

**ISOLASI DAN OPTIMASI PRODUKSI *BACTERIAL*
NANOCELLULOSE (BNC) OLEH MIKROBA ISOLAT LOKAL
Kc-S-1**

(Skripsi)

Oleh

**GISTA KUSUMA RINA
1717011003**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

ISOLASI DAN OPTIMASI PRODUKSI *BACTERIAL NANOCELLULOSE* (BNC) OLEH MIKROBA ISOLAT LOKAL Kc-S-1

Oleh

GISTA KUSUMA RINA

Produksi *Bacterial Nanocellulose* (BNC) dapat dioptimalkan dengan pemilihan sumber karbon dan sumber nitrogen yang tepat, sehingga waktu inkubasi produksi lebih cepat dan menghemat biaya produksi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri penghasil BNC dari kombucha dan memperoleh berat pelikel dan kecepatan produksi BNC yang optimal dari sumber karbon dan sumber nitrogen dengan berbagai variasi konsentrasi. Produksi BNC diawali dengan isolasi bakteri penghasil BNC. Kemudian dilakukan produksi BNC menggunakan sumber karbon dengan variasi konsentrasi 2%, 2,5%, 5%, 10% dan sumber nitrogen dengan variasi konsentrasi 1%, 1,5%, 2%, 2,5% pada keadaan statis dan agitasi dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya dilakukan pengukuran berat pelikel dan *Water Hold Capacity* (WHC) BNC. Lalu dilakukan analisis hidrolisis asam menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat Kc-S-1 mampu menghasilkan pelikel seberat 8,7 g dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis. Sumber karbon terbaik untuk produksi BNC adalah glukosa 5% yang menghasilkan pelikel seberat 4,0 g. Sumber nitrogen terbaik adalah *beef extract* yang menghasilkan pelikel seberat 5,7 g dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis. *Beef extract* 2% menghasilkan pelikel dengan berat terbaik sebesar 16,0 g pada waktu inkubasi 14 hari secara statis. Produksi BNC lebih baik pada kondisi statis dibandingkan dengan kondisi agitasi. WHC pada kondisi terbaik sebesar 97,5%. Analisis BNC menggunakan metode hidrolisis asam menghasilkan larutan berwarna kuning kecoklatan dan absorbansi sebesar 0,6022. Dapat disimpulkan bahwa sumber karbon jenis glukosa dan sumber nitrogen jenis *beef extract* mampu menghasilkan BNC yang optimal.

Kata Kunci: *Bacterial Nanocellulose* (BNC), sumber karbon, sumber nitrogen.

ABSTRACT

ISOLATION AND OPTIMIZATION OF PRODUCTION BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC) BY LOCAL ISOLATE MICROBES Kc-S-1

By

GISTA KUSUMA RINA

Production Bacterial Nanocellulose (BNC) can be optimized by selecting the right carbon source and nitrogen source, so that the production incubation time is faster and saves production costs. This study aimed to obtain isolates of BNC-producing bacteria from kombucha and obtain optimal pellicle weight and BNC production speed from carbon sources and nitrogen sources with various concentrations. BNC production begins with the isolation of BNC-producing bacteria. Then BNC production was carried out using carbon sources with various concentrations of 2%, 2.5%, 5%, 10% and nitrogen sources with varying concentrations of 1%, 1.5%, 2%, 2.5% in static and agitated conditions. speed 150 rpm. Subsequently, the pellicle weight and were measured Water Hold Capacity (WHC) BNC. Then the acid hydrolysis analysis was carried out using UV-Vis spectrophotometer. The results showed that Kc-S-1 isolate was able to produce pellicle weighing 8.7 g with an incubation time of 7 days statically. The best carbon source for BNC production is 5% glucose which produces a pellicle weighing 4.0 g. The best nitrogen source is beef extract which produced a pellicle weighing 5.7 g with an incubation time of 7 days statically. Beef extract 2% produced pellicle with the best weight of 16.0 g at 14 days incubation statically. BNC production was better under static conditions than agitated conditions. WHC in the best condition is 97.5%. BNC analysis using acid hydrolysis method produces a brownish yellow solution and an absorbance of 0.6022. It can be concluded that the carbon source type is glucose and the nitrogen source is type beef extract able to produce optimal BNC.

Keywords: Bacterial Nanocellulose (BNC), carbon source, nitrogen source.

**ISOLASI DAN OPTIMASI PRODUKSI *BACTERIAL NANOCELLULOSE*
(BNC) OLEH MIKROBA ISOLAT LOKAL**

Kc-S-1

Oleh

GISTA KUSUMA RINA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Penelitian : **ISOLASI DAN OPTIMASI PRODUKSI
BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC) OLEH
MIKROBA ISOLAT LOKALKC-S-1**

Nama Mahasiswa : **Gista Kusuma Rina**

NPM : 1717011003

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

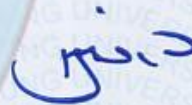
MENYETUJUI

Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA

Dosen Pembimbing



Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP 19720530 200003 2 001

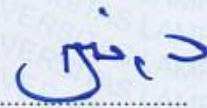


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

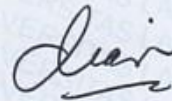
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

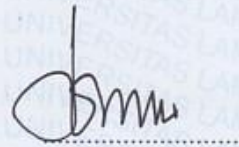
Ketua : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Dian Herasari, S.Si, M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **9 Agustus 2022**

PERNYATAAN

Nama : Gista Kusuma Rina

Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011003

Program Studi : S1 Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan skripsi yang berjudul, "**ISOLASI DAN OPTIMASI PRODUKSI *BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC)* OLEH MIKROBA ISOLAT LOKAL Ke-S-1**" ini tidak terdapat karya yang pernah dilakukan, ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ada pernyataan saya tidak benar maka saya bersedia dikenai sanksi sesuai hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 24 Agustus 2022

Yang Menyatakan



Gista Kusuma Rina
NPM. 1717011003

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Metro pada tanggal 19 Mei 1999, sebagai anak pertama, dari Bapak Ahamad Rifai dan Ibu Rini Puryani.

Pendidikan mulai dari Taman Kanak-kanak (TK) di TK Kartika Tama Punggur diselesaikan tahun 2006, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 1 Tanggul Angin, Punggur pada tahun 2007, SMP Negeri 1 Punggur lulus pada tahun 2014. Penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas pada tahun 2014 di SMA Negeri 1 Punggur, lulus pada tahun 2017. Tahun 2017, terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SNMPTN.

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) sebagai Kader Muda Himaki tahun 2017-2018, anggota Biro Penerbitan pada tahun (2018-2019 dan 2019-2020). Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas MIPA (BEM-FMIPA) sebagai Garuda BEM-FMIPA tahun 2017-2018, anggota divisi Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa tahun 2018-2019 dan Forum Komunikasi (Forkom) Bidikmisi sebagai Geforba Forkom Bidikmisi tahun 2017-2018, anggota Divisi Humas Media dan Informasi pada tahun (2018-2019 dan 2019-2020). Selama menjadi mahasiswa, pada tahun 2021 penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar untuk mahasiswa Kimia kelas A angkatan 2020 (FMIPA), Universitas Lampung.

MOTTO

“Maka bersabarlah kamu dengan sabar yang baik”

(QS. Al;Ma’arij: 5)

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”

(QS. Al-Insyirah: 5)

“Apapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalannya untuk menemukanmu”

(Ali bin Abi Thalib)

“Sesuatu akan terlihat tidak mungkin sampai semuanya selesai”

(Nelson Mandela)

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamiin. Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul "*Isolasi dan Optimasi Produksi Bacterial Nanocellulose (BNC) Oleh Mikroba Isolat Lokal Kc-S-1*" adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kimia di Universitas Lampung.

Teriring doa yang tulus, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orang tua yang selalu memberi cinta kasih, motivasi, pengorbanan, dukungan, dan doa untuk penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Adikku Gisti Kusuma Rani yang selalu memberi bantuan, motivasi, pengorbanan, dukungan, dan doa untuk penulis;
3. Keluarga besar Atmosuwito atas segala dukungan serta doa bagi penulis;
4. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku pembimbing atas kesediaannya untuk memberikan waktu, bimbingan, ide, semangat, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini;
5. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si, M.Si. selaku penguji atas kesediaannya memberikan waktu, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini;
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku penguji atas ketersediaannya memberikan waktu, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini;
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si, M.Si., selaku pembimbing akademik atas ketersediaannya memberikan arahan, motivasi, saran dan kritik dalam penyelesaian skripsi ini;

8. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T. selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Lampung;
9. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung;
10. Lucky Pahtoni Syahputra yang telah memberikan dukungan, semangat, motivasi dan doa untuk penulis;
11. Ibu Kepala Laboratorium dan PLP Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Lampung atas izinnya untuk melaksanakan penelitian hingga penelitian dapat terselesaikan;
12. Partner penelitian penulis Nurbaiti, dan Luthfi Azizah yang selalu membantu, menasehati dan memberikan motivasi bagi penulis selama ini;
13. Rekan-rekan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Lampung yang selalu membantu dan memberikan motivasi kepada penulis,
14. Kakak-kakak Mulyono *Research* 15 dan 16 Kak Mujahid, Kak Hani, Kak Nurmalia, Kak Maria, Kak Iwen, Kak Fina dan Kak Devi atas dukungan dan bantuannya selama ini hingga penelitian dapat terselesaikan;
15. Adik-adik Mulyono *Research* 18 Aprillia, Salsabilla, dan atas dukungan dan bantuannya selama ini hingga penelitian dapat terselesaikan;
16. Keluarga kimia 2017 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas kebersamaannya dalam melalui hari demi hari di kehidupan kampus;
17. Almamater tercinta, Universitas Lampung.

Bandar Lampung, 24 Agustus 2022

Gista Kusuma Rina

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Selulosa	4
2.1.1 Pengertian Selulosa	4
2.1.2 Struktur Selulosa	4
2.2 <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC)	5
2.2.1 Pengertian BNC.....	5
2.2.2 Struktur BNC.....	6
2.2.3 Sifat-sifat BNC.....	6
2.2.4 Aplikasi BNC	7
2.2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi BNC	8
2.3 Sumber Mikroba Penghasil BNC	8
2.4 Media Seleksi Bakteri Penghasil BNC.....	11
2.4.1 Medium Hestrin-Schramm (HS)	11
2.4.2 Medium Glukosa, Etanol, Ragi atau <i>Glucose, Ethanol, Yeast</i> (GEY)	12
2.5 Metode Produksi BNC	12
2.5.1 Kultur Statis.....	12
2.5.2 Kultur Agitasi.....	13
2.6 Pengukuran <i>Water Hold Capacity</i> (WHC) BNC	14
2.7 Sumber Karbon	14
2.8 Sumber Nitrogen	15
2.9 Hidrolisis Asam.....	16
2.10 Spektrofotometri UV-VIS	16

III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Waktu dan Tempat	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.2.1 Alat-alat	18
3.2.2 Bahan-bahan.....	18
3.3 Prosedur Kerja.....	18
3.3.1 Persiapan Alat	18
3.3.2 Tahap Pembuatan Media	19
3.3.3 Isolasi Bakteri Penghasil BNC.....	20
3.3.4 Pengaruh Optimasi Produksi BNC oleh Isolat Bakteri Terpilih	21
3.3.5 Pengukuran <i>Water Hold Capacity</i> (WHC) BNC	24
3.3.6 Analisis BNC Menggunakan Metode Hidrolisis Asam	25
3.4 Diagram Alir	26
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Isolasi Bakteri Penghasil BNC	27
4.2 Pengaruh Optimasi Produksi BNC oleh Isolat Kc-S-1	31
4.2.1 Pengaruh Sumber Karbon oleh Isolat Kc-S-1 pada Optimasi Produksi BNC.....	32
4.2.2 Pengaruh Sumber Nitrogen oleh Isolat Kc-S-1 pada Optimasi Produksi BNC	36
4.2.3 Pengaruh Agitasi oleh Isolat Kc-S-1 pada Optimasi Produksi BNC .	40
4.3 Pengukuran <i>Water Hold Capacity</i> (WHC) BNC	42
4.4 Analisis BNC Menggunakan Metode Hidrolisis Asam	44
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1 Simpulan.....	47
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penerapan BNC di berbagai bidang	7
2. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber karbon	22
3. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber nitrogen.....	23
4. Data pembuatan media dan hasil isolasi bakteri penghasil BNC dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis	28
5. Berat pelikel basah dan kering dari hasil produksi BNC oleh isolat Kc-S-1 dalam medium HS yang dimodifikasi dengan glukosa dan sukrosa	33
6. Berat pelikel dari sumber nitrogen dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis	36
7. Berat basah dan berat kering pelikel dari <i>beef extract</i> variasi konsentrasi 1, 1,5, 2 dan 2,5 % oleh isolat Kc-S-1 dengan waktu inkubasi 14 hari.....	38
8. Hasil pengukuran WHC dari sumber karbon glukosa dan sukrosa variasi konsentrasi 2 (kontrol), 2,5, 5 dan 10% oleh isolat Kc-S-1	43
9. Hasil pengukuran WHC dari sumber nitrogen kontrol (<i>yeast extract</i>), medium A1 (<i>beef extract</i>) dan medium A2 (<i>malt extract</i>) oleh isolat Kc-S-1	43
10. Hasil pengukuran WHC pada <i>beef extract</i> variasi konsentrasi 1, 1,5, 2 dan 2,5% oleh isolat Kc-S-1.....	44
11. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia selulosa (berupa polimer linier yang terdiri dari unit β -1,4 glikosidik).....	5
2. Diagram alir penelitian.....	26
3. Hasil inkubasi secara statis selama 7 hari dari isolasi bakteri penghasil BNC pada medium A (a), medium B (b) dan medium C (c).....	28
4. Hasil <i>spread plate</i> (cawan sebar) isolat Kc-S-1 (1), Kc-S-2 (2) dan Kc-S-3 (3) dengan waktu inkubasi 48 jam	29
5. Hasil <i>streak plate</i> (cawan gores) dari koloni Kc-S-1 dengan waktu inkubasi 48 jam.....	31
6. Hasil seleksi dengan medium GEY dari koloni Kc-S-1 dengan waktu inkubasi 48 jam.....	31
7. Hasil inkubasi secara statis selama 7 hari sumber karbon glukosa, variasi konsentrasi 2% (kontrol) (a), variasi konsentrasi 2,5% (b), variasi konsentrasi 5% (c) dan variasi konsentrasi 10% (d).....	34
8. Hasil inkubasi secara statis selama 7 hari sumber karbon sukrosa, variasi konsentrasi 2% (kontrol) (a), variasi konsentrasi 2,5% (b), variasi konsentrasi 5% (c) dan variasi konsentrasi 10% (d).....	35
9. Hasil inkubasi secara statis selama 7 hari sumber nitrogen, medium kontrol (<i>yeast extract</i>) (a), medium A1 (b), dan medium A2 (c).....	37
10. Hasil inkubasi secara statis selama 7 hari dari <i>beef extract</i> , variasi konsentrasi 1% (a), 1,5% (b), 2% (c) dan 2,5% (d).....	38
11. Hasil inkubasi secara statis selama 14 hari dari <i>beef extract</i> , variasi konsentrasi 1% (a), 1,5% (b), 2% (c) dan 2,5% (d)	38
12. Pelikel basah (a) dan pelikel kering (b), hasil inkubasi secara statis selama 14 hari dari <i>beef extract</i> variasi konsentrasi 2% oleh isolat Kc-S-1	40

13. Hasil agitasi selama 7 hari pada HS (kontrol) (a), dan variasi konsentrasi *beef extract* 1% (b), 1,5% (c), 2% (d) oleh isolat Kc-S-1 41
14. Hasil agitasi selama 14 hari pada HS (kontrol) (a), dan variasi konsentrasi *beef extract* 1% (b), 1,5% (c), 2% (d) oleh isolat Kc-S-1 42
15. Hasil hidrolisis asam larutan standar glukosa (a), larutan sampel glukosa (b) 45

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selulosa merupakan polimer yang tersusun dari monomer-monomer glukosa dengan ikatan β -1,4 glikosidik dalam rantai linear (Perez *et al.*, 2002) yang memiliki bentuk amorf dan kristalin (Rahmi, 2017). Pada umumnya selulosa disintesis oleh tumbuhan, namun bakteri mampu menghasilkan selulosa secara struktural mirip dengan selulosa tumbuhan melalui fermentasi. Selulosa dapat diubah menjadi *Bacterial Nanocellulose* (BNC) yang merupakan selulosa berukuran nano (Guo *et al.*, 2015). BNC adalah polimer alami yang disintesis oleh sejumlah spesies, diantaranya bakteri asam asetat dari spesies *Acetobacter*, *Komagataeibacter* dan *Gluconacetobacter* (Park *et al.*, 2019).

Dalam kondisi kultur statis, BNC yang dihasilkan dapat membentuk *pellicle* yang memiliki kemurnian tinggi, kristalinitas tinggi, transparansi tinggi, dan struktur halus (Chen *et al.*, 2018). Selain itu, serat BNC memiliki kapasitas menahan air yang tinggi karena memiliki ikatan hidrogen yang kuat dan banyak, mempunyai kekuatan tarik yang baik (Asthary dkk., 2020), kurangnya toksisitas, mudah dibiodegradasi dan kemudahan sterilisasi (Klemm *et al.*, 2011). Berdasarkan karakteristik tersebut, BNC dapat dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi diantaranya sebagai pembalut kulit yang terluka, bahan perancah untuk rekayasa jaringan, perbaikan jaringan, dan pengental untuk cat (Wee *et al.*, 2011).

Semakin berkembangnya bioteknologi, jumlah laporan terkait produksi BNC terus bertambah, sehingga para peneliti fokus pada peningkatan efisiensi proses produksi BNC. Peningkatan produksi BNC dapat dilakukan menggunakan isolat bakteri yang diisolasi dari berbagai sumber, seperti buah-buahan, limbah sayuran,

makanan fermentasi dan minuman fermentasi seperti kombucha. Kultur yang mengandung berbagai macam bakteri dan ragi dinamakan kultur kombucha, di antaranya *Acetobacter xylinum* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Irdawati dan Sari, 2020) yang dapat digunakan pada produksi BNC. BNC yang terbentuk dari isolat bakteri tersebut dinilai lebih efisien dan efektif dalam proses produksinya karena tidak membutuhkan waktu yang lama dan substrat yang banyak.

Produksi BNC diawali dengan proses isolasi untuk memperoleh isolat bakteri yang diinginkan lalu dimurnikan dengan cara skrining menggunakan metode *spread plate*, *streak plate* dan diseleksi pada medium GEY. Seperti penelitian yang dilakukan Nurikasari *et al.*, (2017) yang melaporkan hasil produksi BNC selama 7 hari inkubasi adalah pelikel BNC seberat 8,7 g oleh strain *Acetobacter xylinum* yang diisolasi dari kultur kombucha. Produksi BNC dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu strain bakteri, medium pertumbuhan, kondisi lingkungan, dan pembentukan produk sampingan (Sarkono dkk., 2017). Medium pertumbuhan mengandung sumber karbon, sumber nitrogen dan nutrisi lainnya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel bakteri dan produksi BNC (Jacek *et al.*, 2019). Dengan pemilihan sumber karbon dan sumber nitrogen yang tepat, produksi BNC dapat dimaksimalkan. Sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini adalah glukosa dan sukrosa sedangkan sumber nitrogen yang digunakan pada penelitian ini digantikan dengan sumber nitrogen organik seperti *beef extract* dan *malt extract* yang dapat mempercepat produksi BNC (Subagiyo dkk., 2016).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh isolat bakteri penghasil BNC dari kombucha.
2. Memperoleh BNC dengan berat pelikel dan kecepatan produksi yang optimal dari sumber karbon dan sumber nitrogen dengan berbagai variasi konsentrasi oleh mikroba isolat lokal Kc-S-1.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah agar dapat memberikan informasi mengenai isolasi dan optimasi produksi BNC oleh mikroba isolat lokal Kc-S-1.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Selulosa

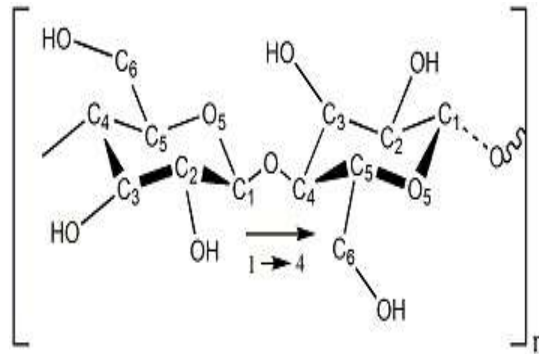
2.1.1 Pengertian Selulosa

Selulosa merupakan polimer utama di bumi dan memiliki nilai ekonomi yang besar secara global. Selulosa memiliki arti sebagai proses pemecahan menjadi senyawa atau unit-unit glukosa yang lebih kecil. Selain dihasilkan oleh tumbuhan, selulosa juga dihasilkan oleh mikroba, utamanya bakteri. Selulosa yang diproduksi oleh bakteri mempunyai kelebihan dari kemurnian struktur kimianya, berbeda dengan selulosa tumbuhan yang biasanya berasosiasi dengan lignin dan hemiselulosa (Sarkono dkk., 2015). Selulosa pada lingkungan aerobik akan terurai menjadi glukosa dan karbondioksida yang akan bergabung ke dalam sel yang sedang tumbuh, sedangkan selulosa pada lingkungan anaerobik akan terurai menjadi alkohol dan asam organik (Nofu dkk., 2014). Beberapa genus bakteri yang dapat mensintesis selulosa adalah *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Cellivibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Poliangium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Cellfalcicula*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017), *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* dan *Sarcina* (Park *et al.*, 2019).

2.1.2 Struktur Selulosa

Selulosa merupakan senyawa polimer anhidrat yang terdiri dari 100 - 1500 unit glukosa dengan ikatan β -1,4 glikosidik dalam rantai linear, dimana C-1 pada setiap glukosa berikatan dengan C-4 pada glukosa selanjutnya (Gambar 1). Setiap unit glikosidik mengandung tiga gugus hidroksil yang memberikan selulosa

karakteristik hidrofilisitas dan biodegradabilitas. Rantai panjang selulosa terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen dan gaya Van Der Waals (Perez *et al.*, 2002).



Gambar 1. Struktur kimia selulosa (berupa polimer linier yang terdiri dari unit β - 1,4 glikosidik) (Sumber : Effendi dkk., 2015).

2.2 *Bacterial Nanocellulose (BNC)*

2.2.1 *Pengertian BNC*

BNC adalah biomaterial berukuran nano yang juga dikenal sebagai nanoselulosa bakterial (Guo *et al.*, 2015). BNC diekskresikan pada antarmuka media sebagai fibril berbentuk pita, dengan lebar kurang dari 100 nm, yang terdiri dari nanofibril berukuran 2-4 nm yang jauh lebih halus. Dimensi ukuran yang dimiliki BNC dapat membuat BNC mempunyai luas permukaan yang tinggi serta jumlah gugus hidroksil yang tinggi sehingga memudahkan jika dilakukan modifikasi permukaan (Corral *et al.*, 2017).

Bakteri penghasil BNC berasal dari jenis bakteri gram negatif seperti *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*. Selain itu, bakteri dari genus *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* dan *Sarcina* dapat mensintesis BNC dari glukosa dan berbagai sumber karbon lainnya. BNC dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik yang murni secara kimiawi dan ekstraseluler, mendukung kelangsungan hidupnya di lingkungan alami karena sel-sel disimpan di permukaan media kultur, terperangkap di dalam membran seperti kulit agar-agar, yang terdiri dari serat selulosa. Imobilisasi sel mendorong

pengangkutan nutrisi dan oksigen yang efisien, yang penting bagi bakteri aerob ini. Karena kapasitas menahan air yang tinggi (air menyumbang sekitar 98% berat membran basah) polisakarida ini melindungi produsennya dari pengeringan. Matriks BNC juga melindungi bakteri penghasilnya dari faktor lingkungan merugikan lainnya, seperti radiasi UV (Rojas, 2016).

2.2.2 Struktur BNC

BNC memiliki struktur dengan panjang sekitar 100 μm dan diameter 100 nm yang terdiri dari bundel nanofibril selulosa dengan diameter 2-4 nm. Jarak rata-rata antara titik persimpangan adalah $0,523 \pm 0,273 \mu\text{m}$, sedangkan sudut rata-rata yang dibentuk oleh segmen dan sumbu x dari nanofibril adalah $85,64 \pm 0,56^\circ$. Kekuatan tarik pelikel BNC telah diukur pada 2 MPa, yang merupakan nilai yang sangat baik ketika mempertimbangkan daya serap air 99% (Fengel *and* Wegener, 1984).

2.2.3 Sifat-sifat BNC

BNC dengan rantai panjang mempunyai sifat fisik yang lebih kuat, lebih tahan lama terhadap degradasi yang disebabkan oleh pengaruh panas, bahan kimia maupun pengaruh biologis. Sifat dari BNC yang penting adalah panjang, lebar dan tebal molekulnya.

Sifat lain dari BNC yaitu :

- a. Dapat terdegradasi oleh hidrolisa, oksidasi, fotokimia maupun secara mekanis sehingga berat molekulnya menurun.
- b. Tidak larut dalam kebanyakan pelarut, tetapi dapat dilarutkan oleh beberapa asam pekat, seperti asam sulfat (72%), asam klorida (41%) dan asam trifluoroasetat (100%). Asam maupun enzim dapat menghidrolisis BNC menjadi monosakarida.
- c. Dalam keadaan kering, BNC bersifat higroskopis, keras dan rapuh. Bila BNC cukup banyak mengandung air maka akan bersifat lunak. Jadi fungsi air disini adalah sebagai pelunak.
- d. BNC dalam kristal mempunyai kekuatan lebih baik jika dibandingkan dengan bentuk amorfnya (Fengel *and* Wegener, 1984).

Sedangkan menurut Harsini dkk., (2010) sifat-sifat serat BNC adalah sebagai berikut :

- a. Memiliki kekuatan tarik yang tinggi.
- b. Mampu membentuk jaringan.
- c. Tidak mudah larut dalam air, alkali dan pelarut organik.
- d. Relatif tidak berwarna.
- e. Memiliki kemampuan mengikat yang lebih kuat.

BNC yang disintesis oleh spesies *Acetobacter* memiliki sifat-sifat unik yang dihasilkan dari peran biologis alaminya, seperti hidrofilitas tinggi, kristalinitas, kemurnian dan kapasitas menahan air, daya tahan mekanik dan ketahanan terhadap degradasi, biokompatibilitas yang sangat baik dan kurangnya sitotoksitas dan alergenitas (Stanislawski, 2016).

2.2.4 Aplikasi BNC

BNC dapat digunakan dalam bidang biomedis, teknologi pangan, kertas, industri elektronik dan arsitektur (Stanislawski, 2016). Aplikasi pada bidang lainnya dapat dilihat pada Tabel. 1

Tabel 1. Penerapan BNC di berbagai bidang

Bidang	Aplikasi
Medis	Bahan ganti (kulit tiruan), implan vaskular, implangigi
Kosmetik	Penstabil emulsi (krim, tonik), komponen kuku buatan
Industri kertas	Ketas dengan karakteristik khusus, memperbaiki buku-buku tua, uang kertas tahan lama
Perlindungan lingkungan	Air ultrafiltrasi, pengolahan limbah, penyerapan polusi minyak, racun
Akustik	<i>Speaker membrane</i>
Ilmu Pengetahuan	Imobilisasi protein, kromatografi, komponen mediakultur

Sumber: Stanislawski (2016).

2.2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi BNC

Untuk memperoleh hasil produksi BNC yang tinggi, kondisi kultur memiliki pengaruh yang penting seperti faktor sumber karbon, sumber nitrogen, temperatur, pH dan media fermentasi. Bakteri paling efisien bila dipasok dengan sumber karbon dan sumber nitrogen yang melimpah (Hamad dan Kristiono, 2013).

Glukosa dan sukrosa adalah sumber karbon yang paling umum digunakan untuk produksi BNC, sedangkan fruktosa, maltosa, xilosa, pati dan gliserol telah dicoba tetapi hasilnya tidak sebaik glukosa dan sukrosa. Terkadang, etanol dapat digunakan untuk meningkatkan produksi BNC. Masalah penggunaan glukosa adalah bahwa asam glukonat dibentuk sebagai produk sampingan yang menurunkan pH kultur dan menurunkan produksi BNC. Penelitian telah menunjukkan bahwa produksi asam glukonat dapat menurun dengan adanya liginosulfonat. Penambahan asam organik, khususnya asam asetat, juga membantu meningkatkan hasil produksi BNC. Studi penggunaan media molase dalam fermentor toples serta komponen tambahan tetes tebu pada strain bakteri tertentu telah dipelajari dengan hasil yang menunjukkan peningkatan produksi BNC.

Faktor lingkungan yang mempengaruhi produksi BNC adalah pH, suhu dan oksigen terlarut. Menurut studi eksperimental, suhu optimal untuk produksi maksimum adalah antara 28 dan 30 °C. Untuk kebanyakan spesies, pH optimal adalah antara 4-6 (Melliawati dan Djohan, 2013). Mengontrol pH sangat penting dalam kultur statis karena akumulasi asam glukonat, asetat atau laktat menurunkan pH jauh lebih rendah daripada kisaran optimal. Kandungan oksigen terlarut dapat divariasikan dengan kecepatan pengadukan karena diperlukan untuk biakan statis dimana substrat perlu diangkut melalui difusi (Hamad dan Kristiono, 2013).

2.3 Sumber Mikroba Penghasil BNC

BNC dihasilkan oleh isolat bakteri yang diisolasi dari berbagai sumber, diantaranya buah-buahan, limbah sayuran, makanan fermentasi dan minuman fermentasi.

a. Buah-buahan dan Limbah Sayuran

Salah satu sumber sampah terbanyak adalah sisa buah-buahan dan sayur sayuran yang banyak terdapat di pasar tradisional. Sampah pasar sayur-sayuran dan buah-buahan jenisnya relatif seragam, sebagian besar (95%) berupa sampah organik sehingga lebih mudah ditangani. Sampah organik sayuran dan buah-buahan ini tersusun atas bahan organik dan serat tinggi seperti selulosa. Selulosa adalah karbohidrat yang paling umum terdapat pada tanaman di seluruh dunia. Bakteri yang telah diteliti sebagai penghasil selulosa antara lain seperti *Scopulariopsis brevicaulis*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium* dan *Cellulomonas*. Sampah organik sayur-sayuran dan buah-buahan yang tersusun atas bahan organik seperti selulosa yang sangat berpotensi untuk dijadikan bahan baku pembuatan biogas (Supriyatna *et al.*, 2012).

b. Makanan fermentasi

Roti dan produk fermentasi lainnya tetap menjadi makanan pokok selama ribuan tahun. Di masa lalu peran utama roti adalah penyediaan energi yang sederhana, tetapi dalam beberapa tahun terakhir peran yang dimainkan produk berbasis gandum dalam memberikan manfaat nutrisi tambahan. Adonan roti mengembang bila dicampur ragi, hal tersebut dapat terjadi karena dalam respirasinya, ragi memakai cara anaerob sehingga membentuk alkohol. Bagi ragi, alkohol hanya merupakan limbah. Karbondioksida yang dihasilkan pada peragian alkohol dilepaskan dalam bentuk gelembung-gelembung yang lepas dari cairan atau medium lainnya tempat ragi hidup di dalamnya. Gelembung-gelembung karbondioksida yang dibebaskan inilah yang menyebabkan adonan roti mengembang. Secara sederhana adonan roti terdiri dari tepung (gandum), air, garam, dan ragi di mana ragi yang paling umum digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* (Corral *et al.*, 2017).

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan di bidang mikrobiologi pangan, banyak ditemukan bakteri asam laktat dalam makanan fermentasi yang dapat menghasilkan senyawa bakteriosin dan senyawa anti bakteri lainnya. Korea Selatan terkenal dengan salah satu makanan fermentasinya ialah kimchi. Kimchi

merupakan makanan tradisional hasil fermentasi dari asinan sayur dengan campuran bumbu pedas. Kimchi selalu dihidangkan di atas piring-piring kecil dalam porsi kecil sebagai salah satu jenis lauk-pauk paling umum dan terkadang wajib dihidangkan. Pengolahan kimchi yang sederhana kini menjadi salah satu produk pangan fungsional karena terdapat bakteri yang bersifat probiotik dalam menjaga kesehatan usus, membantu penyerapan makanan, produksi vitamin dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Pada bahan-bahan fermentasi kimchi terdapat nutrisi yang diperlukan bakteri untuk berkembang biak. Bakteri pada fermentasi kimchi akan menghasilkan asam laktat yang dapat mengawetkan atau memiliki daya anti bakteri. Hasil dari beberapa penelitian ditemukan adanya bakteri genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Weissella* dalam fermentasi Kimchi (Yolanda dan Meitiniarti, 2017).

c. Minuman fermentasi

Kombucha berasal dari kata “kombu” dan “cha”. Kombu berasal dari nama seorang tabib dari Korea dan cha berarti teh. Kombucha merupakan salah satu olahan teh fermentasi yang dibuat dari seduhan teh dan gula pasir yang memanfaatkan hasil samping dari *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY), yang berupa senyawa-senyawa asam dan nata (selulosa) (Irdawati dan Sari, 2020). SCOBY adalah biopolimer selulosa yang terdiri dari interaksi bakteri asam asetat dan ragi. SCOBY dapat dibentuk melalui proses fermentasi kombucha. Minuman teh kombucha ini telah dikenal luas di seluruh dunia yaitu di Rusia, Jepang, Polandia, Jerman, Bulgaria dan negara-negara Eropa Timur. Sementara di Indonesia minuman kombucha baru dikenal sebatas minuman tradisional (Hassmy dkk., 2017).

Kultur kombucha merupakan kumpulan dari bakteri dan jamur yang membentuk substansi gelatinoid yang tumbuh mengikuti bentuk wadahnya. Lapisan kombucha yang akan terbentuk dipermukaan yaitu dengan ketebalan 2,5-3,5 cm. Kultur kombucha mengandung berbagai macam bakteri dan ragi, di antaranya *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces intermedius*, *Candida fomatata*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces torula, *Torulasporea delbrueckii* *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces bailii* dan *Zygosaccharomyces rou* (Irdawati dan Sari, 2020). Sel ragi akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa untuk produksi etanol, sedangkan bakteri akan mengubah glukosa menjadi asam glukonat dan fruktosa akan membentuk asam asetat (Nurikasari *et al.*, 2017).

Strain bakteri penghasil BNC yang dilaporkan paling efisien adalah *Acetobacter xylinum*, yaitu strain gram negatif dari bakteri penghasil asam asetat, aerobik, mampu menghasilkan BNC pada suhu antara 25 dan 28°C dan pH dari 3 sampai 7. Bakteri *Acetobacter xylinum* menghasilkan enzim ekstraseluler polimerase yang dapat menyusun (mempolimerisasi) glukosa menjadi ribuan rantai (homopolimer) serat atau selulosa. Dari jutaan bakteri yang tumbuh dalam media, akan dihasilkan jutaan lembar benang-benang selulosa yang akhirnya nampak padat berwarna putih hingga transparan, yang disebut nata (Wibowo *and* Isroi, 2015).

2.4 Media Seleksi Bakteri Penghasil BNC

2.4.1 Medium Hestrin-Schramm (HS)

Medium HS adalah media produksi yang umum digunakan untuk biosintesis BNC dengan nutrisi yang dapat memicu pertumbuhan sel bakteri yang dapat menghasilkan BNC. Komposisi dari medium ini adalah glukosa sebagai sumber karbon, pepton dan *yeast extract* (ekstrak ragi) sebagai sumber nitrogen, Na₂HPO₄ sebagai larutan penyangga, asam sitrat dan asam asetat sebagai pengatur pH, dan akuades sebagai pelarut dan sumber mineral bagi bakteri (Silitonga dan Zul, 2020). Beberapa penelitian juga menyimpulkan bahwa penambahan ekstrak ragi dll secara signifikan meningkatkan efisiensi sintesis BNC (Nguyen *et al.*, 2022). Medium HS hanya mengandung glukosa sebagai sumber karbon tunggal. Medium HS dibagi menjadi dua jenis yaitu medium HS agar pada cawan petri atau tabung reaksi dan medium HS cair pada Erlenmeyer atau gelas piala yang digunakan untuk media starter dan media fermentasi. Komposisi dalam pembuatan medium HS agar yaitu 2 g glukosa, 0,5 g pepton, 0,5 *yeast extract agar*, 0,27 g Na₂HPO₄, 0,12 g asam sitrat dan 1,5 g bubuk agar, ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL

akuades. Komposisi medium HS cair sama dengan medium HS agar, namun pada medium HS tidak ditambahkan bubuk agar (Park *et al.*, 2019).

2.4.2 Medium Glukosa, Etanol, Ragi atau *Glucose, Ethanol, Yeast* (GEY)

Medium GEY merupakan media seleksi padat pada isolasi dan produksi BNC. Pembuatan medium GEY terdiri dari 2 g glukosa, 1 g *yeast extract agar*, 2 g bubuk agar dan 0,3 g CaCO₃ yang dilarutkan dalam 100 mL akuades yang kemudian ditambahkan etanol 5 mL. Isolat diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan ditotolkan pada medium GEY lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C hingga terbentuk zona bening di sekitar koloni. Koloni yang menghasilkan zona bening menandakan adanya produksi asam asetat dari bakteri tersebut, karena BNC merupakan kelompok bakteri asam asetat (Rahma dan Zul, 2020). Kemudian diukur diameter koloni dan diameter zona bening di sekitar koloni menggunakan jangka sorong (Khaerunnisah, 2018) dan dicatat untuk dihitung nilai indeks halo nya. Semakin tinggi nilai indeks halo pada koloni maka koloni yang dihasilkan semakin baik.

2.5 Metode Produksi BNC

Metode produksi BNC saat ini adalah statis dan agitasi. Fermentasi akan dominan untuk memenuhi permintaan komersial. Fermentasi adalah proses metabolisme yang mengubah gula menjadi asam, gas atau alkohol. Itu terjadi pada ragi dan bakteri, juga dalam sel yang kekurangan oksigen. Fermentasi juga digunakan lebih luas untuk merujuk pada pertumbuhan mikroorganisme pada medium pertumbuhan, seringkali dengan tujuan menghasilkan produk kimia tertentu. Proses fermentasi yang digunakan untuk menghasilkan BNC adalah kultur statis dan agitasi.

2.5.1 Kultur Statis

Kultur statis adalah metode produksi BNC yang relatif sederhana dan banyak digunakan untuk produksi. Media ditempatkan dalam Erlenmeyer atau nampan dangkal, diinokulasi dan diolah selama 7-21 hari sampai BNC hampir mengisi baki. Produksi BNC berhubungan langsung dengan daerah permukaan udara-cair

ketika kedalaman kurang dari 4,5 cm. Properti mengambang dari pelikel BNC adalah karena CO terperangkap gelembung yang dihasilkan dari metabolisme bakteri. Melalui media statis, BNC dengan kekuatan tarik unggul, tingkat kristalinitas yang lebih tinggi dan polimerisasi yang lebih tinggi diperoleh. Itu sebabnya aplikasi utama BNC yang diperoleh oleh kultur statis adalah di bidang medis. Lebih banyak nanofibril terbentuk dalam kultur statis dibanding pada kultur agitasi.

2.5.2 Kultur Agitasi

Agitasi dilakukan dengan tujuan agar dapat menjaga pasokan dan distribusi oksigen dapat tetap homogen dibanding dengan kondisi statis yang dilakukan tanpa putaran. Oksigen adalah salah satu faktor penting dalam menghasilkan BNC. Kondisi agitasi meningkatkan luas permukaan dengan udara dan media dan juga meningkatkan produksi BNC. Kecepatan pengadukan selama kultivasi adalah salah satu parameter penting yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas BNC yang disintesis. Variasi kecepatan agitasi yang sering digunakan dalam penelitian adalah 100, 150, dan 200 rpm, tetapi pada kecepatan 200 rpm nilai *yield* yang didapat menjadi turun (Pa'e *et al*, 2011).

Konsentrasi oksigen terlarut semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kecepatan perputaran rotasi tetapi semakin cepat perputaran rotasi akan menurunkan produksi BNC karena kultur semakin tidak stabil. Semakin tinggi kecepatan agitasi semakin kecil pula ukuran partikel BNC yang terbentuk. Hal ini disebabkan strain bakteri dan kondisi kultur fermentasi yang digunakan dapat mempengaruhi *yield* BNC yang dihasilkan (Asthary dkk., 2020). Pada kultur agitasi massa pelikel tidak beraturan atau struktur BNC fibrial terbentuk dan didistribusikan dalam medium.

Metode agitasi paling banyak dipelajari di tingkat industri karena menghasilkan tingkat transfer oksigen yang lebih tinggi, sehingga mendukung produksi BNC. Dalam kondisi agitasi tertentu, bakteri diamati untuk menghasilkan manik-manik BNC bola. Namun, metode agitasi dapat menginduksi mutabilitas seluler sehingga hilangnya kapasitas produktif BNC dan BNC yang diproduksi menunjukkan

tingkat polimerisasi, kristalinitas, dan kekuatan mekanik yang rendah. Bentuk BNC yang tidak teratur disebabkan oleh tegangan geser selama agitasi (Neera, *et al.*, 2015). Kultur agitasi tidak banyak nanofibril yang terbentuk, karena ketika serat pada agitasi kehilangan kualitas dan secara mekanis agitasi memodifikasi serat BNC. Masa inkubasi tergantung pada sistem budaya. Biasanya, kondisi agitasi diinkubasi 24 sampai 72 jam sedangkan periode budidaya kultur statis adalah 7 atau 14 hari (Rodriguez, 2017).

2.6 Pengukuran *Water Hold Capacity* (WHC) BNC

Pengukuran WHC bertujuan untuk mengukur daya serapnya, kandungan lembaran pelikel basah terdiri dari BNC (0,9%), air (99%) dan lain-lain yaitu protein, asam-asam organik dan gula (0,1%). Sehingga walaupun dilakukan proses pengeringan pelikel maka kandungan air masih tersisa dalam lembaran pelikel hasil pengeringan, karena WHC pelikel segar sangat tinggi berkisar antara 95,74% sampai 98% (Nurikasari *et al.*, 2017). Air bebas dapat dihilangkan dengan mudah melalui berbagai bentuk dehidrasi, sementara air yang terikat dipertahankan dan melekat pada serat BNC melalui adsorpsi dan pembentukan kapiler antara 0,5 dan 1 mikrometer (Rodriguez, 2017).

2.7 Sumber Karbon

Sumber karbon merupakan faktor penting yang mempengaruhi peningkatan produk dan energi biosintesis pada mikroorganisme (Zuhri dkk., 2013). Sumber karbon terdiri dari glukosa, fruktosa, manitol, sukrosa, laktosa dan maltosa. Sumber karbon merupakan komponen penting dalam media mikroorganisme sebagai sumber energi untuk pertumbuhan bakteri dan dapat meningkatkan kemampuan untuk menghasilkan senyawa metabolit (Wulandari dkk., 2020). Sebagian besar parameter yang dievaluasi adalah konsentrasi dari sumber karbon sebagai surfaktan. Karbohidrat adalah sumber utama karbon dan energi yang membentuk komponen penting dalam media bakteri untuk pertumbuhan dan fungsionalitas yang normal. Dengan demikian, pertumbuhan dan aktivitas

metabolisme bakteri dapat dipengaruhi oleh kesediaan sumber karbon (Hayek *and* Ibrahim, 2013)

Untuk mengetahui prosentase massa gula yang terkandung di dalam massa larutan gula yang ditambah dengan massa pelarutnya, diukur menggunakan alat refraktometer brix. Refraktometer brix telah banyak digunakan untuk menentukan konsentrasi zat-zat seperti obat-obatan, makanan, jus buah, formula diet dan larutan nutrisi parenteral, juga bisa untuk mengukur sensitifitas indeks bias pada suhu kamar dengan menggunakan tiga jenis larutan: garam, gula dan etilena glikol. Sebuah parameter yang cocok untuk mendeteksi kandungan glukosa dari suatu larutan air murni dengan teknik yang sederhana dan memungkinkan pengukuran secara langsung. Satuan skala pembacaan kadar brix adalah % brix (Hidayanto dkk., 2012).

2.8 Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen merupakan komponen utama dalam suatu media kultur yang dibutuhkan bakteri untuk proses pertumbuhan sel dan produksi BNC (Doresti dkk., 2018). Produksi selulosa tidak hanya tergantung pada strain tetapi juga tergantung pada bahan media dan kondisi budidaya untuk mencapai produksi tertinggi (Rangaswamy dkk., 2014).

Mikroba penghasil BNC akan mengekskresikan selulosa keluar dari selnya ketika dilingkungannya tersedia sumber nitrogen (Sarkono dkk., 2017). Penyediaan sumber nitrogen dilakukan dengan penambahan atau penggantian dengan sumber nitrogen organik seperti *beef extract* dan *malt extract* serta kombinasi diantaranya (Subagiyo dkk., 2016). Dalam medium pertumbuhan bakteri telah tersedia nutrisi yang mampu mencukupi keberlangsungan hidup bakteri, namun diperlukan penambahan nutrisi agar pertumbuhan optimal sesuai dengan jenis bakterinya. Optimasi dan kebutuhan nutrisi yang berbeda menjadi hal yang penting dalam pertumbuhan, dimana sumber nitrogen yang ada pada nutrisi memiliki konsentrasi yang baik dapat mempercepat produksi dari bakteri (Doresti dkk., 2018).

2.9 Hidrolisis Asam

Hidrolisis berasal dari bahasa Greek dari kata hydor yang berarti air dan lisis yang berarti kehilangan. Hidrolisis adalah pemecahan kimiawi suatu molekul karena pengikatan air, menghasilkan molekul-molekul yang lebih kecil (Aniriani dkk., 2018). Hidrolisis asam pertama kali diperkenalkan oleh Nickerson dan Habrle pada tahun 1947. Mereka menemukan bahwa degradasi selulosa dalam kondisi asam dan suhu tinggi berhenti hingga kondisi seluruh fase amorf telah terdegradasi sempurna dan hanya menyisakan fase kristal selulosa (Fatriasari dkk., 2019). Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat (H_2SO_4), asam perklorat, dan HCl. Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam (Aniriani dkk., 2018). Reaksi dengan H_2SO_4 pekat akan menghasilkan fase kristal dengan gugus sulfat yang bermuatan negatif pada permukaan selulosa melalui substitusi sebagian gugus OH pada C6. Hidrolisa asam menyebabkan kontak dengan permukaan kristalin dan merusak bagian amorf pada selulosa, sehingga partikel nanokristalin lebih mudah untuk diisolasi (Khaerunnisah, 2018).

2.10 Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri UV-Vis (Ultra Violet-Visible) adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibanding kualitatif. Spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu dari sekian banyak instrumen yang biasa digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer umum digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa begitu banyak senyawa kimia serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel apabila dibandingkan dengan beberapa metode analisa (Fahmia, 2017).

Prinsip metode ini, seberkas sinar dilewatkan pada analit, setelah melewati analit, intensitas cahaya berkurang sebanding dengan banyaknya cahaya yang diserap

molekul analit. Intensitas cahaya sebelum dan sesudah melewati bahan diukur dan dapat ditentukan konsentrasi bahan yang bersangkutan. Suatu analit hanya menyerap sinar pada panjang gelombang tertentu, dan jumlah cahaya yang diserap oleh analit menghasilkan suatu signal elektrik yang ditangkap oleh detektor. Cahaya yang diserap oleh analit diukur sebagai absorbansi (A) dan cahaya yang dihamburkan diukur sebagai transmitansi (T) dan dinyatakan dengan hukum lambert-beer (Rahmi, 2017).

Cara kerja spektrofotometer secara singkat adalah sebagai berikut : tempatkan larutan pembanding, misalnya blangko dalam sel pertama sedangkan larutan yang akan dianalisis pada sel kedua. Kemudian pilih foto sel yang cocok 200nm-650nm agar daerah λ yang diperlukan dapat terliputi. Dengan ruang foto sel dalam keadaan tertutup “no” galvanometer didapat dengan menggunakan tombol dark-current. Pilih h yang diinginkan, buka fotosel dan lewatkan berkas cahaya pada blangko dan “no” galvanometer didapat dengan memutar tombol sensitivitas. Dengan menggunakan tombol transmitansi, kemudian atur besarnya pada 100%. Lewatkan berkas cahaya pada larutan sampel yang akan dianalisis. Skala absorbansi menunjukkan absorbansi larutan sampel (Fahmia, 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2021 - Mei 2022 bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas piala, pipet tetes, gelas ukur, toples kaca, bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), Spektrofotometer UV-Vis, cawan petri, autoklaf, kertas saring, rak tabung, neraca digital, kasa, kapas, kain, jarum ose, inkubator, mikropipet, corong pisah, mortar, alu, *shaker*, *cutter* dan penangas air.

3.2.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel kombucha yang berasal dari Semarang, glukosa, sukrosa, pepton, *yeast extract agar*, *yeast extract powder*, *beef extract*, *malt extract*, Na_2HPO_4 , asam sitrat, NaOH, NaCl, H_2SO_4 2 M, akuades, bubuk agar, dan etanol.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Persiapan Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dicuci, dikeringkan, dibungkus menggunakan kertas lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit

dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kemudian alat-alat gelas tersebut dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 100°C selama 15 menit. Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang tidak diinginkan.

3.3.2 Tahap Pembuatan Media

Isolat bakteri penghasil BNC dari kombucha ditumbuhkan pada medium standar HS. Untuk media agar miring menggunakan HS agar, sedangkan untuk media starter dan media fermentasi menggunakan HS cair.

Adapun komposisi dan cara pembuatan sebagai berikut:

a. Medium HS Agar

Pembuatan medium HS agar yaitu sebanyak 2 g glukosa, 0,5 g pepton, 0,5 g *yeast extract agar*, 0,27 g Na₂HPO₄, 0,12 g asam sitrat dan 1,5 g bubuk agar, ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades. Medium lalu dipanaskan hingga bahan larut dan pH medium dibuat menjadi 6. Medium lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Lalu medium dituangkan dalam cawan petri atau tabung reaksi (Park *et al.*, 2019).

b. Medium HS Cair

Pembuatan medium HS cair terdiri dari 2 g glukosa, 0,5 g pepton, 0,5 g *yeast extract powder*, 0,27 g Na₂HPO₄, dan 0,12 g asam sitrat, ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades. Medium lalu dipanaskan hingga bahan larut dan pH medium dibuat menjadi 6. Kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Lalu medium dituangkan dalam tabung reaksi atau gelas piala (Park *et al.*, 2019).

c. Medium Glukosa, Etanol, Ragi atau *Glucose, Ethanol, Yeast* (GEY)

Pembuatan medium GEY yang terdiri dari 2 g glukosa, 1 g *yeast extract agar*, 2 g bubuk agar dan 0,3 g CaCO₃, ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades. Medium lalu dipanaskan hingga bahan larut. Kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Park *et al.*, 2019).

Medium yang telah disterilisasi, kemudian dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow* (LAF). Medium ditunggu hingga panas berkurang, lalu ditambahkan 5 mL etanol dan dituang kedalam cawan petri.

3.3.3 Isolasi Bakteri Penghasil BNC

Sampel yang digunakan adalah kombucha yang berasal dari Semarang. Inokulan kombucha dimasukkan ke dalam 3 gelas piala berbeda. Pada medium A dimasukkan inokulan sebanyak 15 mL, medium B sebanyak 10 mL dan medium C sebanyak 5 mL. Selanjutnya ditambahkan medium HS cair pada masing-masing gelas piala, medium A ditambahkan sebanyak 35 mL, medium B sebanyak 40 mL dan medium C sebanyak 45 mL. Kemudian diukur kadar brix dari medium A, B, C menggunakan refraktometer yang bertujuan untuk mengukur besarnya kadar gula (%Brix) yang terkandung di dalam suatu larutan (Hidayanto dkk., 2012). Lalu diinkubasi secara statis pada suhu 30°C selama 7 hari.

Setelah diinkubasi secara statis selama 7 hari, dibandingkan dan dipilih dari medium A, B, C yang menghasilkan pelikel dengan berat terbesar untuk dimurnikan dengan metode *spread plate* (cawan sebar). Sebanyak 1 g dari pelikel yang terpilih dihaluskan menggunakan mortar dan alu lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL larutan salin (NaCl 0,96%) steril, dikocok hingga homogen sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} dan dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} . Pada pengenceran 10^{-6} diambil sebanyak 100 μ L dan dilakukan metode *spread plate* (cawan sebar) pada medium HS agar. Lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (Herwin dkk., 2020).

Isolat yang tumbuh dari metode *spread plate* (cawan sebar) diseleksi untuk memperoleh isolat-isolat yang mampu menghasilkan BNC. Isolat diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan ditotolkan pada medium GEY lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C hingga terbentuk zona bening di sekitar koloni. Kemudian diukur diameter koloni dan diameter zona bening di sekitar koloni menggunakan jangka sorong (Khaerunnisah, 2018) dan dicatat untuk dihitung nilai indeks halo nya. Koloni yang memiliki nilai indeks halo terbaik, diuji lebih lanjut.

Koloni yang diperoleh dari hasil seleksi medium GEY dimurnikan dengan metode *streak plate* (cawan gores) untuk memperoleh isolat murni (koloni tunggal). Proses ini dilakukan sebanyak 1 kali penggoresan. Lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Setelah dilakukan penggoresan, dilakukan penotolan pada medium GEY untuk memperoleh koloni yang lebih murni. Koloni yang telah diperoleh lalu ditumbuhkan pada medium HS agar miring untuk dijadikan stok kultur (Rangaswamy dkk., 2014).

3.3.4 Pengaruh Optimasi Produksi BNC oleh Isolat Bakteri Terpilih

Sebelum melakukan optimasi produksi dilakukan pembuatan inokulum terlebih dahulu yang bertujuan sebagai starter dalam proses fermentasi. Sebanyak 2 ose stok kultur ditambahkan dalam 25 mL medium HS cair. Campuran ini diinkubasi pada suhu 30°C selama *overnight* (16 – 20 jam) dalam kondisi agitasi dengan kecepatan 150 rpm (Fahmia, 2017).

3.3.4.1 Pengaruh Sumber Karbon Oleh Isolat Bakteri pada Optimasi Produksi BNC

Untuk mengoptimalkan kondisi kultur, dilakukan produksi sumber karbon yaitu glukosa dan sukrosa dengan variasi konsentrasi masing-masing 2% (kontrol), 2,5%, 5% dan 10%. Sebanyak 5% (v/v) inokulum isolat ditambahkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer yang telah berisi 50 mL media kultur produksi glukosa dan sukrosa dalam gelas piala 250 mL. Lalu diinkubasi secara statis pada suhu 30°C selama 7 hari. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber karbon dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber karbon

Komposisi Medium	Nama Medium		
	Kontrol	Glukosa	Sukosa
Glukosa (g/v)	1	1	-
Sukrosa (g/v)	1	-	1
Pepton (g/v)	0,25	0,25	0,25
<i>Yeast extract</i> (g/v)	0,25	0,25	0,25
<i>Disodium hydrogen phosphate</i> (g/v)	0,135	0,135	0,135
Asam sitrat (g/v)	0,06	0,06	0,06

Sumber: Costa *et al* (2017).

Medium HS cair yang sumber karbon nya telah divariasikan konsentrasinya akan dibandingkan berat pelikel antar perlakuan, sehingga dapat diketahui perlakuan yang memberikan produksi BNC optimal untuk digunakan pada produksi sumber nitrogen (Park *et al.*, 2019).

3.3.4.2 Pengaruh Sumber Nitrogen oleh Isolat Bakteri pada Optimasi Produksi BNC

Dilakukan optimasi sumber nitrogen menggunakan sumber karbon optimal yang sebelumnya telah diperoleh. Sebanyak 50 mL media kultur produksi untuk sumber nitrogen dalam gelas piala 250 mL ditambahkan 5% (v/v) inokulum isolat. Pada produksi BNC, media kultur yang digunakan adalah HS cair dimana salah satu komposisinya yaitu kontrol (*yeast extract*) dan untuk mengetahui keadaan optimal pada produksi sumber nitrogen maka komposisi medium HS cair divariasikan dengan *beef extract* dan *malt extract* (Park *et al.*, 2019) yang diberi nama medium A1 dan A2. Lalu diinkubasi secara statis pada suhu 30°C selama 7 hari. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber nitrogen dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi media yang digunakan untuk produksi BNC dengan sumber nitrogen

Komposisi Medium	Nama Medium		
	Kontrol	A1	A2
Glukosa (g/v)	1	1	1
Pepton (g/v)	0,25	0,25	0,25
<i>Yeast extract</i> (g/v)	0,25	-	-
<i>Beef extract</i> (g/v)	-	0,25	-
<i>Malt extract</i> (g/v)	-	-	0,25
<i>Disodium hydrogen phosphate</i> (g/v)	0,135	0,135	0,135
Asam sitrat (g/v)	0,06	0,06	0,06

Sumber: Costa *et al.*, (2017).

Adapun komposisi medium dan cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

a. Medium HS Cair

Pembuatan medium HS cair terdiri dari 1 g glukosa, 0,25 g pepton, 0,25 g *yeast extract powder*, 0,135 g Na₂HPO₄, dan 0,06 g asam sitrat, dilarutkan dalam 50 mL akuades. Medium lalu dipanaskan hingga bahan larut. Kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

b. Medium A1

Pembuatan medium A1 terdiri dari 1 g glukosa, 0,25 g pepton, 0,25 g *beef extract*, 0,135 g Na₂HPO₄, dan 0,06 g asam sitrat, dilarutkan dalam 50 mL akuades. medium lalu dipanaskan hingga bahan larut. Kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

c. Medium A2

Pembuatan medium A2 terdiri dari 1 g glukosa, 0,25 g pepton, 0,25 g *malt extract*, 0,135 g Na₂HPO₄, dan 0,06 g asam sitrat, dilarutkan dalam 50 mL akuades. Medium lalu dipanaskan hingga bahan larut. Kemudian medium

disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Sumber nitrogen yang telah divariasikan *beef extract* dan *malt extract* nya akan dibandingkan hasil pelikel BNC yang terbentuk, lalu dipilih variasi sumber nitrogen yang menghasilkan pelikel BNC terbaik. Selanjutnya variasi sumber nitrogen terpilih dilakukan variasi konsentrasi yaitu 1%, 1,5%, 2% dan 2,5% (Park *et al.*, 2019). Lalu diinkubasi secara statis pada suhu 30°C selama 7 hari (Asthary dkk., 2020). Kemudian dilakukan perbandingan dari hasil variasi konsentrasi tersebut yang menghasilkan pelikel BNC terbaik lalu diukur WHC.

3.3.4.3 Pengaruh Agitasi oleh Isolat Bakteri pada Optimasi Produksi BNC

Sebanyak 50 mL media kultur produksi *beef extract* variasi konsentrasi 1%, 1,5% dan 2% dalam gelas piala 250 mL ditambahkan 5% (v/v) inokulum isolat. Pada produksi BNC, media kultur yang digunakan adalah HS cair dimana salah satu komposisinya yaitu kontrol (*yeast extract*) dan untuk mengetahui keadaan optimal pada produksi agitasi sumber nitrogen maka komposisi medium HS cair dimodifikasi dengan *beef extract*. Campuran ini diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari dalam kondisi agitasi dengan kecepatan 150 rpm (Fahmia, 2017).

3.3.5 Pengukuran *Water Hold Capacity* (WHC) BNC

Pengukuran WHC pada BNC bertujuan untuk mengukur daya serap air, karena BNC masih bisa menyerap air meskipun sudah dikeringkan hingga 0% (Sarkono dkk., 2015). Pengukuran WHC dilakukan dengan cara mencuci pelikel yang terbentuk pada fasa antar-muka kultur dengan akuades bertujuan untuk membilas dan menetralkan kembali pelikel BNC. Pelikel kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat basah. Selanjutnya pelikel direndam dalam NaOH 0,1 M pada suhu 100°C selama 30 menit untuk menghilangkan zat-zat pengotor pada pelikel BNC dan berfungsi untuk menaikkan pH pelikel karena kandungan asam yang sudah keluar dari pelikel,. Lalu dilakukan pencucian berulang menggunakan akuades yang bertujuan untuk menetralkan pelikel BNC. Pelikel basah dikeringkan

menggunakan oven selama 30 menit hingga mencapai berat yang konstan dan dicatat sebagai berat kering (Afrilla dan Santoso, 2011).

Rumus untuk menghitung WHC adalah :

$$\text{WHC (\%)} = \frac{\text{berat basah}-\text{berat kering}}{\text{berat basah}} \times 100\%$$

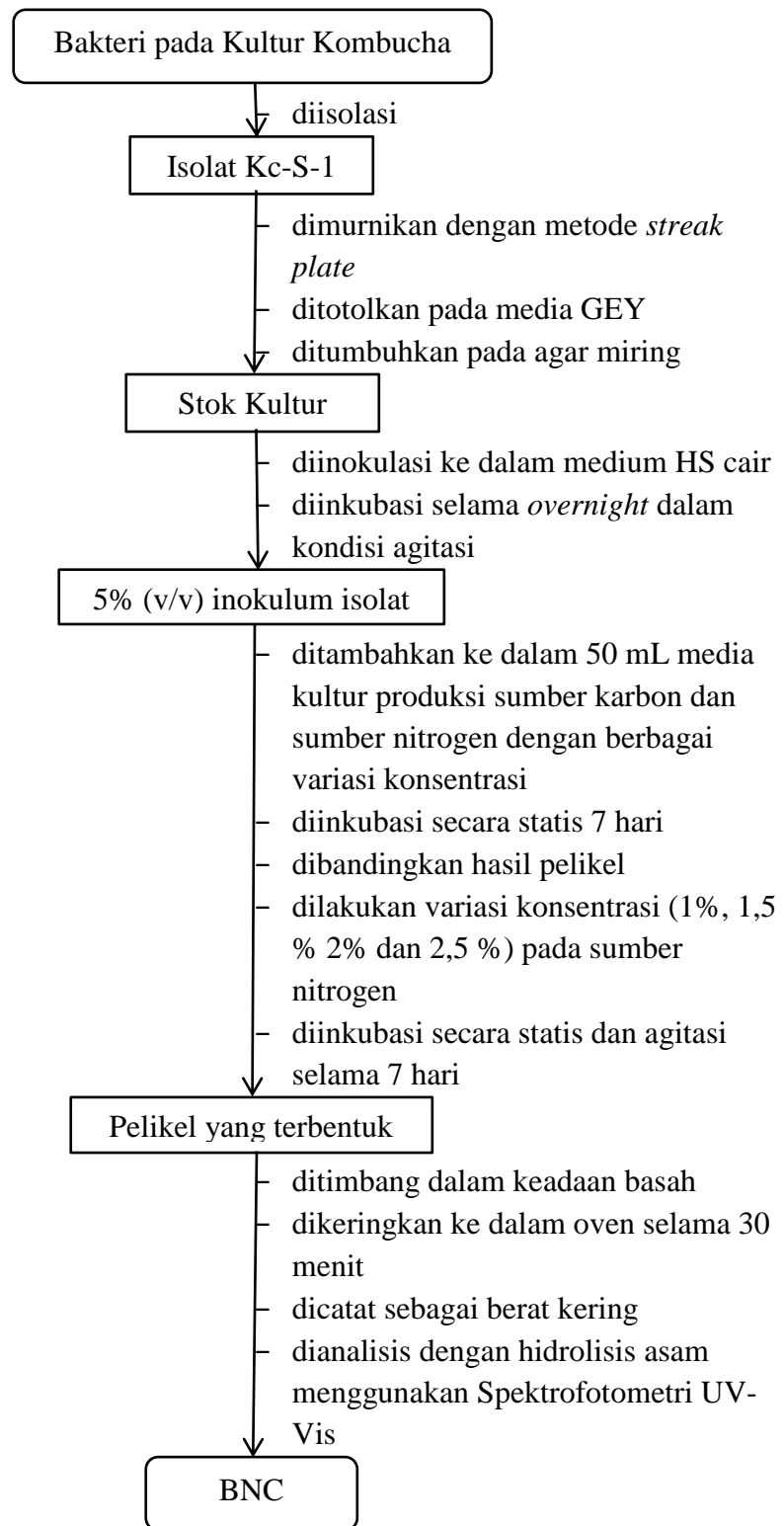
(Yanti dkk., 2020).

3.3.6 Analisis BNC Menggunakan Metode Hidrolisis Asam

Pelikel kering BNC seberat 0,08 gram dihidrolisis dengan 10 ml asam sulfat (H_2SO_4) 2 M pada suhu 90°C selama 30 menit. Dinginkan hasil hidrolisis dan saring untuk memperoleh filtratnya. Filtrat ditambahkan NaOH 10% sampai netral. Kadar glukosa ditentukan dalam filtrat dianalisis dengan metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) (Safitri dkk., 2018).

Penentuan kadar glukosa dengan metode DNS yaitu sebanyak 1 mL filtrat hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 3 mL pereaksi DNS, selanjutnya dipanaskan pada penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang, dilanjutkan dengan proses pengenceran bila larutan yang didapatkan sangat pekat. Larutan dipindahkan kedalam kuvet, absorbansi sampel, kontrol dan blanko diukur pada panjang gelombang maksimum 550 nm dengan spektrofotometer UV-Vis, bila larutan yang dianalisis sangat pekat dilanjutkan dengan proses pengenceran. Kemudian dihitung konsentrasi sampel (Pramana, dkk., 2016).

3.4 Diagram Alir



Gambar 2. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Isolat Kc-S-1 yang diperoleh dari kombucha asal Semarang mampu menghasilkan pelikel basah seberat 8,7 g pada medium A dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis.
2. Sumber karbon terbaik untuk produksi BNC oleh isolat Kc-S-1 adalah glukosa 5% yang menghasilkan pelikel seberat 4,0 g yang lebih besar dibandingkan dengan sukrosa seberat 2,0 g dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis.
3. Sumber nitrogen terbaik untuk produksi BNC oleh isolat Kc-S-1 adalah *beef extract* diantara ketiga sumber nitrogen, *beef extract* mampu menghasilkan pelikel seberat 5,7 g dengan waktu inkubasi 7 hari secara statis.
4. *Beef extract* 2% dari isolat Kc-S-1 mampu menghasilkan pelikel dengan berat terbaik yaitu sebesar 16,0 g pada waktu inkubasi 14 hari secara statis.
5. Produksi BNC lebih baik pada kondisi statis dibandingkan dengan kondisi agitasi.
6. *Water Hold Capacity* (WHC) dari produksi BNC pada kondisi terbaik dicapai sebesar 97,5 %.
7. Analisis BNC menggunakan metode hidrolisis asam menghasilkan larutan berwarna kuning kecoklatan dan absorbansi sebesar 0,6022 dari pengukuran spektrofotometer UV-Vis.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut terhadap isolat Kc-S-1 dalam menghasilkan BNC.
2. Perlu dilakukan optimasi dengan sumber nitrogen anorganik dengan berbagai variasi konsentrasi.
3. Perlu dilakukan karakterisasi dengan instrumentasi seperti SEM dan FTIR.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrilla, A. dan Santoso, B. 2011. Water Holding Capacity (WHC), Kadar Protein, dan Kadar Air Dendeng Sapi Pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale Roscoe*) dan Lama Perendaman Yang Berbeda. *JITEK*. 6(2). 41–46.
- Aniriani, G. W., Sulistiono, E. dan Apriliani, N. F. 2018. Optimasi Jenis Asam Kuat dalam Proses Hidrolisis Selulosa Jerami dalam Upaya untuk Mendapatkan Bioetanol. *Seminar Nas. Unisla*. 251–256.
- Arifin, Z., Gunam, I. B. W., Antara, N. S. dan Setiyo, Y. 2019. Isolasi Bakteri Selulolitik Pendegradasi Selulosa Dari Kompos. *JRMA*. 7(1). 30–37.
- Asthary, P. B., Sanningtyas, A. dan Pertiwi, G. A. 2020. Optimasi Produksi Bacterial Nanocellulose dengan Metode Kultur Agitasi. *JSel*. 10(2). 89–100.
- Chen, G., Wu, G., Alriksson, B., Chen, L., Wang, W., Jönsson, L. J. and Hong, F. F. 2018. Understanding In Multinational Organizations. *J. Organ. Behav.* 28(3). 303–325.
- Corral, M. L., Cerruti, P., Vazquez, A. and Califano, A. 2017. *Bacterial Nanocellulose As A Potential Additive For Wheat Bread*. *Food Hydrocoll.* 67. 189–196.
- Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., and Sarubbo, L. A. 2017. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Front. Microbiol.* 8: 2-4.
- Damayanti, N. W. E., Abadi, M. F. dan Bintari, N. W. D. 2020. Perbedaan Jumlah Bakteriuri Pada Wanita Lanjut Usia Berdasarkan Kultur Mikrobiologi Menggunakan Teknik Cawan Tuang dan Cawan Sebar. *Meditory*. 8(1). 1–4.
- Doresti, L., Setyati, W. A. dan Widowati, I. 2018. Optimasi Sumber Karbon Dan Nitrogen Sebagai Co-Substrat Untuk Pertumbuhan Bakteri Probiotik *Pseudomonas Sp.* *J. Mar. Res.* 7(3). 178–184.

- Effendi, D. B., Rosyid, N. H., Nandiyanto, A.B. D. dan Mudzakir, A. 2015. Review : Sintesis Nanoselulosa. *JIP*. 5(2). 61–74.
- Fahmia, A. 2017. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap Produksi Eksopolisakarida Dari Tetes Tebu Oleh *Lactobacillus plantarum* dan Identifikasi dengan FTIR. *J. Chem. Inf. Model*. 53(9). 1689–1699.
- Fatriasari, W., Masruchin, N. dan Hermiati, E. 2019. *Selulosa Karakteristik dan Pemanfaatannya*. LIPI Press. Jakarta.
- Fengel, D. and Wegener, G. 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Water De Gruyter. Berlin.
- Guo, X., Chen, L., Tang, J., Jönsson, L. J. and Hong, F. F. 2015. Production Of Bacterial Nanocellulose And Enzyme From [Amim]Cl-Pre-treated Waste Cotton Fabrics: Effects Of Dyes On Enzymatic Saccharification And Nanocellulose Production. *JCTB*. 91(5). 1413–1421.
- Hamad, A. dan Kristiono. 2013. Pengaruh Penambahan Sumber Nitrogen Terhadap Hasil Fermentasi Nata De Coco. *Momentum*. 9 (1). 62-65.
- Harsini, T. dan Susilowati. 2010. Perkebunan Kakao Sebagai Bahan Baku Pulp Dengan Proses Organosolv Dengan Menggunakan Proses Sulfit. *Envirotek*. 2(2). 80–89.
- Hassmy, N. P., Abidjulu, J. dan Yudistira, A. 2017. Analisis Aktivitas Antioksidan Pada Teh Hijau Kombucha Berdasarkan Waktu Fermentasi Yang Optimal. *Pharmacon*. 6(4). 67–74.
- Hayek, S. A. and Ibrahim, S. A. 2013. Current Limitations and Challenges With Lactic Acid Bacteria: A Review. *FNS*. 73–87.
- Herwin, Fitriana dan Nurung, A. H. 2020. Isolasi Bakteri Penghasil Selulosa dari Buah-Buahan Dipasar Tradisional Makassar. *As-Syifaa*. 12(1). 47–50.
- Hidayanto, E. dan Rofiq, A. 2012. Aplikasi Portable Brix Meter Untuk Pengukuran Indeks Bias. *Berkala Fisika*. 13(4). 113-118.
- Hsieh, J. T., Wang, M. J., Lai, J. T. and Liu, H.S. 2016. A Novel Static Cultivation Of Bacterial Cellulose Production By Intermittent Feeding Strategy. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 63(11). 46–51.
- Irdawati, I. dan Sari, P. A. 2020. Kombucha Tea Production by Amobil Cells in Several Different Tea Processing. *Bioscience*. 4(2). 133.
- Jacek, P., Dourado, F., Gama, M. and Bielecki, S. 2019. Molecular Aspects Of Bacterial Nanocellulose Biosynthesis. *Microb. Biotechnol*. 12(4). 633–649.

- Khaerunnisah. 2018. Karakterisasi Bionanokomposit Pati Sukun/PVA yang Diinkorporasi dengan Nanoserat Selulosa dan Aloe Vera. *Universitas Sumatera Utara*. Sumatera Utara.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, Sebastian., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D. and Dorris, A. 2011. Nanocelluloses: A New Family Of Nature-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50(24). 5438–5466.
- Melliawati, R. dan Djohan, A. C. 2013. Analisis Karboksimetil Selulosa Dari Bakteri *Acetobacter Xylinum* dan *Acetobacter Sp.* RMG-2. *Ber. Biol.* 12(3). 335–344.
- Molina-Ramírez, C., Castro, M., Osorio, M., Torres-Taborda, M., Gomez, B., Zuluaga, R., Gomez, C., Ganán, P., Rojas, O. J. and Castro, C. 2017. Effect of Different Carbon Sources On Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using The Low PH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*. *Materials*. 10(6).
- Murtiyaningsih, H. dan Hazmi, M. 2017. Isolasi Dan Uji Aktivitas Enzim Selulase Pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Agritrop*. 15(2). 293–308.
- Neera, Ramana, K. V. and Batra, H. V. 2015. Occurrence of Cellulose-Producing *Gluconacetobacter spp.* in Fruit Samples and Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176(4). 1162–1173.
- Nguyen, Q. D., Nguyen, T.V.L., Nguyen, T.T.D. and Nguyen, N. N. 2022. Effects Of Different Hydrocolloids On The Production Of Bacterial Cellulose By *Acetobacter Xylinum* Using Hestrin–Schramm Medium Under Anaerobic Condition. *Bioresour. Technol. Rep.* 17(11). 1-6.
- Nofu, K., Khotimah, S. dan Irwan, L. 2014. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Pendegradasi Selulosa pada Ampas Tebu Kuning (Bagasse). *Protobiont*. 3(1). 25–26.
- Nurikasari, M., Puspitasari, Y. and Siwi, R. P. Y. 2017. Characterization And Analysis Kombucha Tea Antioxidant Activity Based on Long Fermentation As a Beverage Functional. *GRPH*. 2(2). 90–96.
- Park, M. S., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Kim, M. J., Bang, W. Y. and Lim, Y. W. 2019. Cellulosic Nanomaterial Production Via Fermentation By *Komagataeibacter Sp.* Sfc22-18 Isolated From Ripened Persimmons. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29(4). 617–624.
- Pa'e, N., Zahan, K. A. and Muhamad, I. I. 2011. Production of Biopolymer from *Acetobacter xylinum* Using Different Fermentation Methods. *IJET*. 90–98.

- Perez, J., Rubia, T, D. L., Dorado, J. M. and Martinez, J. 2002. Biodegradation And Biological Treatments Of Cellulose , Hemicellulose And Lignin : An Overview. *Int Microbiol.* 53–63.
- Permana, A. H., Yuliana, E. dan Nurhalisa, I. A. 2021. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Mikroorganismen pada Proses Fermentasi Kombucha Berbahan Baku Teh Hijau (*Camellia sinensis*). *Warta Akab* .45(2). 60–65.
- Pramana, A., Razak, A. R. dan Prismawiryanti. 2016. Hidrolisis Selulosa Dari Sekam Padi (*Oryza Sativa*) Menjadi Glukosa Dengan Katalis Arang Tersulfonasi. *Kovalen.* 2(3). 61–66.
- Rahma, H. dan Zul, D. 2020. *Limbah Perkebunan Kelapa Sawit Dan Buah-Buahan Asal Riau (Nanas Dan Kapsul Non-Halal.* (Skripsi). Bidang Mikrobiologi Jurusan Biologi. FMIPA. Kampus Bina Widya. Pekanbaru. 3–4.
- Rahmi, A. F. 2017. *Adsorpsi protein oleh nanoselulosa berbasis ampas tebu (bagasse) dengan metode hidrolisis asam.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember. Jember.
- Rangaswamy, A., Ma'ruf, W. F. dan Rianingsih, L. 2014. Pengaruh Penambahan Oksidator Dan Reduktor Terhadap Degradasi Ekstrak Kasar Pigmen Fukosantin Rumpun Laut *Sargassum Duplicatum*. *JPBHP.* 3(4). 77-81.
- Rodriguez, M. T. 2017. Production of Bacterial Nanocellulose by Fermentation Process. *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona, Bacgelor's Thesis.*(1). 1-86.
- Rojas, O. J. 2016. *Cellulose Chemistry And Properties: Fibers, Nanocelluloses And Advanced Materials.* Springer. New York.
- Safitri, R., Anggita, I. D., Safitri, F. M. dan Ratnadewi, A. A. I. 2018. Pengaruh konsentrasi asam sulfat dalam proses hidrolisis selulosa dari kulit buah naga merah (*Hylocereus costaricensis*) untuk produksi bioetanol. *Irons.* 1–5.
- Sarkono, Moeljopawiro, S., Setiaji, B. dan Sembiring. L. 2015. Sifat Fisikokimiawi Selulosa Produksi Isolat Bakteri. *Agritech.* 35(4). 434–440.
- Sarkono, S., Hidayati, E. dan Rahman, F. 2017. Kemampuan Produksi Selulosa Isolat *Gluconacetobacter Xylinus* Ang- 29 Dalam Media Dasar Air Kelapa Dan Limbah Cair Tahu. *Biowallacea.* 3(1). 47-52.
- Sembiring, A. 2017. Identifikasi Jenis tiram dan Keanekaragamannya di Daerah Intertidal desa Harja Kecamatan Saparua Kabupaten Maluku Tengah. *Biosel.* 8(1). 21–28.

- Silitonga, A. dan Zul, D. 2020. *Isolasi Bakteri Penghasil Selulosa Dari Tanah Gambut Riau , Buah Jeruk Dan Buah Anggur : Aplikasi*. (Skripsi). Bidang Mikrobiologi Jurusan Biologi. FMIPA. Kampus Bina Widya. Pekanbaru. 1–14.
- Stanislawska, A. 2016. Bacterial Nanocellulose As A Microbiological Derived Nanomaterial. *Adv. Mater. Sci.* 16. 45–57.
- Subagiyo, Margino, S. dan Triyanto. 2016. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen Dan Fosfor pada Medium Deman, Rogosa And Sharpe (Mrs) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *JKT.* 18(3). 127.
- Supriyatna, A., Rohimah, I., Suryani, Y. and Sa'adah, S. 2012. Isolation And Identification Of Cellulolytic Bacteria From Waste Organic Vegetables And Fruits For Role In Making Materials Biogas. *Issn 1979-8911.* 4(1-2). 10-20.
- Warella, J. C., Papilaya, P. M. dan Tuapattinaya, P. M. J. 2016. Lama Fermentasi Terhadap Kadar Serat Nata Buah Gandaria. *Biopendix.* 3(1). 33–39.
- Wee, Y., Kim, S., Yoon, S. and Ryu, H. 2011. Isolation and characterization of a bacterial cellulose- producing bacterium derived from the persimmon vinegar. *Afr. J. Biotechnol.* 10(72). 16267–16276.
- Wibowo, N. A. and Isroi. 2015. In-Vivo Potency Of Bacterial Cellulose As Nano-Filler Elastomer Thermoplastics Rubber (Etps). *Perspektif.* 14(2). 103–112.
- Wulandari, H. R. dan Pujiyanto, S. 2020. Pengaruh Penambahan Sumber Karbon Terhadap Produksi Antibakteri Isolat Endofit A1 Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *NICHE.* 80–88.
- Yanti, N. A. Ambardini, S., Isra, W. O. dan Parakkasi, V. N. R. 2020. Potensi limbah cair tahu sebagai sumber nitrogen pada produksi selulosa bakteri. *Bioma.* 5(1). 9–17.
- Yolanda, B. dan Meitiniarti, V. I. 2017. Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Kimchi Dan Kemampuannya Menghasilkan Senyawa Anti Bakteri. *Scribio,* 4(9). 165–169.
- Zuhri, R., Agustien, A. dan Rilda, Y. 2013. Nitrogen Terhadap Produksi Protease Alkali. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.* 273–277.