap awal penyimpanan.

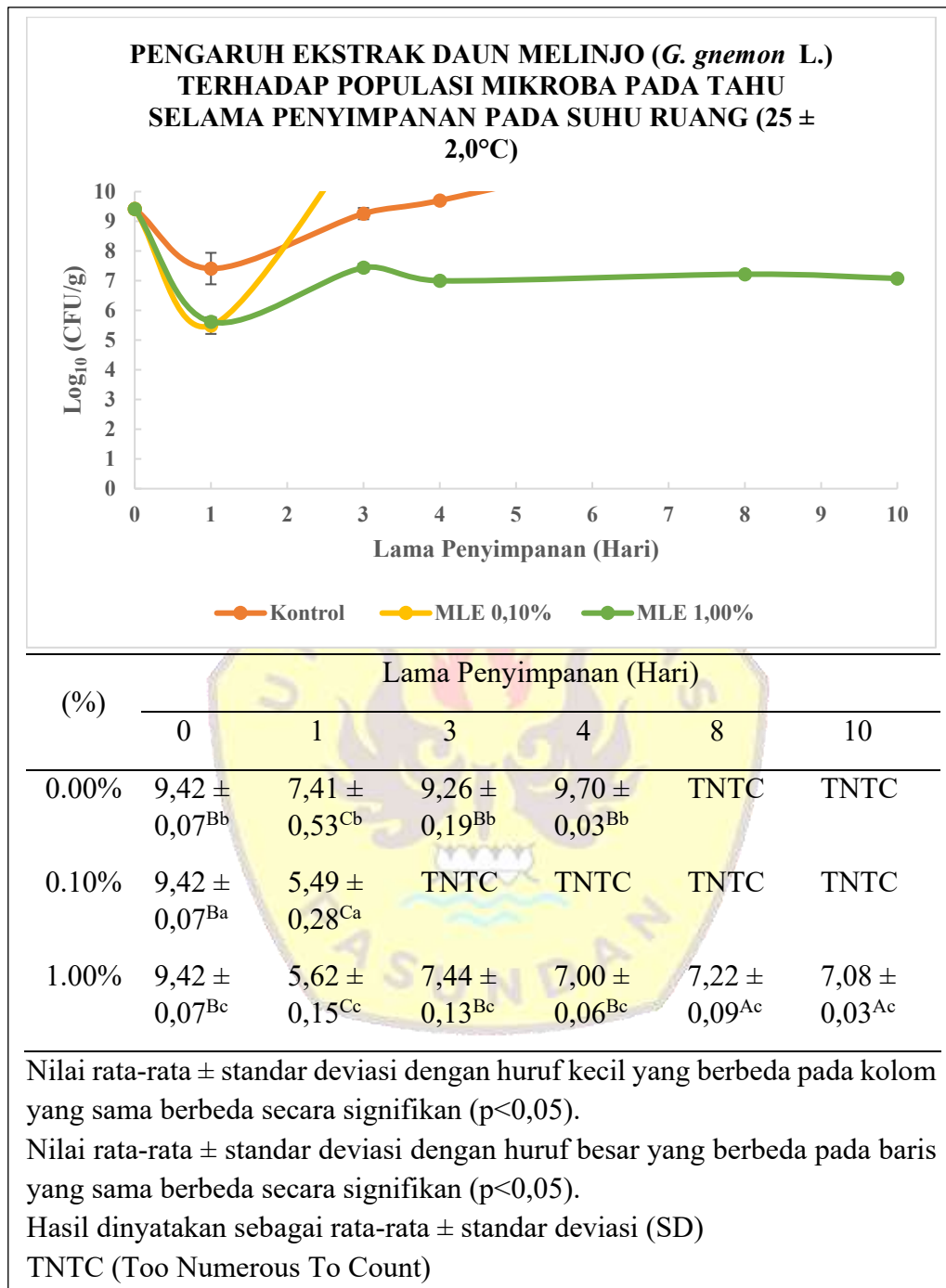
Pada perlakuan kontrol (0,00%), jumlah mikroba mengalami penurunan pada hari ke-1 dari 9,42 Log_{10} (CFU/g) menjadi 7,41 Log_{10} (CFU/g), kemudian kembali meningkat pada hari ke-3 dan ke-4 hingga mencapai kondisi *Too Numerous To Count* (TNTC) pada hari ke-8 dan ke-10. Hal ini menjelaskan bahwa tanpa adanya penambahan ekstrak, pertumbuhan mikroba tidak dapat dikendalikan selama penyimpanan.

Pada perlakuan ekstrak daun melinjo 0,10% jumlah mikroba juga mengalami penurunan pada hari ke-1 menjadi 5,49 Log_{10} (CFU/g), kemudian mengalami peningkatan yang drastis hingga mencapai kondisi TNTC sejak hari ke-3. Kondisi ini menunjukkan bahwa konsentrasi 0,10% hanya memberikan efek penghambatan sementara dan tidak mampu menekan pertumbuhan mikroorganisme dalam jangka waktu penyimpanan yang lebih lama.

Sementara itu, pada konsentrasi ekstrak daun melinjo 1,00% terjadi penurunan jumlah mikroba pada hari ke-1 menjadi 5,62 Log_{10} (CFU/g), terjadi peningkatan pada hari ke-3, namun jumlah mikroba tetap berada pada tingkat yang lebih rendah

dibandingkan perlakuan lainnya dan cenderung stabil hingga hari ke-10 penyimpanan. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 1,00% memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan mikroba pada tahu selama penyimpanan.

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak daun melinjo efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada tahu selama penyimpanan pada suhu ruang, dengan efektivitas yang meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi. Konsentrasi 1,00% menunjukkan efektivitas yang lebih baik dan stabil dalam menekan pertumbuhan mikroba dibandingkan konsentrasi 0,10% yang hanya memberikan efek penghambatan sementara. Hal ini disebabkan karena terdapat perbedaan jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam setiap konsentrasi ekstrak, seperti flavonoid, saponin, dan tanin, di mana semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka aktivitas antibakteri semakin tinggi (Sawitri et al., 2025). Senyawa bioaktif yang terkandung pada tanaman dapat berperan sebagai antibakteri, karena kemampuannya dalam mengganggu stabilitas membran sel yang mengakibatkan hilangnya selektivitas membran dalam mengatur transport molekul, sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler dan kematian sel (Tarigan et al., 2019).



Gambar 29. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

4.3.2. Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Gambar 30 menunjukkan bahwa penambahan ML-AgNPs pada konsentrasi 0,10% dan 0,01% memberikan pengaruh terhadap fluktuasi pertumbuhan mikroba pada tahu selama penyimpanan pada suhu ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) selama 10 hari. Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh perlakuan mengalami penurunan jumlah mikroba pada hari ke-1, yang mengindikasikan bahwa ML-AgNPs mulai memberikan efek antibakteri sejak awal penyimpanan.

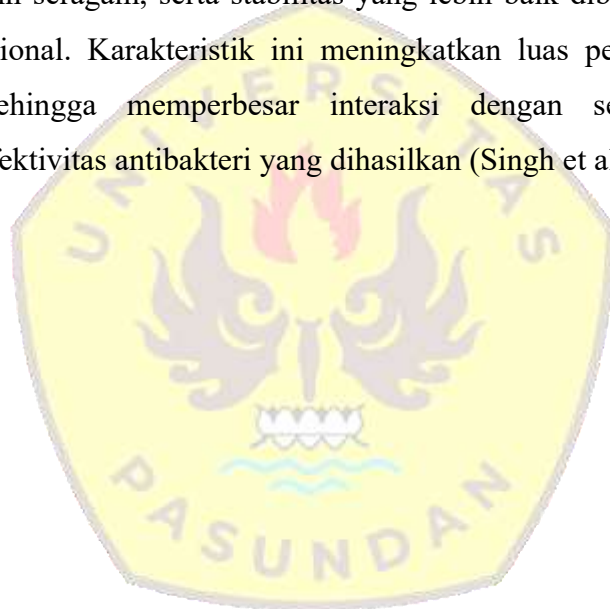
Pada perlakuan kontrol (0,00%), jumlah mikroba sempat mengalami penurunan pada hari ke-1 dari 9,42 menjadi 7,41 Log_{10} (CFU/g), kemudian kembali meningkat menjadi 9,26 dan 9,70 Log_{10} (CFU/g) pada hari ke-3 dan ke-4, hingga mencapai kondisi TNTC pada hari ke-8 dan ke-10. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa adanya penambahan perlakuan, pertumbuhan mikroba tidak dapat dikendalikan selama penyimpanan.

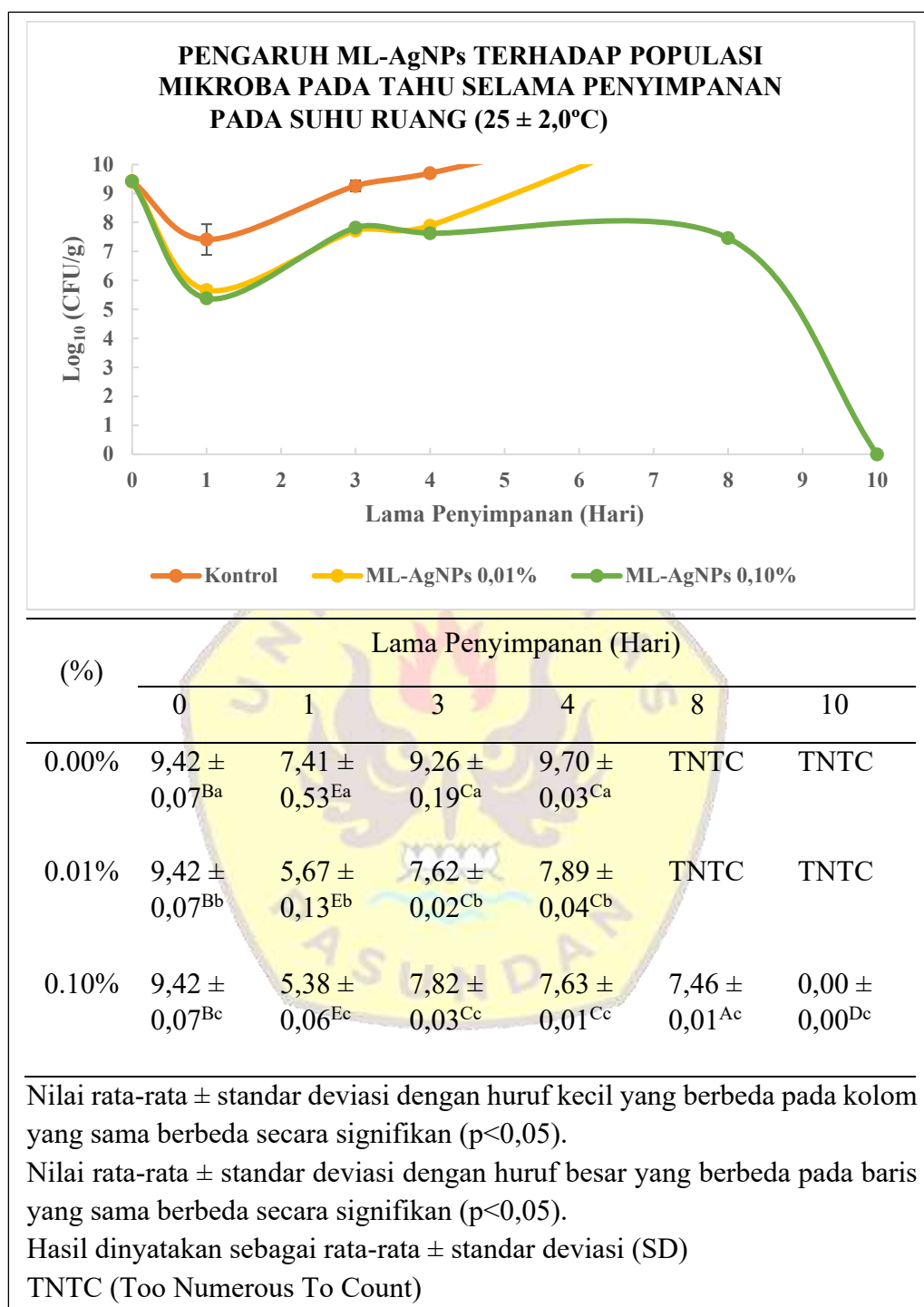
Pada ML-AgNPs 0,01% jumlah mikroba pada hari ke-1 menurun cukup signifikan menjadi 5,67 Log_{10} (CFU/g), namun kembali meningkat menjadi 7,62 dan 7,89 Log_{10} (CFU/g) pada hari ke-3 dan ke-4, kemudian mencapai kondisi TNTC pada hari ke-8 dan ke-10. Kondisi ini menggambarkan bahwa penambahan perlakuan dengan konsentrasi rendah (0,01%) hanya memberikan efek penghambatan sementara.

Berbeda dengan itu, pada ML-AgNPs 0,10%, jumlah mikroba menunjukkan penurunan yang signifikan pada hari ke-1 menjadi 5,38 Log_{10} (CFU/g), kemudian mengalami peningkatan pada hari ke-3 dan ke-4 dengan masing-masing nilai sebesar 7,82 dan 7,63 Log_{10} (CFU/g). Namun pada hari ke-8, jumlah mikroba kembali menurun menjadi 7,46 Log_{10} (CFU/g) dan tidak lagi terdeteksi pertumbuhan mikroba (0,00 Log_{10} CFU/g) pada hari ke-10. Temuan ini mengindikasikan bahwa konsentrasi 0,10% mampu memberikan efek penghambatan yang lebih poten dan berkelanjutan.

Jika dibandingkan dengan ekstrak daun melinjo, ML-AgNPs memiliki efektivitas yang lebih tinggi dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Hal ini ditunjukkan dari kemampuan ML-AgNPs dalam menekan jumlah mikroba hingga tidak terdeteksi pada akhir penyimpanan, sementara ekstrak daun melinjo hanya mampu menghambat pertumbuhan mikroba tanpa menurunkannya hingga nol. Perbedaan ini menegaskan bahwa perlakuan dalam bentuk nanopartikel memberikan aktivitas antibakteri yang lebih baik dan stabil selama penyimpanan.

Proses sintesis nanopartikel berbasis ekstrak tanaman (green synthesis) diketahui mampu menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil, distribusi ukuran yang lebih seragam, serta stabilitas yang lebih baik dibandingkan bentuk ekstrak konvensional. Karakteristik ini meningkatkan luas permukaan spesifik nanopartikel, sehingga memperbesar interaksi dengan sel mikroba dan meningkatkan efektivitas antibakteri yang dihasilkan (Singh et al., 2023).





Gambar 30. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

4.3.3. Pengaruh ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Pada Gambar 31 tersaji data yang menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu pendinginan ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) mampu memperlambat pertumbuhan mikroba pada tahu selama 10 hari penyimpanan. Pada kondisi tertentu, pertumbuhan mikroba masih tetap terjadi pada beberapa perlakuan, hal ini bergantung pada konsentrasi ekstrak yang digunakan.

Pada perlakuan kontrol (0,00%), jumlah mikroba mengalami penurunan pada hari ke-1 dari 9,42 menjadi 4,94 Log_{10} CFU/g, kemudian meningkat kembali menjadi 6,70 Log_{10} (CFU/g) pada hari ke-3 dan mencapai TNTC sejak hari ke-4 hingga hari ke-10. Data ini menunjukkan bahwa suhu pendinginan hanya mampu memperlambat, tetapi tidak mampu menghambat pertumbuhan mikroba secara efektif tanpa adanya penambahan agen antibakteri.

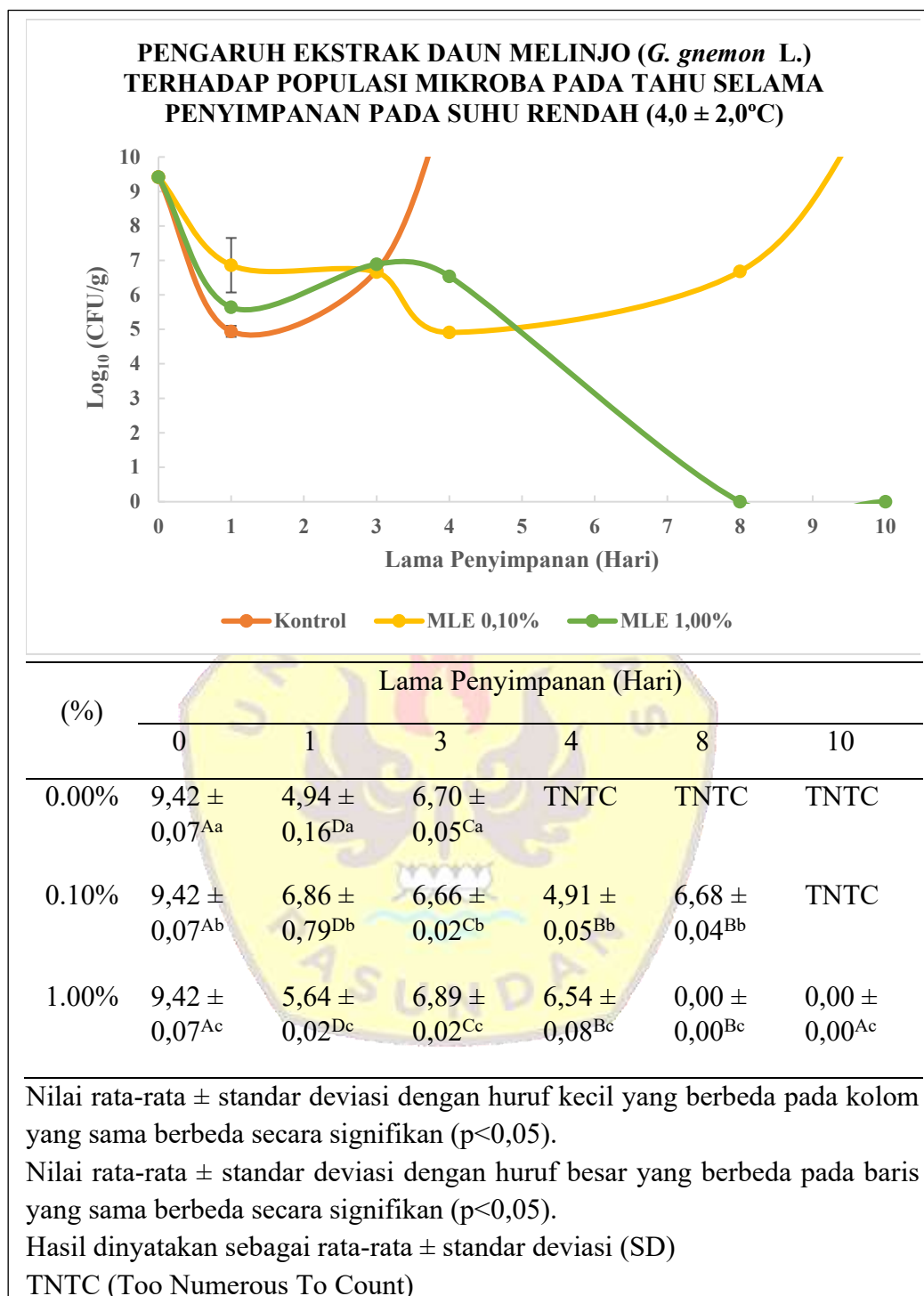
Pada perlakuan ekstrak daun melinjo 0,10% jumlah mikroba menunjukkan pola yang fluktuatif selama penyimpanan, yaitu jumlah mikroba relatif stabil dari hari ke-1 (6,86 Log_{10} CFU/g) hingga hari ke-8 (6,68 Log_{10} CFU/g), sebelum akhirnya mencapai kondisi TNTC pada hari ke-10. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 0,10% belum mampu memberikan efek penghambatan yang optimal dalam jangka waktu penyimpanan yang lebih lama.

Adapun pada ekstrak daun melinjo 1,00% jumlah mikroba mengalami penurunan yang lebih signifikan, hingga mampu tidak terdeteksi (0,00 Log_{10} CFU/g) pada hari ke-8 hingga hari ke-10. Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi 1,00% memiliki efektivitas yang lebih tinggi dan mampu memberikan efek penghambatan yang lebih stabil selama penyimpanan pada suhu dingin.

Variasi hasil tersebut menegaskan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun melinjo memiliki keterkaitan terhadap peningkatan efektivitas dalam menghambat pertumbuhan mikroba selama penyimpanan pada suhu pendinginan. Konsentrasi

yang lebih tinggi menunjukkan efek penghambatan yang lebih kuat dan stabil. Hal ini berkaitan dengan meningkatnya jumlah senyawa bioaktif dalam ekstrak, seperti flavonoid, tanin, dan saponin, yang tetap berperan aktif dalam menghambat pertumbuhan mikroba meskipun pada kondisi suhu rendah (Tarigan et al., 2019). Kemampuan ekstrak konsentrasi 1,00% dalam menekan populasi mikroba hingga tidak terdeteksi pada hari ke-8 membuktikan bahwa daun melinjo memiliki aktivitas antibakteri intrinsik yang kuat. Namun, efektivitasnya masih terbatas oleh ukuran molekul ekstrak kasar yang besar, sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk memberikan efek letal (mematikan) secara total pada mikroba.





Gambar 31. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

4.3.4. Pengaruh ML-AgNPs terhadap Populasi Mikroba pada Tahu Selama Penyimpanan pada Suhu Rendah ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Data yang tersaji pada gambar 32 menunjukkan bahwa penambahan ML-AgNPs memberikan pengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mikroorganisme pada tahu selama penyimpanan selama 10 hari di suhu pendinginan ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Pada perlakuan kontrol (0,00%), jumlah mikroba menunjukkan pola yang serupa, yaitu mengalami penurunan pada hari ke-1 menjadi $4,94 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g), kemudian mengalami peningkatan kembali menjadi $6,70 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g) pada hari ke-3 hingga mencapai kondisi TNTC pada hari ke-4 dan seterusnya. Hal ini menunjukkan bahwa suhu pendinginan saja tidak cukup untuk menghambat pertumbuhan mikroba secara optimal.

Penambahan perlakuan ML-AgNPs 0,01% menunjukkan pola fluktuatif pada jumlah mikroba selama masa penyimpanan, yaitu $6,48 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g) pada hari ke-1, $6,07 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g) pada hari ke-3, dan meningkat kembali hingga $7,37 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g) pada hari ke-10. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi rendah ML-AgNPs belum mampu memberikan efek penghambatan yang maksimal.

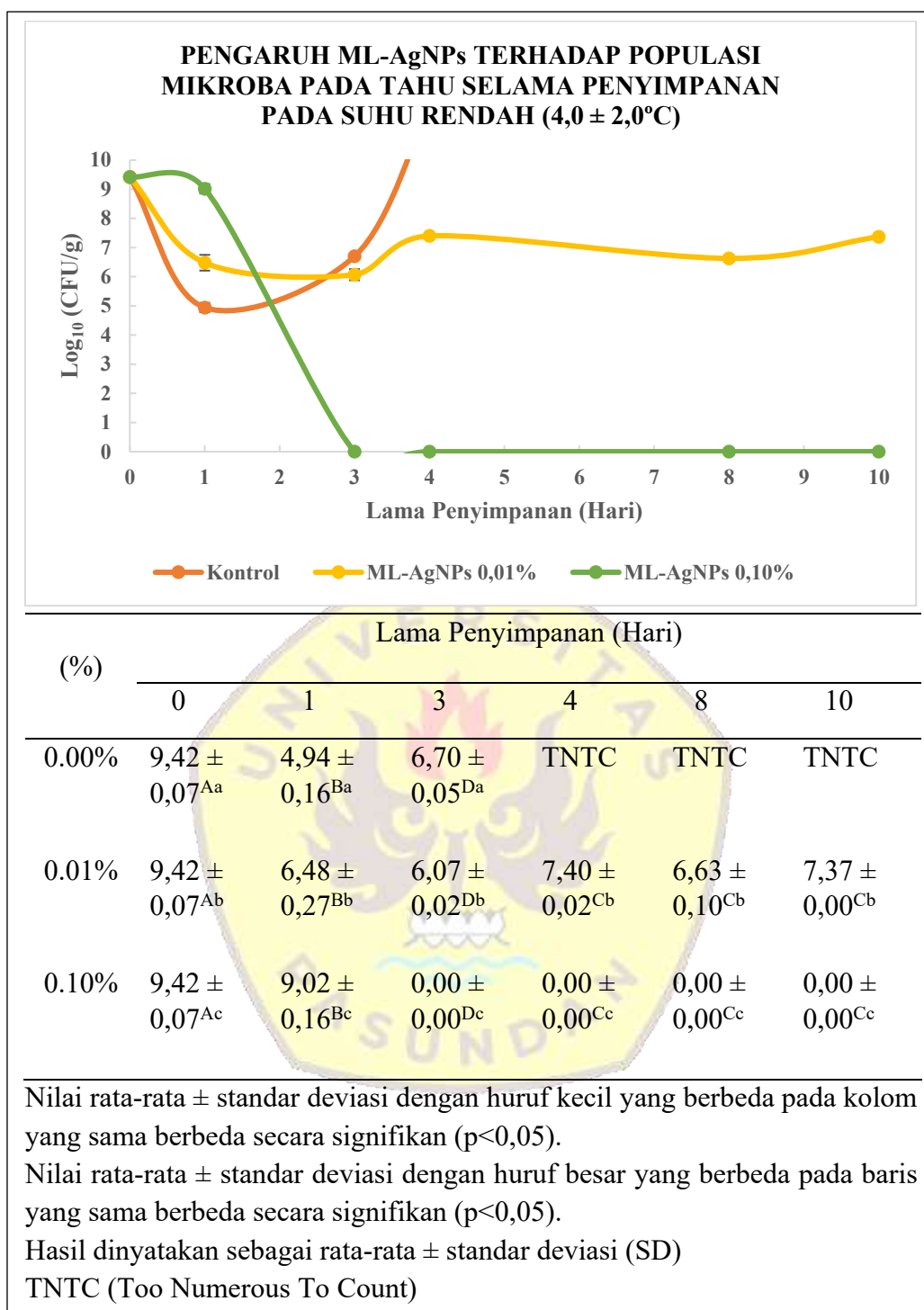
Sebaliknya, perlakuan ML-AgNPs 0,10% menunjukkan penurunan jumlah mikroba yang sangat drastis dari $9,42 \text{ Log}_{10}$ (CFU/g) pada hari ke-0 menjadi tidak terdeteksi ($0,00 \text{ Log}_{10}$ CFU/g) pada hari ke-3, dan kondisi ini tetap bertahan hingga hari ke-10. Kondisi ini membuktikan bahwa ML-AgNPs pada konsentrasi 0,10% memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat dan mampu mengeliminasi mikroba dalam waktu yang relatif singkat.

Penyimpanan pada suhu rendah diketahui berperan dalam memperlambat aktivitas mikroba melalui laju metabolisme dan aktivitas enzimatik sel. Penurunan suhu dapat mengurangi kecepatan reaksi metabolisme, sehingga pertumbuhan bakteri, jamur, dan kapang menjadi terhambat (Khomsan, 2004). Meski begitu, suhu rendah tidak secara langsung membunuh mikroba, sehingga tetap diperlukan

penambahan agen antibakteri yang mampu meningkatkan efektivitas pengawetan (Winarno, 2008). Dalam hal ini, ML-AgNPs mampu memperkuat efek penghambatan tersebut, sehingga pertumbuhan mikroba dapat ditekan secara lebih cepat dan stabil selama penyimpanan.

ika dibandingkan dengan hasil pada sub-bab 4.3.3, perlakuan ML-AgNPs menunjukkan efektivitas yang jauh lebih tinggi dan respons yang lebih cepat dalam menghambat mikroba. Peningkatan efektivitas ini merupakan hasil dari optimalisasi potensi antibakteri dari daun melinjo yang telah dibuktikan sebelumnya. Pada konsentrasi 1,00% ekstrak kasar mampu mengeliminasi mikroba pada hari ke-8, namun dengan formulasi ML-AgNPs, konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,10% sudah mampu mencapai kondisi tidak terdeteksi ($0,00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$) jauh lebih awal, yakni sejak hari ke-3.

Hal ini membuktikan bahwa teknologi nanopartikel berperan sebagai *booster* bagi senyawa aktif melinjo. Melalui *green synthesis*, senyawa bioaktif tersebut tidak lagi bekerja secara mandiri dalam bentuk molekul kasar, melainkan terkonfigurasi pada permukaan nanopartikel perak sebagai *capping agent*. Ukuran partikel yang sangat kecil (skala nano) mengatasi keterbatasan hambatan difusi yang dialami ekstrak kasar, sehingga memudahkan penetrasi agen antibakteri ke dalam sel mikroba yang sedang dalam kondisi metabolisme lambat akibat suhu dingin. Sinergi antara ion perak dan senyawa aktif melinjo ini memberikan tekanan letal yang lebih intensif dan cepat, yang menegaskan bahwa teknologi nanopartikel mampu mengoptimalkan potensi alami daun melinjo menjadi agen pengawet yang jauh lebih poten dan stabil.



Gambar 32. Jumlah mikroba (TPC) yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi ML-AgNPs dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Dingin ($4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

BAB V SIMPULAN DAN SARAN

Bab ini menguraikan tentang (5.1.) Simpulan dan (5.2.) Saran

5.1. SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan, diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Bubuk daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menunjukkan karakteristik fisikokimia dengan nilai warna L^* $41,390 \pm 0,940$, a^* $-3,390 \pm 0,010$, dan b^* $10,020 \pm 0,660$, kadar air sebesar $7,720 \pm 0,320\%$, pH $5,940 \pm 0,010$, serta aktivitas air (a_w) sebesar $0,580 \pm 0,002$. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol absolut 99,5% (perbandingan 1:4 b/v) menghasilkan rendemen sebesar 8,82%, yang menunjukkan bahwa etanol efektif dalam mengekstrak senyawa bioaktif dari daun melinjo.
2. Aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo 10% dan ML-AgNPs 1% terhadap bakteri genus *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, dan *B. megaterium*) menunjukkan adanya kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri. Pada uji Well Diffusion Assay (WDA), ekstrak daun melinjo menunjukkan aktivitas tertinggi terhadap *B. pumilus* ($12,67 \pm 2,56$ mm), sedangkan ML-AgNPs menunjukkan aktivitas tertinggi terhadap *B. subtilis* ($12,83 \pm 4,04$ mm). Pada uji MIC dan MBC, ML-AgNPs menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak, dengan nilai MIC berkisar 0,157–0,313 mg/mL dan MBC >5 mg/mL, yang mengindikasikan peningkatan efektivitas antibakteri melalui proses sintesis nanopartikel.
3. Aplikasi ekstrak daun melinjo (0%; 0,1%; dan 1%) serta ML-AgNPs (0%; 0,01%; dan 0,10%) pada tahu selama penyimpanan pada suhu ruang ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) dan suhu pendinginan ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) menunjukkan bahwa kedua perlakuan mampu menghambat pertumbuhan mikroba selama 10 hari penyimpanan. Konsentrasi yang lebih tinggi memberikan efek

penghambatan yang lebih kuat dan stabil, dengan ML-AgNPs 0,10% menunjukkan efektivitas tertinggi karena mampu menekan pertumbuhan mikroba hingga tidak terdeteksi dalam waktu lebih cepat dibandingkan ekstrak. Meskipun demikian, ekstrak daun melinjo tetap memiliki potensi sebagai agen antibakteri alami yang lebih ekonomis dan aplikatif dalam pengawetan pangan.

5.2. SARAN

1. Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan mengeksplorasi variasi jenis dan konsentrasi pelarut, serta ukuran partikel (mesh) bubuk daun melinjo, guna mengetahui pengaruhnya terhadap rendemen dan kandungan senyawa bioaktif yang dihasilkan.
2. Pengujian lanjutan disarankan dilakukan dengan memperluas rentang konsentrasi ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs, serta memperpanjang durasi penyimpanan (misalnya 14, 21, hingga 30 hari) untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai pola pertumbuhan mikroba dan kestabilan aktivitas antibakteri. Selain itu, variasi tersebut juga bertujuan untuk menentukan konsentrasi efektif minimum, sehingga dapat diperoleh formulasi yang lebih optimal dan efisien.
3. Penelitian berikutnya dapat melakukan uji sensoris terhadap tahu yang diberi perlakuan ekstrak daun melinjo dan ML-AgNPs, meliputi parameter rasa, aroma, warna, dan tekstur untuk mengetahui tingkat penerimaan konsumen serta potensi aplikasinya dalam produk pangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N. H., Rukayadi, Y., Khan, S., Parmin, N. A., Nizar, N. N. A., & Mohammad, Z. H. (2024). Nanotechnology in Food Safety and Preservation. *Innovative Food Packaging And Processing Technologies*. 233-278
- Ahmed, S., Saifullah., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Azadirachta indica* aqueous Leaf Extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 1 7.
- Amelia, A. (2012). Pengaruh Variasi Konsentrasi Enzim dan Substrat Terhadap Sakarifikasi Limbah Pengolahan Kertas Menggunakan Enzim Selulase dari *Bacillus sp.* BPPT CC RK2. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Andarwulan, N., Nuraida, L., Adawiyah, D. R., Triana, R. N., Agustin, denny, & Gitapratwi, D. (2018). Pengaruh Perbedaan Jenis Kedelai terhadap Kualitas Mutu Tahu. *Jurnal Mutu Pangan*, 5(2).
- Apriliansyah, M., Zuhrotun, A., & Astrini, D. (2022). Bakteri Utama Penyebab Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*, 11(3).
- Ariani, N., Safutri, M., & Musiam, S. (2016). Analisis Kualitatif Formalin pada Tahu Mentah yang Dijual di Pasar Kalindo, Teluk Tiram dan Telawang Banjarmasin. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(1), 60–64.
- Arifin, R., Arild, Kim, S. J., Yim, J. H., Suwanto, A., & Kim, H. K. (2013). Isolation and Biochemical Characterization of *Bacillus pumilus* Lipases from The Antarctic. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 661–667. <https://doi.org/10.4014/jmb.1212.12040>
- Arsanti, R. S., & Setiawan, N. C. E. (2017). Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan Metode Difusi Cakram. *Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang*, 1(2).
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan. (2019). Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 11 Tahun 2019 Tentang Bahan Tambahan Pangan.
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan. (2021). Badan Pengawas Obat dan Makanan Laporan Tahunan 2021. Retrieved www.pom.go.id

- Badan Standardisasi Nasional. (1998). *SNI 01-3142-1998 Tentang Tahu*.
- Baird-Parker, T.C. (2000). *Staphylococcus aureus*. Dalam: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. dan Gould, G.W. (ed). *The Microbiological Safety and Quality of Food*, hal. 1317-1331. Volume II, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D. S., & Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208(3), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>
- Budi Sawitri, S., Ana Estikomah, S., & Lutfia Zahron, M. (2025). Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada Sediaan Salep. *JIGF*, 3(2), 2987–4742. <http://jurnal.iainsragen.org/index.php/jigf>
- Cartwright, P., & Somerset, U. K. (2009). Probiotic News: *Bacillus subtilis*-Identification and Safety. *Protexin Health Care*. No: 2.
- Cowan, N. (1999). An Embedded-Processes Model of Working Memory. *Models of working memory: Mechanisms of active maintenance and executive control*, 20(506), 1013-1019.
- Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. International Journal of Antimicrobial Agents Alkaloids : An overview of their antibacterial , antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;44(5):377–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
- Dayoh, P., Isbandiati, E., & Rahayu, T. (2021). Antibacterial Effect of *Gnetum gnemon* L. Leaves Extract On *Staphylococcus aureus*. *Journal Widya Medika Junior*, 3(2). <https://doi.org/10.33508/jwmj.v3i2.3187>
- Elifah, E. (2010). Uji Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Senggani (*Melastoma candidum*, D.Don) terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Emilia, Q., Dewantihariyadi, R., & Nuraida, L. (2015). Perilaku *Bacillus cereus* Selama Fermentasi Tempe yang Diperkaya dengan Bakteri Asam Laktat. Institut Pertanian Bogor.

- Eskin M dan Robinson D S. (2010). *FoodShelf Life Stability, Chemical, Biochemical and Microbiological Changes*. Taylor and Francis, USA
- Fahdi, F., Margata, L., Ariska, S., Gultom, D., Meliala, L., Farmasi, F., Kesehatan, I., Husada, D., & Tua, D. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans*. In *Jurnal Penelitian Farmasi & Herbal* (Vol. 3). <http://ejournal.delihusada.ac.id/index.php/JPFH>
- Falola, T. O. (2022). Nanoparticles Modified Electrodes: Synthesis, Modification, and Characterization—A Review. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 12(03). <https://doi.org/10.4236/wjnse.2022.123003>
- Faradisa, Maria. 2008. Uji Efektifitas Antimikroba Senyawa Saponin dari Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Skripsi. Malang: UIN Malang.
- Gama, S. I., Mahmudah, F., & Junaiddin. (2023). Edukasi Penggunaan dan Identifikasi Bahan Pengawet pada Produk Pangan di Manunggal Jaya Kecamatan Tenggarong Seberang. *ABDIKU: Jurnal Pengabdian Masyarakat Universitas Mulawarman*, 2(1). <https://doi.org/10.32522/abdiku.v2i1.543>
- Hadi, I., Azhari, S., & Nurluthfiana, D. (2022). Penentuan Kadar Protein dan Cemaran Mikroorganisme Tahu Putih dari Pasar Tradisional X Kota Cirebon. *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, 2022, 45–48.
- Hakim, A. R., & Saputri, R. (2020). Narrative Review: Optimasi Etanol sebagai Pelarut Senyawa Flavonoid dan Fenolik. *Jurnal Surya Medika*, 6(1). <https://doi.org/10.33084/jsm.v6i1.1641>
- Haryani, S., Aisyah, Y., & Yunita, I. (2016). Prosiding Seminar Nasional BKS PTN Wilayah Barat Bidang Ilmu Pertanian.
- Hatmanti, A. (2000). Pengenalan *Bacillus spp. Oseana*, XXV, 31–41.
- Hayati, E. K. (2009). Pengawet Makanan: Sebuah Bahasan untuk Penetapan Halalan Toyoyiban. In *Ulul Albab* (Vol. 10, Number 2).
- Hussein, Z. M., Abedali, A. H., & Ahmead, A. S. (2019). Improvement Properties of Self-Healing Concrete by Using Bacteria. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 584(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/584/1/012034>

- Irmayanti, S. (2024). Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Penyebab Diare. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märklbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* Food Infection as Multifactorial Process. In *Toxins* (Vol. 12, Number 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins12110701>
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2012). Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 033 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan.
- Khan, S., Rukayadi, Y., Jaafar, A. H., & Ahmad, N. H. (2023). Antibacterial Potential of Silver Nanoparticles (SP-AgNPs) Synthesized from *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Against Selected Foodborne Pathogens. *Heliyon*, 9(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22771>
- Khomsan, A. 2004. Pangan dan Gizi. Yogyakarta
- Kim, Y., Yang, D., Singh, P., Kim, Y., & Zhang, D. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms, (November). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Kining, E., Firdiani, D., & Asma, S. (2022). Aktivitas Antibakteri Dan Antibiofilm Ekstrak Air Daun Melinjo Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. In *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal* (Vol. 7, Number 1).
- Kuntjoro, S., & Suhartono, M. T. (1998). Karakterisasi Biokimiawi Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* DB104 Rekombinan. IPB University Scientific Repository.
- Latifah, A'yunin. 2008. Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) Dengan Variasi Pelarut. Skripsi. Malang: UIN Malang.
- Leviana, W., & Paramita, V. (2017). Pengaruh Suhu terhadap Kadar Air tan Aktivitas Air dalam Bahan pada Kunyit (*Curcuma longa*) Dengan Alat Pengereng Electrical Oven. 13(2), 37–44. <http://ejournal.undip.ac.id/index.php/metana>
- Mailia, R., Yudhistira, B., Pranoto, Y., Rochdyanto, S., & Rahayu, E. S. (2015). Ketahanan Panas Cemaran *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

- cereus* dan Bakteri Pembentuk Spora yang Diisolasi dari Proses Pembuatan Tahu di Sudagaran Yogyakarta. *Jurnal Agritech*, 35(03).
<https://doi.org/10.22146/agritech.9341>
- Manikome, N. (2022). Isolat Bakteri *Bacillus cereus* Frank. dari Tanah pada Beberapa Kawasan (Studi Kasus Minahasa Tenggara dan Minahasa Selatan). *JUSTE (Journal of Science and TechnoLogy)*, 2(2).
<https://doi.org/10.51135/justevol2issue2page196-206>
- Mardiana, S. (2025). Studi Literatur Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder pada Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang Memiliki Aktivitas Antioksidan. Universitas Islam Sultan Agung.
- Mathur, S., Mathur, T., Srivastava, R., & Khatri, R. (2011). Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 1(2).
<https://doi.org/10.5455/njppp.2011.v1.i2.1>
- Min S , Yu Y , Martin SS. 2005. Effect of Soybean Varie-Ties and Growing Locations on The Physical And Che-mical Properties of Soymilk and Tofu. *J Food Sci*70(1): C8 -C
- Mustika, S., Insan, R. R., & Faridah, A. (2019). Analisis Cemaran *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus* pada Minuman Susu Kedelai di Kota Padang. *Jurnal Pendidikan Dan Keluarga*, 11(02).
<https://doi.org/10.24036/jpk/vol11-Iss02/735>
- Parhusip, A. J. N., & Sitanggang, A. B. (2011). Antimicrobial Activity of Melinjo Seed and Peel Extract (*Gnetum gnemon*) Against Selected Pathogenic Bacteria. *Microbiology Indonesia*, 5(2). <https://doi.org/10.5454/mi.5.3.2>
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (1988). Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2 (R. S. Hadioetomo, T. Imas, S. S. tjitrosomo, & S. L. Angka, Trans.). Universitas Indonesia.
- Perkins, M. (2011). *Bacillus megaterium* 1,000x 1.
- Pooley, F, D. Bacteria Accumulate Silver During Leaching of Sulphide Ore Minerals. *Nature*, 1982, 296 (5858): 642–643.

- Poysa V, Woodrow L. 2002. Stability of Soybean Seed Composition and Its Effect On Soymilk and Tofu Yield and Quality. *Food Research Int* 35: 337- 34
- Prajna, D., Prasetyo, A., Widyaningtyas, S., Hermawan, F., Prasetyo, H., Kunci, K. (2025). Dissemination of Artificial Preservatives for Food and Beverages at MA Al-Ishlah Jenggawah Jember. *Jati Emas (Jurnal Aplikasi Teknik Dan Pengabdian Masyarakat)*, 9(2).
- Prajnaparamita, K., & Susanti, S. (2021). Karakter Morfologis dan Perkembangan Anatomis Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Biogenesis*, 17(2), 49. <https://doi.org/10.31258/biogenesis.17.2.49-60>
- Purwanto, P. R. (2022). *Gnetum gnemon* (Melinjo). In https://library.sman7purworejo.sch.id/index.php?p=gnetum_gnemon.
- Raghav, P., Khera, A. K., & Bisht, S. (2025). Comparative Evaluation of Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles and Chlorhexidine Mouthwashes on The Colonization of Microflora and Oral Health During Orthodontic Treatment: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 30(1). <https://doi.org/10.1590/2177-6709.30.1.e2524112.oar>
- Ramadhan, R. S. (2024). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhadap Patogen Bawaan Makanan dan Pengaruhnya Bagi Populasi Mikroba pada Ayam Mentah. Universitas Pasundan.
- Rashid, M.; Sabir, S. (2014). Biosynthesis of Self-Dispersed Silver Colloidal Particles Using The Aqueous Extract of *P. Peruviana* for Sensing Dl-Alanine. *ISRN NanotechnoLogy*, Article ID: 670780, 1-7.
- Rekha CR, Vijayalakshmi G. 2013. Influence of Pro-Cessing Parameters on Quality of Soycurd (Tofu). *JFood Science Technol* 50(1): 176
- Rivianto, F. A., Aida, F., Nola, F., Andriani, N., Utami, M. R., & Nurfadhila, L. (2023). Review : Analisis Peredaran Penggunaan Pengawet Legal dan Ilegal yang Digunakan pada Produk Pangan. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v6i1.18>

- Saad, B., & Said, O. (2011). Medicinal Herbs and Extracting Their Active Ingredients. In *Greco-Arab and Islamic Herbal Medicine*. <https://doi.org/10.1002/9780470944363.ch16>
- Saidi, N.A. (2026). Enhancing Antibacterial Activity of Green Synthesis of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Leaf Extract-Mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) Against Foodborne Pathogens and Their Safety. Universitas Putra Malaysia.
- Sarda Carbasse, J., Schober, I., Koblitz, J., Podstawka, A., & Reimer, L. C. (2025). *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil 1901 (Version 10.0) [Dataset].
- Setiawan, N. C. E., & Widiyanti, A. I. (2017). Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*.
- Shofi Fatimatuzzahrah, B., Rien Handayani, B., & Antariksana Bachmida, E. (2024). Kajian Mutu Limbah Ampas Tahu Segar Dari Sentra Produksi Abian Tubuh. <http://www.profood.unram.ac.id/index.php/profood>
- Singh, H., Desimone, M. F., Pandya, S., Jasani, S., George, N., Adnan, M., Aldarhami, A., Bazaid, A. S., & Alderhami, S. A. (2023). Revisiting the Green Synthesis of Nanoparticles: Uncovering Influences of Plant Extracts as Reducing Agents for Enhanced Synthesis Efficiency and Its Biomedical Applications. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 18). <https://doi.org/10.2147/IJN.S419369>
- Siregar, Y. D. I., & Utami, P. (2014). Pemanfaatan Ekstrak Kulit Melinjo Merah (*Gnetum gnemon*) sebagai Pewarna Alami pada Pembuatan Lipstik. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. *Jurnal Kimia Valensi*, 4(2), 98–108.
- Skiba, M.I.; Vorobyova, V.I. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Orange Peel Extract Prepared by Plasmochemical Extraction Method and Degradation of Methylene Blue Under Solar Irradiation. *Advances in Materials Science and Engineering*, Article ID: 8306015, 1-8
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From Soil to Gut: *Bacillus cereus* and Its Food Poisoning Toxins. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Number 4, pp. 579–606). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>

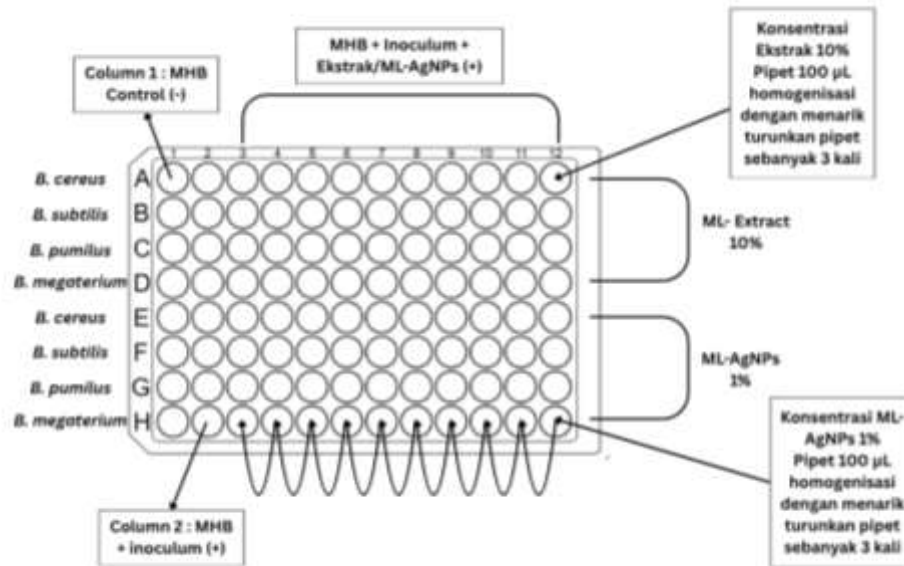
- Sulistyaningsih, E., & Wardani, S. (2022). Edukasi Penggunaan Bahan Pengawet Makanan pada Kelompok Produksi Wingko Babat di Karangwuni, Rongkop Gunungkidul. *Journal of Community Service (JCS)*, 1(2).
- Taba, P., Parmitha, N. Y., & Kasim, S. (2019). Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Sebagai Bioreduktor dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan. *Indo. J. Chem. Res.*, 7(1). <https://doi.org/10.30598/ijcr.2019.7-ptb>
- Tarigan, I. L., Muadifah, A., Amini, H. W., & Astutik, T. K. (2019). Studi Aktivitas Ekstrak Etanol dan Sediaan Gel Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Chempublish Journal*, 4(2), 89–100. <https://doi.org/10.22437/chp.v4i2.7631>
- Taroreh, T. N. C., Rumampuk, J. F., & Siagian, K. V. (2016). Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(3).
- 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>
- Utami, N. A. (2017). Uji Daya Hambat Bakteriostatik dari Ekstrak Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Skripsi. Universitas Sanat Dharma. Yogyakarta.
- Wandira, A., Cindiasya, Rosmayati, J., Anandari, R. F., Naurah, S. A., & Fikayuniar, L. (2023). Menganalisis Pengujian Kadar Air dari Berbagai Simplisia Bahan Alam Menggunakan Metode Gravimetri.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for The Future. *International Journal of Nanomedice*, 12, 1227-1249.
- Winarno, F. G. (2008). Kimia Pangan dan Gizi Edisi Terbaru.

- Yasni, S., E. Syamsir dan E. H. Direja. 2009. Antimicrobial Activity of Black Cumin Extract (*Nigella sativa*) Against Food Pathogenic and Spoilage Bacteria. *MicrobioLogy Indonesia*. 3(3): 146-150
- 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. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 15). <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Zulaicha, A. S., Saputra, I. S., Sari, I. P., Ghifari, M. A., Yulizar, Y., Permana, Y. N., & Sudirman, S. (2021). Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Bioreduktor Alami Ekstrak Daun Ilalang (*Imperata cylindrica* L). *Rafflesia Journal of Natural and Applied Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.33369/rjna.v1i1.15588>



LAMPIRAN

Lampiran 1. Layout 96 Well plate



Susunan 96 well plate pada pengujian MIC dan MBC ekstrak daun melinjo (*G. gnemon* L.) 10% terhadap bakteri *Bacillus* terdiri atas kolom 1 sebagai kontrol negatif (1) dan kolom 2 sebagai kontrol positif (2). Kolom 3 hingga 12 masing-masing berisi variasi konsentrasi ekstrak, yaitu 0,09 mg/mL (3), 0,20 mg/mL (4), 0,39 mg/mL (5), 0,78 mg/mL (6), 1,56 mg/mL (7), 3,13 mg/mL (8), 6,25 mg/mL (9), 12,50 mg/mL (10), 25,00 mg/mL (11), dan 50,00 mg/mL (12), yang ditambahkan media MHB dan inokulum bakteri. Pada pengujian ML-AgNPs 1%, susunan 96 well plate juga terdiri atas kolom 1 sebagai kontrol negatif (1) dan kolom 2 sebagai kontrol positif (2), sedangkan kolom 3 hingga 12 berisi variasi konsentrasi ML-AgNPs, yaitu 0,009 mg/mL (3), 0,02 mg/mL (4), 0,039 mg/mL (5), 0,078 mg/mL (6), 0,156 mg/mL (7), 0,313 mg/mL (8), 0,63 mg/mL (9), 1,30 mg/mL (10), 2,50 mg/mL (11), dan 5,00 mg/mL (12), yang juga ditambahkan media MHB dan inokulum bakteri

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

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0,05$

Note:

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Bacteria Strands	Fixed	4	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>
Concentrations	Fixed	2	1,00; 10,00

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Bacteria Strands	3	22,61	7,538	1,01	0,415
Concentration	1	19,26	19,260	2,57	0,128
Bacteria Strands*Concentration	3	36,78	12,260	1,64	0,220
Error	16	119,83	7,490		
Total	23	198,49			

Tukey Pairwise Comparisons: Bacteria Strand

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Bacteria Strand	N	Mean	Grouping
<i>Bacillus pumilus</i>	6	12,5000	A
<i>Bacillus cereus</i>	6	11,6667	A
<i>Bacillus megaterium</i>	6	11,5833	A
<i>Bacillus subtilis</i>	6	9,8333	A

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Concentration

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration	N	Mean	Grouping
1,00	12	12,2917	A

10,00 12 10,5000 A

Note:

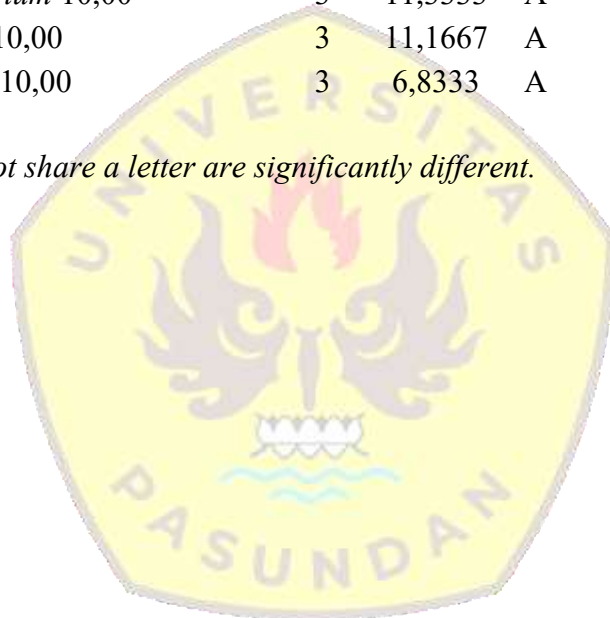
Means that do not share a letter are significantly different.

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

Bacteria Strands*Concentration	N	Mean	Grouping
<i>Bacillus subtilis</i> 1,00	3	12,8333	A
<i>Bacillus pumilus</i> 10,00	3	12,6667	A
<i>Bacillus pumilus</i> 1,00	3	12,3333	A
<i>Bacillus cereus</i> 1,00	3	12,1667	A
<i>Bacillus megaterium</i> 1,00	3	11,8333	A
<i>Bacillus megaterium</i> 10,00	3	11,3333	A
<i>Bacillus cereus</i> 10,00	3	11,1667	A
<i>Bacillus subtilis</i> 10,00	3	6,8333	A

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.



Lampiran 3. Analisis of varians (Aplikasi Ekstrak dan ML-AgNPs)

Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis Not all means are equal
 Significance level $\alpha = 0,05$

Note:

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Days	Fixed	6	0; 1; 3; 4; 8; 10
Concentration	Fixed	3	0,00; 0,10; 1,00

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Days	5	76,999	15,3999	585,98	0,000
Concentration	2	69,555	34,7776	1323,32	0,000
Days*Concentration	10	42,708	4,2708	162,51	0,000
Error	18	0,473	0,0263		
Total	35	189,735			

Tukey Pairwise Comparisons: Days

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Days	N	Mean	Grouping
8	6	10,4067	A
10	6	10,3600	A
4	6	9,5683	B
3	6	9,5633	B
0	6	9,4150	B
1	6	6,0817	C

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Concentration

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration	N	Mean	Grouping
---------------	---	------	----------

0,10	12	10,4850	A
0,00	12	9,9183	B
1,00	12	7,2942	C

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration*Days	N	Mean	Grouping
0,00% Day 10	2	12,000	A
0,10% Day 10	2	12,000	A
0,10% Day 3	2	12,000	A
0,10% Day 4	2	12,000	A
0,10% Day 8	2	12,000	A
0,00% Day 8	2	12,000	A
0,00% Day 4	2	9,705	B
0,00% Day 0	2	9,415	B
0,10% Day 0	2	9,415	B
1,00% Day 0	2	9,415	B
0,00% Day 3	2	9,255	B
1,00% Day 3	2	7,435	C
1,00% Day 8	2	7,220	C
0,00% Day 1	2	7,135	C
1,00% Day 10	2	7,080	C
1,00% Day 4	2	7,000	C
1,00% Day 1	2	5,615	D
0,10% Day 1	2	5,495	D

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi Ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Pendinginan ($4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis Not all means are equal
 Significance level $\alpha = 0,05$

Note:

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Days	Fixed	6	0; 1; 3; 4; 8; 10
Concentration	Fixed	3	0,00; 0,10; 1,00

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Days	5	70,719	14,1438	186,91	0,000
Concentration	2	56,505	28,2527	373,36	0,000
Days*Concentration	10	115,053	11,5053	152,04	0,000
Error	18	1,362	0,0757		
Total	35	243,640			

Tukey Pairwise Comparisons: Days

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Days	N	Mean	Grouping
10	6	9,85167	A
0	6	9,41500	A
4	6	7,81500	B
8	6	7,78833	B
3	6	6,75000	C
1	6	5,81667	D

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,51083	A
0,10	12	7,75417	B
1,00	12	6,45333	C

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration*Days	N	Mean	Grouping
0,00% Day 4	2	12,000	A
0,10% Day 10	2	12,000	A
0,00% Day 10	2	12,000	A
0,00% Day 8	2	12,000	A
0,00% Day 0	2	9,415	B
0,10% Day 0	2	9,415	B
1,00% Day 0	2	9,415	B
1,00% Day 3	2	6,885	C
0,10% Day 1	2	6,865	C
0,00% Day 3	2	6,705	C D
0,10% Day 8	2	6,675	C D
0,10% Day 3	2	6,660	C D E
1,00% Day 4	2	6,535	C D E
1,00% Day 1	2	5,640	D E F
1,00% Day 10	2	5,555	E F
0,00% Day 1	2	4,945	F
0,10% Day 4	2	4,910	F
1,00% Day 8	2	4,690	F

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi sintesis hijau nanopartikel perak yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^\circ\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis Not all means are equal
 Significance level $\alpha = 0,05$

Note:

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Days	Fixed	6	0; 1; 3; 4; 8; 10
Concentration	Fixed	3	0,00; 0,01; 0,10

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Days	5	66,021	13,2042	852,19	0,000
Concentration	2	87,333	43,6664	2818,20	0,000
Days*Concentration	10	143,686	14,3686	927,34	0,000
Error	18	0,279	0,0155		
Total	35	297,319			

Tukey Pairwise Comparisons: Days

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Days	N	Mean	Grouping
8	6	10,4867	A
0	6	9,4150	B
4	6	8,4100	C
3	6	8,2700	C
10	6	8,0000	D
1	6	6,0650	E

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,91833	A
0,01	12	9,11750	B
0,10	12	6,28750	C

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration*Days	N	Mean	Grouping
0,01% Day 10	2	12,000	A
0,00% Day 10	2	12,000	A
0,00% Day 8	2	12,000	A
0,01% Day 8	2	12,000	A
0,00% Day 4	2	9,705	B
0,01% Day 0	2	9,415	B
0,00% Day 0	2	9,415	B
0,10% Day 0	2	9,415	B
0,00% Day 3	2	9,255	B
0,01% Day 4	2	7,890	C
0,10% Day 3	2	7,830	C
0,01% Day 3	2	7,725	C
0,10% Day 4	2	7,635	C D
0,10% Day 8	2	7,460	C D
0,00% Day 1	2	7,135	D
0,01% Day 1	2	5,675	E
0,10% Day 1	2	5,385	E
0,10% Day 10	2	-0,000	F

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Jumlah mikroba TPC yang terdapat pada tahu setelah penyimpanan selama 10 hari yang diberi sintesis hijau nanopartikel perak yang dimediasi ekstrak daun melinjo (ML-AgNPs) dengan konsentrasi yang berbeda dan kondisi pada Suhu Pendinginan ($4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

Two-way ANOVA: Jumlah Mikroba terhadap Hari, Konsentrasi

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis Not all means are equal
 Significance level $\alpha = 0,05$

Note:

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Days	Fixed	6	0; 1; 3; 4; 8; 10
Concentration	Fixed	3	0,00; 0,01; 0,10

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Days	5	81,859	16,372	744,55	0,000
Concentration	2	255,757	127,878	5815,59	0,000
Days* Concentration	10	253,655	25,365	1153,56	0,000
Error	18	0,396	0,022		
Total	35	591,666			

Tukey Pairwise Comparisons: Days

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Days	N	Mean	Grouping
0	6	9,41500	A
1	6	6,81667	B
4	6	6,46833	C
10	6	6,45667	C
8	6	6,21167	C
3	6	4,25833	D

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration	N	Mean	Grouping
0,00	12	9,51083	A
0,01	12	7,23000	B
0,10	12	3,07250	C

Note:

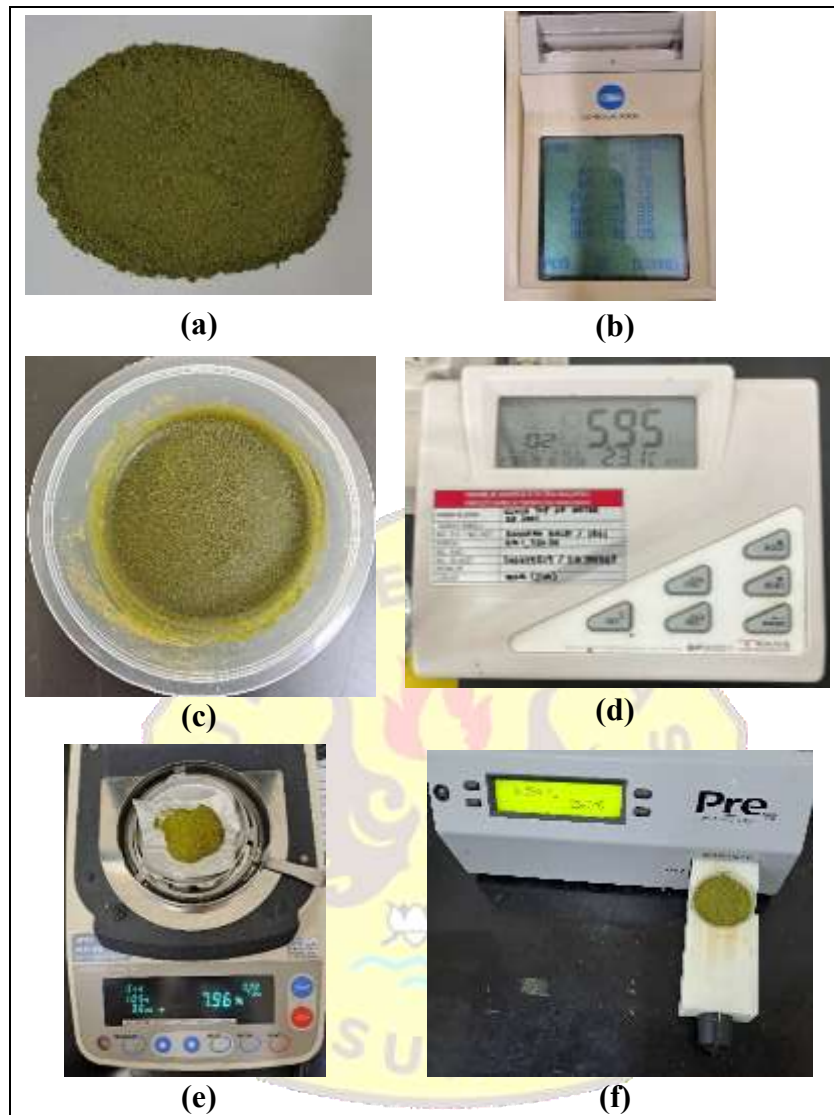
Means that do not share a letter are significantly different.

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

Concentration*Days	N	Mean	Grouping
0,00% Day 4	2	12,000	A
0,00% Day 8	2	12,000	A
0,00% Day 10	2	12,000	A
0,00% Day 0	2	9,415	B
0,01% Day 0	2	9,415	B
0,10% Day 0	2	9,415	B
0,10% Day 1	2	9,020	B
0,01% Day 4	2	7,405	C
0,01% Day 10	2	7,370	C
0,00% Day 3	2	6,705	D
0,01% Day 8	2	6,635	D E
0,01% Day 1	2	6,485	D E
0,01% Day 3	2	6,070	E
0,00% Day 1	2	4,945	F
0,10% Day 8	2	-0,000	G
0,10% Day 10	2	-0,000	G
0,10% Day 4	2	-0,000	G
0,10% Day 3	2	-0,000	G

Note:

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 4. Dokumentasi Analisis Fisikokimia

Keterangan:

a dan b: Analisis warna

c dan d: Analisis pH

e: Analisis Kadar air

f: Analisis aktivitas air (a_w)

Lampiran 5. Dokumentasi Pembuatan Ekstrak Daun Melinjo**(a)****(b)****(c)****(d)****(e)****(f)****(g)****(h)**

Keterangan:

a: Penimbangan bubuk daun melinjo

b–c: Ekstraksi bubuk daun melinjo методом maserasi menggunakan etanol absolut 99,50% (1:4) menggunakan *C24 incubator shaker*

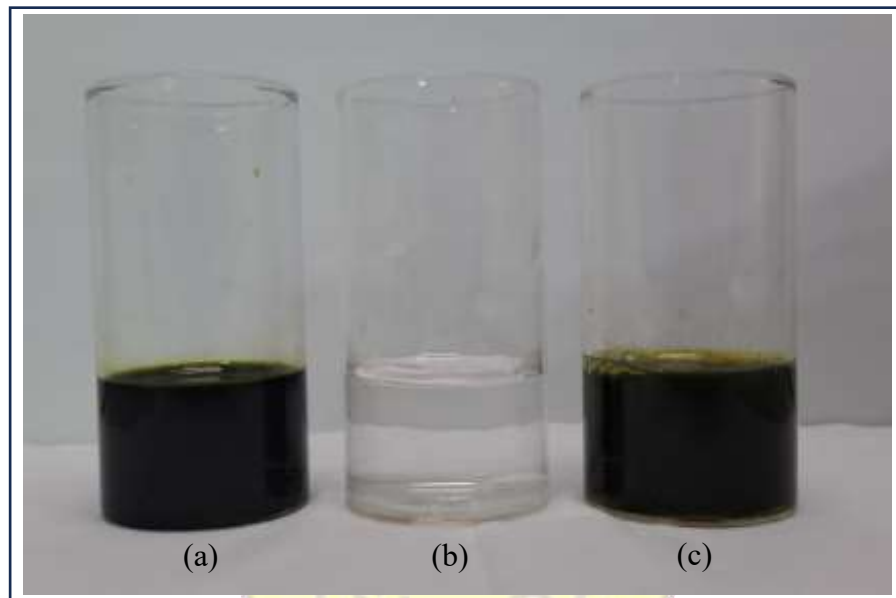
d–e: Penyaringan larutan hasil ekstraksi melalui filtrasi vakum menggunakan kertas saring Whatman dan pompa aspirator

f: Pemekatan ekstrak menggunakan *rotary vacuum evaporator*

g: Penimbangan ekstrak kental menggunakan timbangan digital

h: Ekstrak kasar daun melinjo

Lampiran 6. Dokumentasi Pembuatan ML-AgNPs Dengan Ekstrak Daun Melinjo

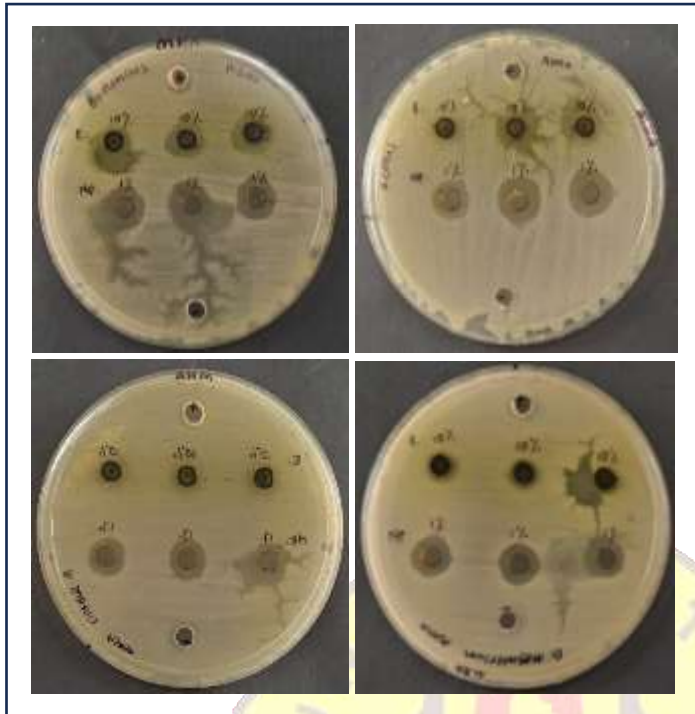
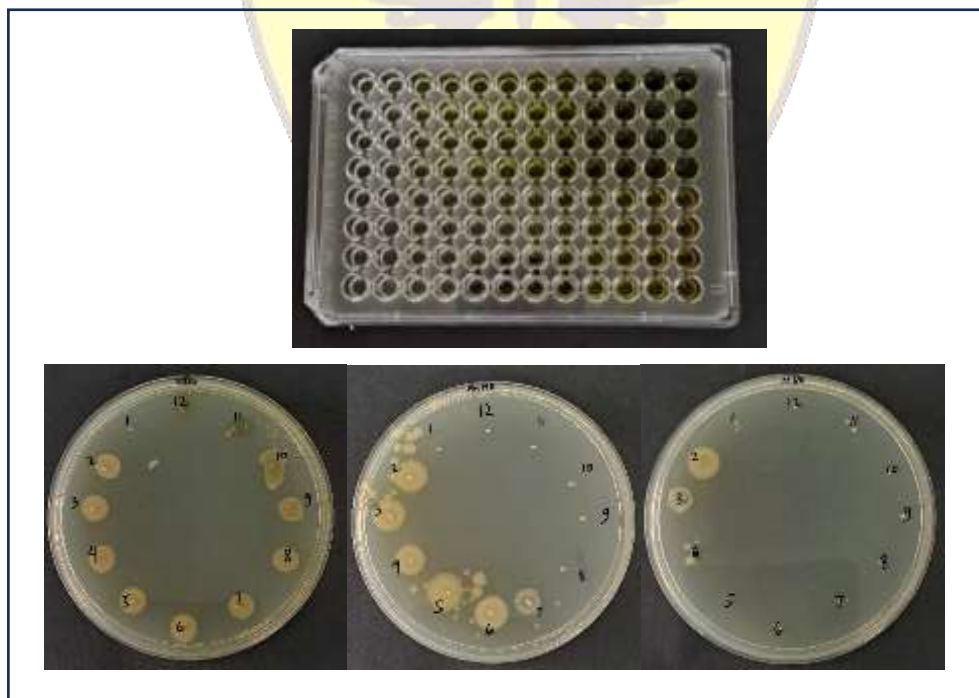


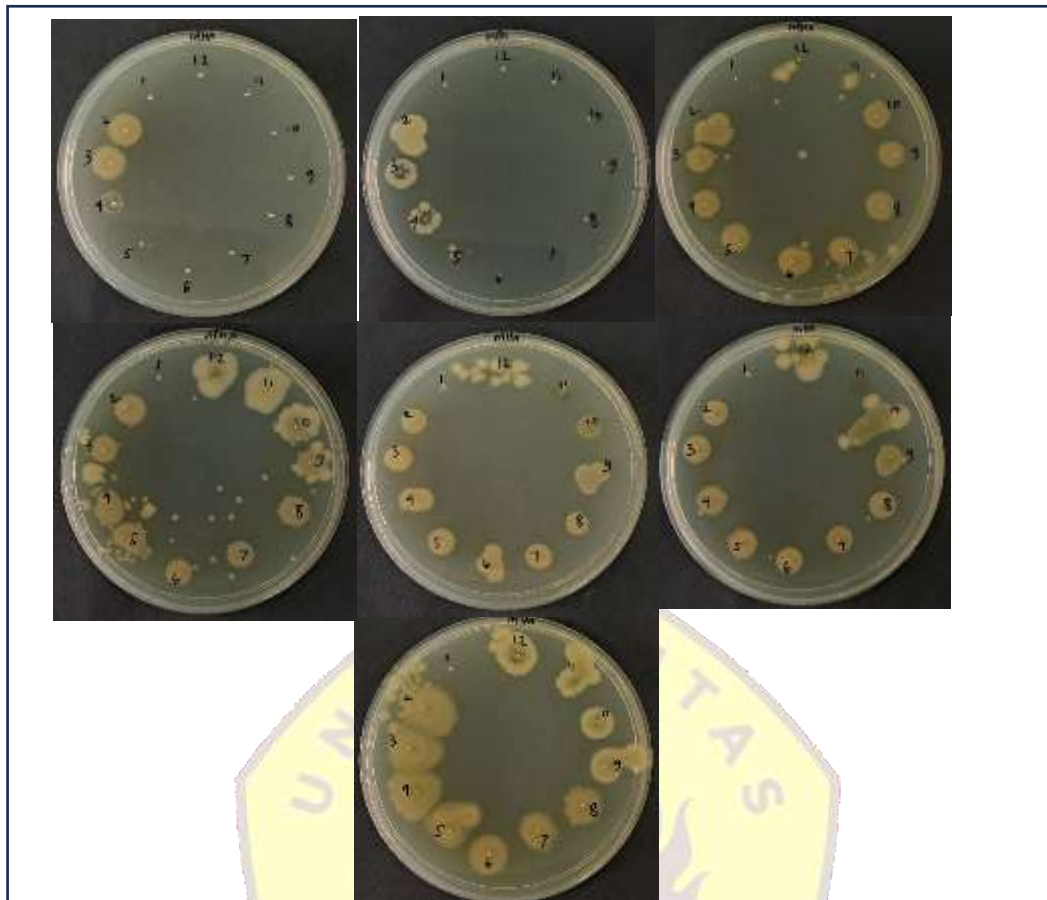
Keterangan:

a: Ekstrak daun melinjo 10%

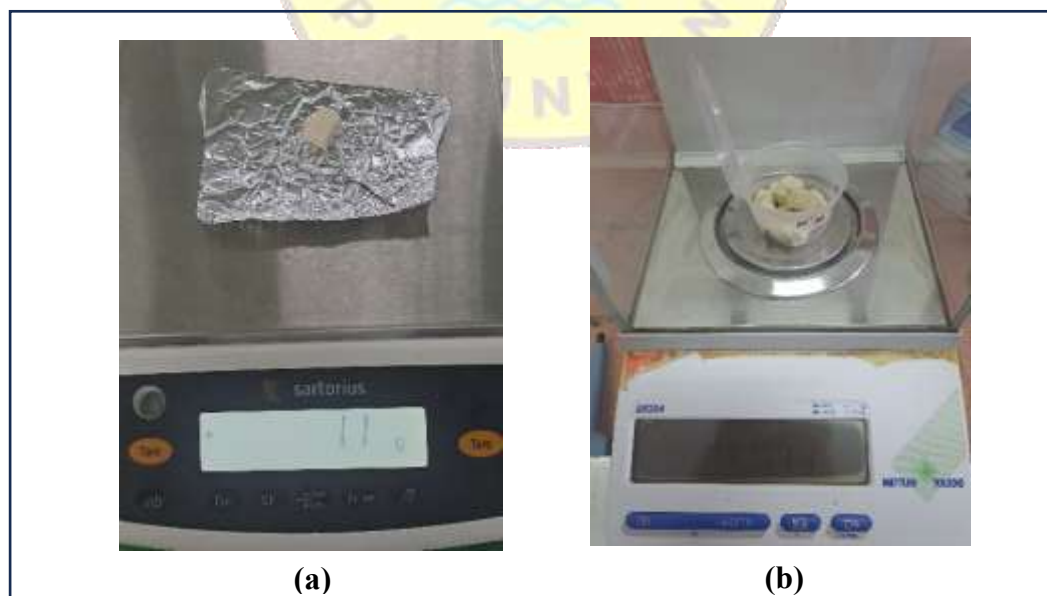
b: AgNO_3 1 mM

c: ML-AgNPs 1%

Lampiran 7. Dokumentasi Hasil Uji WDA**Lampiran 8. Dokumentasi Hasil Uji MIC Dan MBC**



Lampiran 9. Dokumentasi Aplikasi Ekstrak





(c)



(d)



(e)

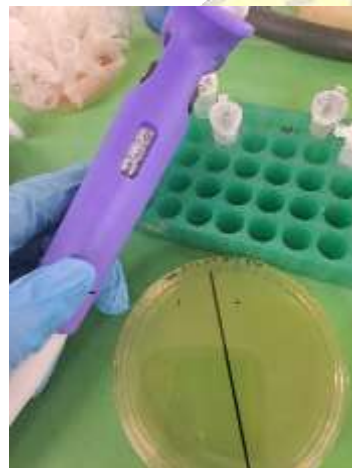
(f)



(g)



(h)



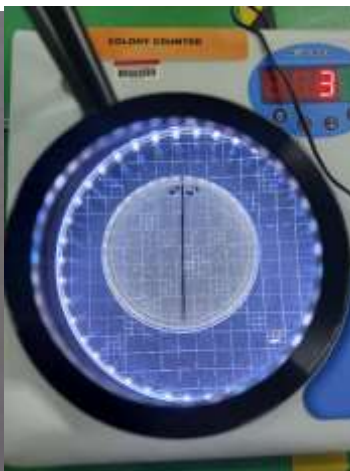
(i)



(j)



(k)



(l)

Keterangan:

- a: Pengecilan ukuran dan penimbangan tahu seberat 1 gram
- b: Marinasi tahu menggunakan ekstrak dan ML-AgNPs
- c: Perlakuan tahu dengan penambahan ekstrak dan ML-AgNPs
- d: Tahu dalam *Phosphate Buffer Solution* (PBS)
- e-h: Pengenceran mikroba
- i-k: *Total Plate Count* (TPC)
- l: Perhitungan jumlah mikroba menggunakan *colony counter*



Lampiran 10. Dokumentasi TPC pada Suhu Ruang ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

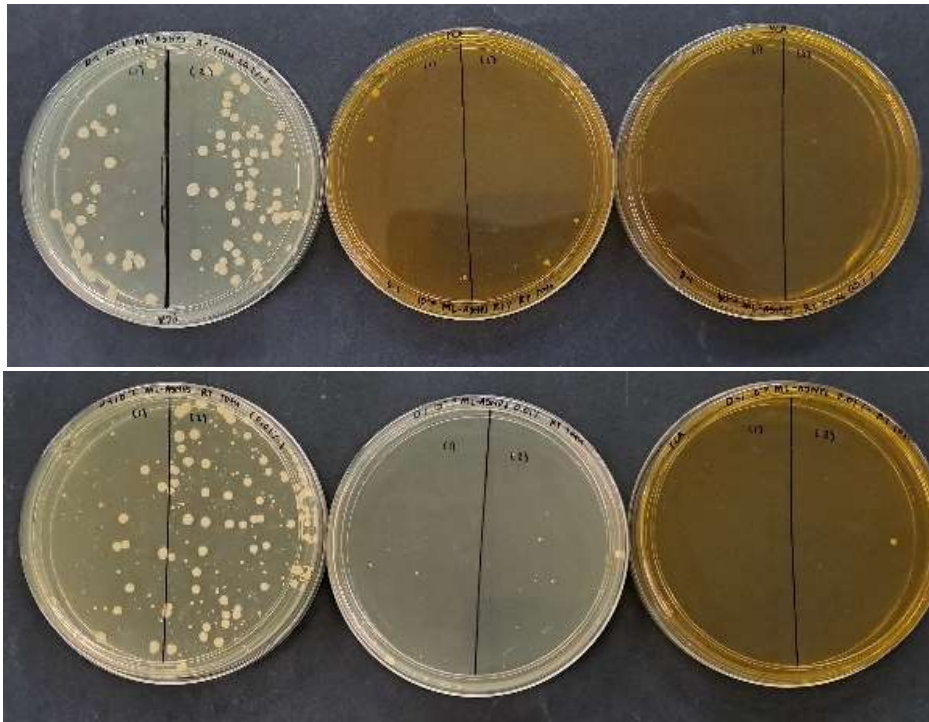
Day 0 (Kontrol)

Day 1
(Kontrol)

(Ekstrak Daun Melinjo)



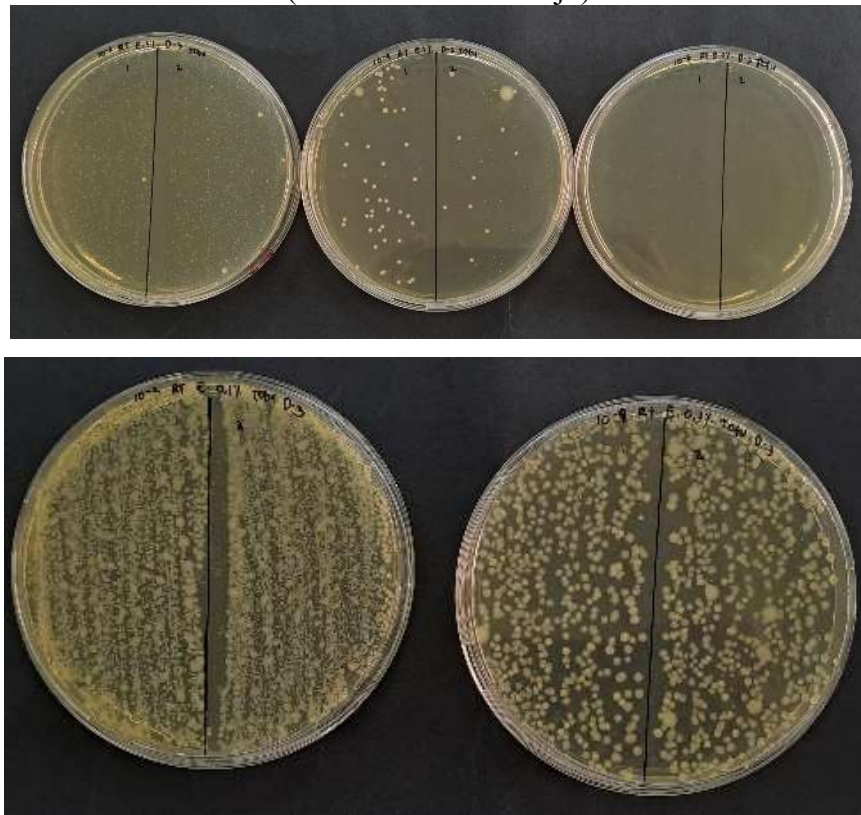
(ML-AgNPs)



Day 3
(Kontrol)



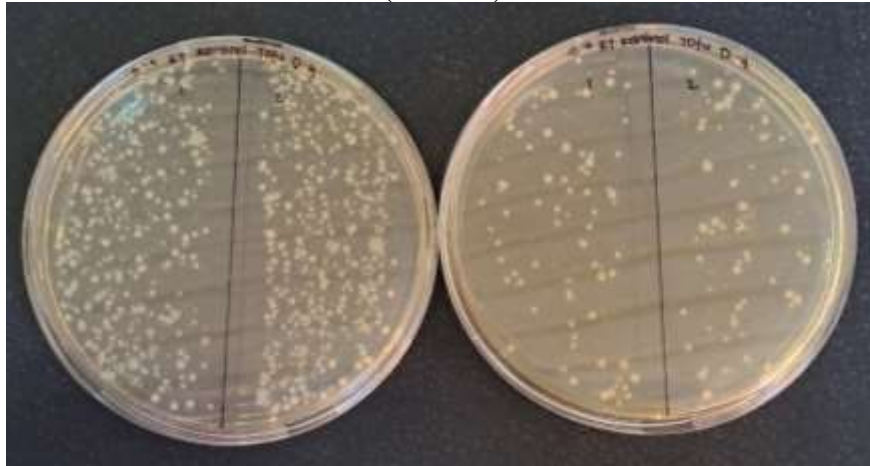
(Ekstrak Daun Melinjo)



(ML-AgNPs)



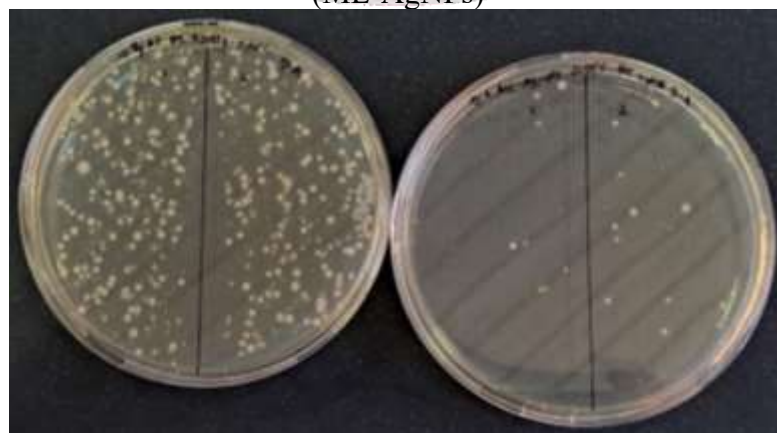
Day 4
(Kontrol)



(Ekstrak Daun Melinjo)

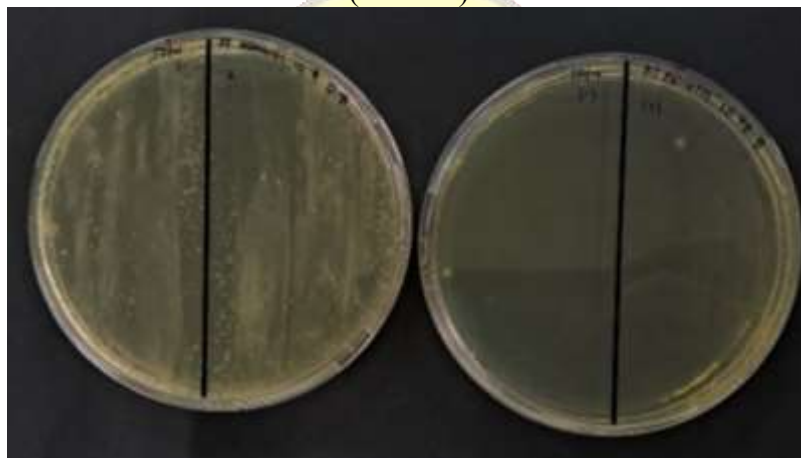


(ML-AgNPs)





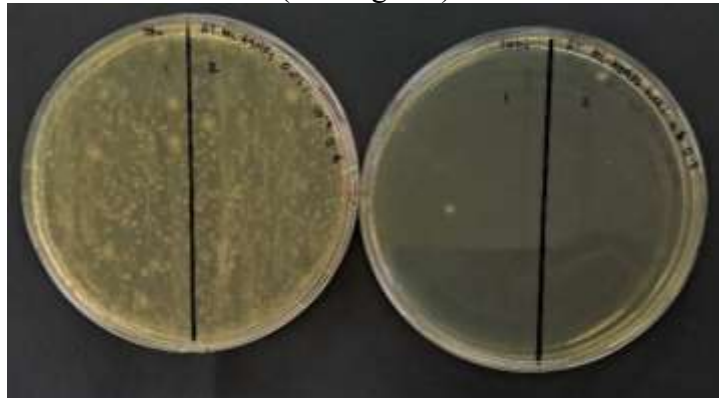
Day 8
(Kontrol)



(Ekstrak Daun Melinjo)



(ML-AgNPs)

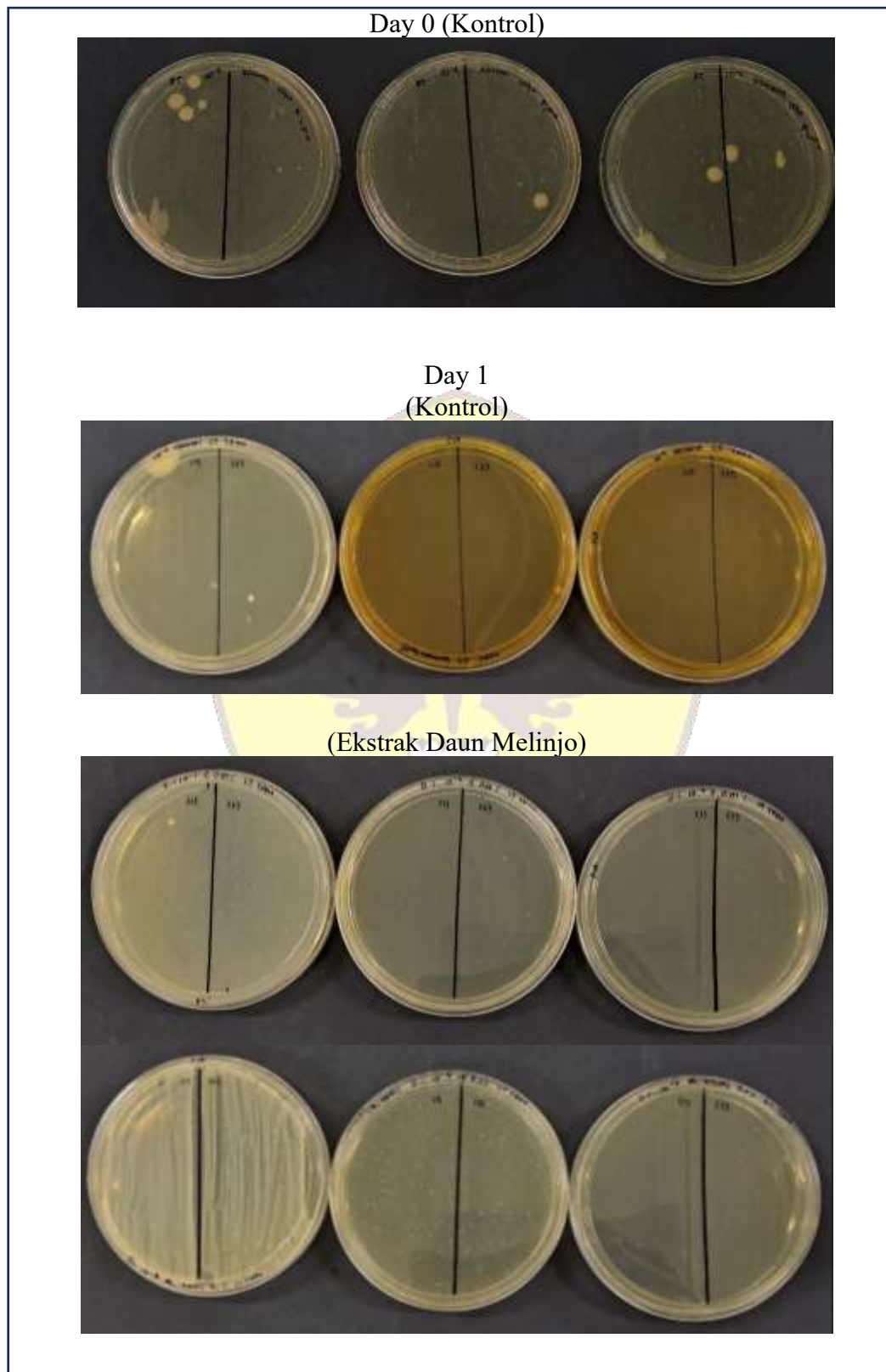


Day 10
(Ekstrak Daun Melinjo)

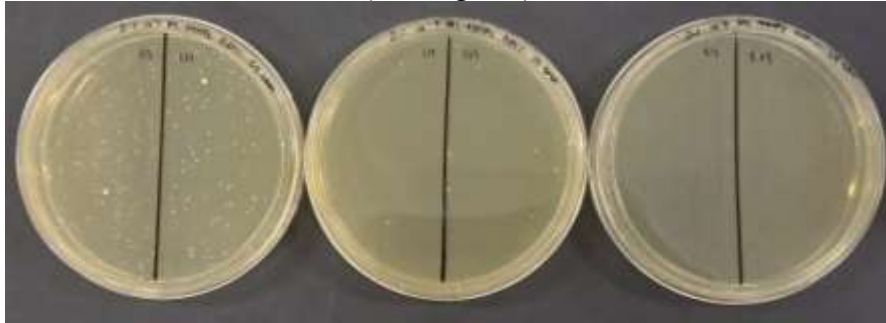


(ML-AgNPs)



Lampiran 11. Dokumentasi TPC pada Suhu Pendinginan ($\pm 2,0^{\circ}\text{C}$)

(ML-AgNPs)



Day 3
(Kontrol)



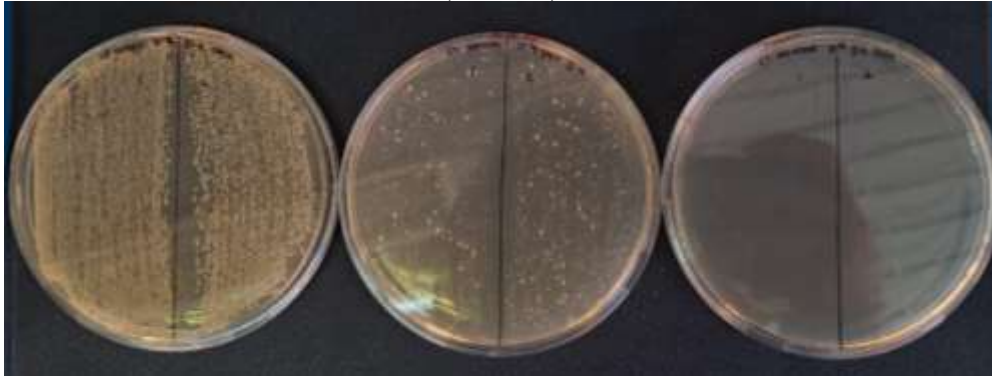
(Ekstrak Daun Melinjo)



(ML-AgNPs)



Day 4
(Kontrol)



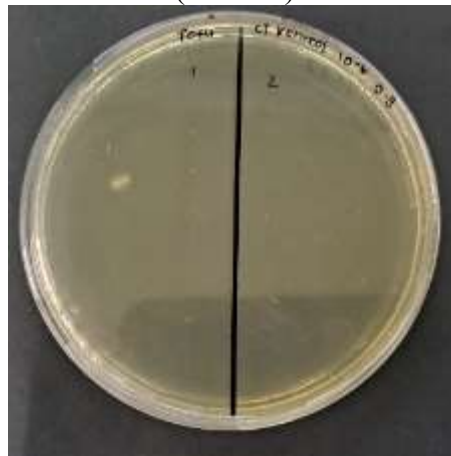
(Ekstrak Daun Melinjo)



(ML-AgNPs)



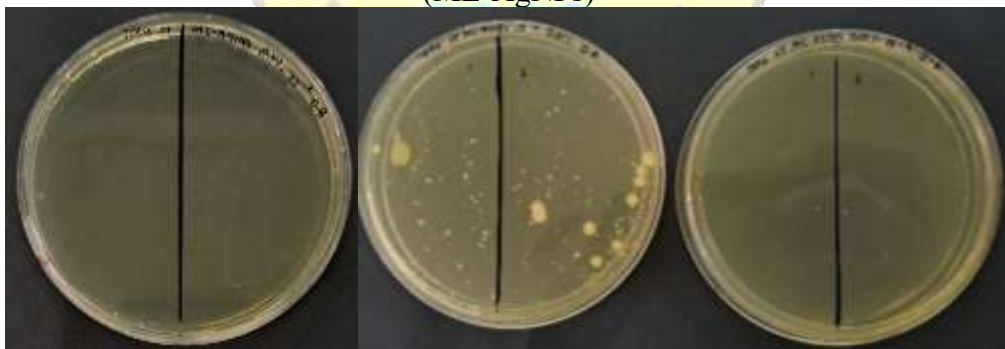
Day 8
(Kontrol)



(Ekstrak Daun Melinjo)



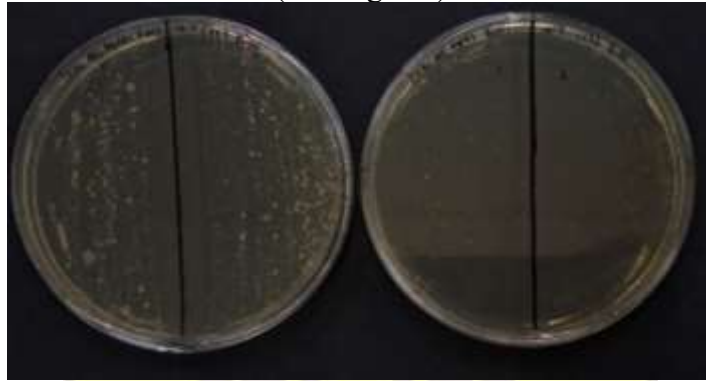
(ML-AgNPs)



Day 10
(Ekstrak Daun Melinjo)



(ML-AgNPs)



Lampiran 12. Persetujuan Proyek Penelitian

 UPM PUTRA <small>UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA</small> <small>PERTANJARAN UNIVERSITI KHAS NEKA</small>	
FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI MAKANAN FACULTY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY فاكولتسي سداين دن دان تكنولوجي ماکانان	
Serdang, Selangor, Malaysia, 5 August 2025	
TO WHOM IT MAY CONCERN	
<p>Ms. Dzakiran Asma Nurullah (Matrix No.: 223020057) is a students from Department of Food Technology, Faculty of Engineering, The Pasundan University, Bandung, Indonesia, intends to do inbound activity (Research attachment: Anti-Bacillus Activity of Green Synthesis of Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) Leaf Extract-Mediated Silver Nanoparticles (ML-AgNPs) and its Effect on Microbial population in Tofu) at Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia (UPM), from August 11th to September 10th 2025, under supervision Assoc. Prof. Dr. Yaya Rukayadi from Department of Food Science, Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia (UPM).</p>	
Thank you very much for your kind consideration.	
Best Regard	
 ASSOC. PROF. DR. YAYA RUKAYADI LECTURER Department of Food Science Faculty of Food Science and Technology Universiti Putra Malaysia 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia	
YAYA RUKAYADI, PhD. Associate Professor Department of Food Science, Faculty of Food Science and Technology Universiti Putra Malaysia – UPM 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia Mobile Phone: +60 1112307964 Fax.: +60-3-89423552	
<small> <input type="checkbox"/> Fakulti Sains dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia <input type="checkbox"/> 603-9769 8367 <input type="checkbox"/> http://food.upm.edu.my </small>	