

**OPTIMASI KONDISI KULTUR PRODUKSI *BACTERIAL*
NANOCELLULOSE (BNC) OLEH ISOLAT Kc-T-1 DARI LIMBAH
CAIR INDUSTRI TEBU**

(Skripsi)

Oleh

FATMA DITA BUDIARTI

1917011051



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC) BY Kc-T-1 ISOLATE FROM SUGARCANE INDUSTRY LIQUID WASTE

By

Fatma Dita Budiarti

Bacterial nanocellulose (BNC) includes pure cellulose from bacteria which has a very high water holding capacity so that it is widely applied in various industries. BNC-producing bacterial strain groups generally grow in media with balanced nutrients and pH to maximize production. The purpose of this study was to obtain the optimum conditions for BNC production through variations in pH, carbon sources, nitrogen sources, and phosphate sources. The stages of this research included rejuvenation of BNC-producing isolates, optimization of isolate culture conditions, measurement of Water Hold Capacity (WHC), and characterization of BNC results using Fourier Transform Infra-Red (FTIR) and Scanning Electron Microscope (SEM). The optimized BNC producing isolate is Kc-T-1 isolate. The results showed that the optimum conditions for BNC production by Kc-T-1 isolates were using modified HS medium (HS-T) with the addition of a nitrogen source in the form of beef extract and without the addition of other carbon and phosphate sources. HS-T medium with a molasses concentration of 6% Brix with the addition of beef extract and a fermentation period of 14 days at pH 6.0 produced a BNC pellicle with a wet weight of 13.82 g. The percentage of WHC values of the pellicle produced by isolate Kc-T-1 in culture medium with variations in pH, carbon source, nitrogen source and phosphate source ranged from 96% -98%. SEM and FTIR analysis showed that the cellulose pellicle has a nano size and has functional groups that strengthen it as a cellulose material.

Keywords: Bacterial Nanocellulose (BNC), Kombucha, Molasses Waste water, Hestrin-Scramm (HS) Medium.

ABSTRAK

OPTIMASI KONDISI KULTUR PRODUKSI *BACTERIAL NANOCELLULOSE* (BNC) OLEH ISOLAT Kc-T-1 DARI LIMBAH CAIR INDUSTRI TEBU

Oleh

Fatma Dita Budiarti

Bacterial nanocellulose (BNC) termasuk selulosa murni dari bakteri yang mempunyai kapasitas menahan air yang sangat tinggi sehingga banyak diaplikasikan dalam berbagai industri. Kelompok strain bakteri penghasil BNC umumnya tumbuh dalam media dengan nutrisi dan pH yang seimbang untuk memaksimalkan produksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum produksi BNC melalui variasi pH, sumber karbon, sumber nitrogen, dan sumber fosfat. Tahapan penelitian ini meliputi peremajaan isolat penghasil BNC, optimasi kondisi kultur isolat, pengukuran *Water Hold Capacity* (WHC), dan karakterisasi hasil BNC dengan menggunakan *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) dan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Isolat penghasil BNC yang dioptimasi adalah isolat Kc-T-1. Hasil penelitian diperoleh kondisi optimum produksi BNC oleh isolat Kc-T-1 adalah menggunakan medium HS termodifikasi (HS-T) dengan penambahan sumber nitrogen berupa *beef extract* dan tanpa penambahan sumber karbon dan sumber fosfat lainnya. Medium HS-T dengan konsentrasi molase sebesar 6% Brix dengan penambahan *beef extract* dan masa fermentasi selama 14 hari pada pH 6,0 menghasilkan pelikel BNC dengan berat basah sebesar 13,82 g. Presentase nilai WHC dari pelikel yang diproduksi isolat Kc-T-1 pada medium kultur dengan variasi pH, sumber karbon, sumber nitrogen dan sumber fosfat berkisar antara 96%-98%. Analisis SEM dan FTIR menunjukkan bahwa pelikel selulosa memiliki ukuran nano dan memiliki gugus fungsi yang menguatkan sebagai material selulosa.

Kata Kunci: *Bacterial Nanocellulose* (BNC), Kombucha, Limbah Cair Molase, Media Hestrin-Scramm (HS).

**OPTIMASI KONDISI KULTUR PRODUKSI *BACTERIAL*
NANOCELLULOSE (BNC) OLEH ISOLAT Kc-T-1 DARI LIMBAH
CAIR INDUSTRI TEBU**

Oleh

Fatma Dita Budiarti

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023

Judul Skripsi : **OPTIMASI KONDISI KULTUR PRODUKSI
BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC) OLEH ISOLAT
Kc-T-1 DARI LIMBAH CAIR INDUSTRI TEBU**

Nama Mahasiswa : **Fatma Dita Budiarti**

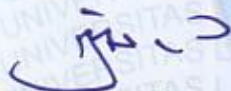
Nomor Pokok Mahasiswa : **1917011051**


Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002


Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
NIP 19710806 200003 2 001

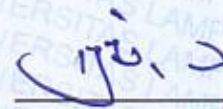
2. **a.n Ketua Jurusan Kimia
Sekertaris Jurusan Kimia FMIPA**


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

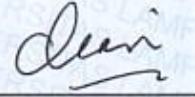
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Anggota : **Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.**

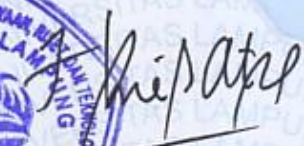


2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP 19711001 200501 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 31 Juli 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fatma Dita Budiarti
NPM : 1917011051
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul : **Optimasi Kondisi Kultur Produksi *Bacterial Nanocellulose* (BNC) oleh Isolat Ke-T-1 dari Limbah Cair Industri Tebu** merupakan benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain kecuali yang disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan.

Kemudian, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, Agustus 2023
Yang menyatakan,



Fatma Dita Budiarti
NPM. 1917011051

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di OKU Timur, pada tanggal 27 April 2002 sebagai anak pertama dari Bapak Sumaji dan Ibu Izah Pribadi. Jenjang pendidikan penulis dimulai dari pendidikan sekolah dasar di SD Negeri 2 Purwodadi yang diselesaikan pada tahun 2013. Dilanjutkan dengan pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 2 Belitang Mulya yang diselesaikan pada tahun 2016. Kemudian, penulis menyelesaikan pendidikan menengah atas pada tahun 2019 di SMA Negeri 1 Belitang.

Penulis terdaftar sebagai mahasiswa program studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada tahun 2019 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) sebagai mahasiswa baru. Pada tahun yang sama, penulis terdaftar sebagai peserta pada kegiatan Karya Wisata Ilmiah selama 5 hari di Desa Tambah Dadi, Purbolinggo, Lampung Timur.

Pada tahun 2022, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari yang terhitung sejak bulan Januari sampai Februari 2020 di Desa Batu Putih, Baturaja, Sumatera Selatan. Selanjutnya, di tahun yang sama penulis mengikuti Program Merdeka Belajar-Kampus Merdeka (MBKM) sekaligus melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di wilayah Gunung Sulah – Way Halim, Bandar Lampung dan Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.

Selama menjadi mahasiswa, Penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia Jurusan Kimia dan Biologi Terapan FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023. Penulis pernah terdaftar di organisasi internal kampus seperti Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) sebagai anggota Bidang Sosial Masyarakat (Sosmas) periode 2020 dan menjadi Kader Muda Himaki periode 2019/2020.

MOTTO

Live and Let Live.

Tidak ada kata terlambat untuk menjadi apa yang kamu inginkan
-George Eliot-

Jika kamu serius ingin mengubah hidupmu, kamu akan menemukan jalannya. Jika
tidak, kamu hanya akan menemukan alasan.
-Jen Sincero-

PERSEMBAHAN

Puji Syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sholawat serta salam semoga selalu tercurah kepada suri tauladan umat, Nabi Muhammad SAW.



Kupersembahkan karya sederhanaaku ini, kepada

Kedua orang tuaku tercinta Bapak Sumaji dan Ibu Izah Pribadi

Yang senantiasa memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan motivasi kepada ananda selama ini. Terima kasih untuk kesabaran yang tidak pernah habis. Beribu kebaikan ananda tidak akan pernah bisa membalas cinta dan kasih sayang yang diberikan.

**Bapak Mulyono, Ph.D | Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si |
Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.**

Dan seluruh dosen Jurusan Kimia

Terima kasih telah membimbing dan mendidik penulis selama menempuh pendidikan di kampus. Semoga Bapak dan Ibu senantiasa diberikan kesehatan dan kerbekahan.

Seluruh keluarga besar, sahabat, dan teman-temanku.

dan

Almamater

SANCAWACANA

Alhamdulillahirrabil'alamiin. Segala puji dan syukur hanya bagi Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang berjudul:

OPTIMASI KONDISI KULTUR PRODUKSI *BACTERIAL* NANOCELLULOSE (BNC) OLEH ISOLAT Kc-T-1 DARI LIMBAH CAIR INDUSTRI TEBU

Sholawat beserta salam senantiasa tercurah kepada suri tauladan umat, Nabi Muhammad SAW, semoga kita mendapatkan syafaatnya di *Yaumul Akhir* kelak.

Penulis menyadari bahwa terdapat banyak pihak yang turut serta membantu dalam menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, melalui tulisan ini, penulis dengan tulus ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta yang telah merawat, mendidik dan membesarkan ananda dengan penuh kasih sayang. Ayahku tersayang, Bapak Sumaji sebagai teladanku atas kebijaksanaan, ketegaran dan ketegasannya yang selalu memotivasi ananda hingga saat ini. Ibuku tersayang, Ibu Izah Pribadi yang senantiasa memberikan dukungan, semangat dan kesabaran yang tidak terbatas hingga ananda sampai pada tahap ini. Semoga doa tulus dan kepercayaan yang Ayah dan Ibu berikan mampu membawa ananda menjadi pribadi yang lebih baik lagi.
2. Bapak Mulyono, Ph.D., sebagai dosen pembimbing yang telah membimbing, mendidik, dan mengarahkan penulis dengan penuh kesabaran dan ketulusan

hingga skripsi ini dapat terselesaikan. Terima kasih atas waktu dan ilmu yang Bapak berikan, semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan dan keberkahan untuk Bapak dan keluarga.

3. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan, nasihat dan motivasi sehingga penulis dapat menempuh pendidikan yang baik di Jurusan Kimia, FMIPA, Unila. Semoga Allah selalu memberikan rahmat kepada Ibu dan keluarga.
4. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa memberikan bantuan, masukan dan nasihat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih atas ilmu-ilmu yang Ibu berikan, semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan dan keberkahan untuk Ibu dan keluarga.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., selaku pembahas yang telah memberikan kritik dan saran yang begitu besar bagi penulis hingga skripsi ini dapat diselesaikan. Terima kasih atas ilmu-ilmu yang Ibu berikan, semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan dan keberkahan untuk Ibu dan keluarga.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
7. Seluruh dosen Program Studi Kimia FMIPA Universitas Lampung yang tidak dapat disebutkan satu-persatu. Terima kasih atas ilmu dan waktu yang Bapak dan Ibu berikan, semoga Allah membalas amal jariyah Bapak/Ibu sekalian.
8. Staf administrasi dan staf laboran, terima kasih atas kerja keras dan bantuan Bapak/Ibu, penulis amat terbantu dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Keluarga besarku yang selalu memberi dukungan, motivasi, semangat, serta doa dan bantuan yang tak terkira. Khususnya kakakku tercinta, Neza Septya (Mbak Iya) yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis dengan penuh kesabaran. Terima kasih telah menjadi kakak sekaligus teman yang baik.
10. Tim Pak Mulyono *Research' 19* (PMR' 19), Kak Natasya Nathaniela Akbar, Alinil Masruroh, Lousanja Dira Sa'uddah dan Sri Riski Mulya Wulanda. Terima kasih atas waktu, ilmu, dan semangat yang terus ditularkan. Semoga pengalaman yang kita alami bersama dapat bermanfaat kedepannya.

11. Teman seperjuangan tersayang yang sangat spesial bagi penulis, Alyaa Fathia Kesuma, Febiana Nabila, Maudi Cahya Muslimah, Selvia Anggraini Hasan dan Quntum Ramadhina. Terima kasih atas bantuan yang tak terkira, motivasi dan selalu ada dalam keadaan suka maupun duka. Semoga persahabatan kita tetap solid walau nanti jarak dan waktu memisahkan. Pengalaman dan waktu yang dihabiskan bersama kalian selama 4 tahun ini sangat berharga dan tidak terganti, *See you on top*.
12. Sahabat-sahabatku tercinta, Karini, Catherine Fitriana dan Rahma Putri Wahyanti yang selalu mengisi hari-hari penulis dengan penuh kejutan dan keceriaan. Terima kasih atas dukungan dan semangat kalian hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
13. Rekan-rekan penelitian *peergrup* Biokimia, Nabila, Kak Acha, Alinil, Ayur, Astin, Adiya, Cindi, Cella, Dira, Dienus, Diah Indah, Ejak, Hilda, Neng Wiwit, Partini, Putpita, Putri, Rara, Verinda, Wulan, dan Yori. Terima kasih atas semangat yang kalian tularkan hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
14. Kakak-kakak *peergroup* Biokimia tanpa terkecuali yang banyak membantu penulis.
15. Kakak-kakak Tim Riset Mulyono, Kak Luthfi Azizah, Kak Nurbaiti, Kak Gista Kusuma Rina dan Kak Fina Palinda yang banyak membantu penulis dalam memberikan referensi untuk penelitian dan skripsi. Dan juga untuk adik-adik 2020, tetap semangat dan sabar dalam menyelesaikan penelitiannya.
16. Keluarga besar Kimia Angkatan 2019, tanpa terkecuali.
17. Rekan-rekan KKN Desa Batu Putih, Ayu Ranja, Danti, Dewi, Dhinda, Fedrano, Herfebie, Juntaria, Lyan, Magfirah, Minda, Ramona, Rafly dan Risnalia. Terima kasih untuk pengalaman 40 hari yang sangat berarti. Hari-hari bersama kalian membuat penulis merasakan ‘dunia baru’ yang amat menyenangkan.
18. Rekan-rekan organisasi Himaki yang tidak bisa disebutkan satu-persatu.
19. Seluruh mahasiswa kimia tanpa terkecuali.

20. Semua pihak, tanpa terkecuali yang banyak membantu dan memberikan doa baik secara langsung maupun tidak langsung selama penulis menyelesaikan studinya.

Akhir kata, penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya apabila skripsi ini masih terdapat kesalahan dan belum sempurna. Semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, Agustus 2023

Penulis

Fatma Dita Budiarti

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Selulosa.....	5
2.1.1 Pengertian Selulosa.....	5
2.1.2 Struktur Selulosa.....	7
a) Ikatan Hidrogen.....	7
b) Derajat Polimerisasi	7
c) Struktur Kristal Selulosa	8
d) Hornifikasi.....	9
2.1.3 Sumber Selulosa.....	9
a) Selulosa Tumbuhan	9
b) Selulosa Bakteri.....	10
2.2 Isolasi Selulosa	11
2.2.1 Proses Mekanik.....	11
2.2.2 Proses Enzimatik.....	11
2.2.3 Proses Kimia	12
2.3 Limbah Tebu	12
2.4 Nanoselulosa	12
2.4.1 Pengertian Nanoselulosa.....	12
2.4.2 Prospek Pemanfaatan Nanoselulosa	14
a) Kertas Nano	14

b) Nano Komposit Selulosa	14
c) Energi Terbaharukan dan Penyimpanan Energi	15
d) Penyerap Logam Berat	15
e) Biomedis	15
2.5 <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC)	16
2.6 Biosintesis Nanoselulosa	17
2.7 Bakteri Asam Asetat	17
2.8 Isolat Kc-T-1	18
2.9 Karakterisasi Bakteri Nanoselulosa	19
2.9.1 <i>Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy</i> (FTIR)	19
2.9.2 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	20
III. METODE PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.3 Prosedur Penelitian	23
3.3.1 Tahap Persiapan Alat	23
3.3.2 Pembuatan Media	23
3.3.2.1 Medium Hestrin-Schramm (HS) Cair	23
3.3.2.2 Medium Hestrin-Schramm (HS) Cair Termodifikasi	23
3.3.2.3 Medium Hestrin-Schramm (HS) Agar	23
3.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil BNC	24
3.3.4 Pembuatan Inokulum	24
3.3.5 Optimasi Kondisi Kultur Isolat	24
3.3.5.1 Variasi pH Kultur	25
3.3.5.2 Variasi Sumber Karbon (C)	25
3.3.5.3 Variasi Sumber Nitrogen (N)	25
3.3.5.4 Variasi Sumber Fosfat	25
3.3.6 Pengukuran <i>Water Hold Capacity</i>	26
3.3.7 Karakterisasi Nanoselulosa Bakterial	26
3.3.7.1 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	26
3.3.7.2 <i>Fourier Transform Infra - Red</i> (FTIR)	26
3.4 Diagram Alir	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Isolat Bakteri Kc-T-1	29
4.2 Inokulum Isolat Bakteri Kc-T-1	31
4.3 <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC) dari Isolat Kc-T-1	31

4.3.1 Kondisi Kultur Isolat Kc-T-1 Penghasil BNC	33
4.3.1.1 pH Kultur Optimum	33
4.3.1.2 Sumber Karbon Optimum	37
4.3.1.3 Sumber Nitrogen Optimum	41
4.3.1.4 Sumber Fosfat Optimum	45
4.3.2 Kondisi Optimum Produksi BNC dari Isolat Kc-T-1	48
4.4 <i>Water Hold Capacity</i> (WHC) Pelikel BNC	51
4.5 Karakteristik Nanoselulosa Bakterial	54
4.5.1 Morfologi Permukaan BNC	54
4.5.2 Spektrum IR BNC	56
V. KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Besaran Energi Ikatan Antar Molekul.....	7
2. Komposisi Kimiawi Biomassa Penghasil Selulosa.....	10
3. Perbandingan Berat Pelikel BNC pada Berbagai pH.....	34
4. Perbandingan pH Optimum Produksi BNC pada Hasil Penelitian	36
5. Perbandingan Berat Pelikel BNC pada Berbagai Sumber Karbon	38
6. Perbandingan Sumber C Optimum Produksi BNC pada Hasil Penelitian.....	41
7. Perbandingan Berat Pelikel BNC pada Berbagai Sumber Nitrogen	42
8. Perbandingan Sumber N Optimum Produksi BNC pada Hasil Penelitian.....	44
9. Perbandingan Berat Pelikel BNC pada Berbagai Sumber Fosfat	46
10. Perbandingan Sumber P Optimum Produksi BNC pada Hasil Penelitian	47
11. Data Kondisi Optimum Produksi BNC oleh isolat Kc-T-1	49
12. Data <i>Water Hold Capacity</i> BNC.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Molekul Selulosa.....	5
2. Fase Kristal, Fase Amorf, dan Koneksi Antarmolekul Selulosa.....	9
3. <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC)	13
4. Hasil Uji SEM Nanoselulosa pada Perbesaran 30.000 x.....	21
5. Diagram Alir Penelitian	27
6. Pertumbuhan Isolat Kc-T-1 pada medium HS Agar	30
7. Stok Isolat Kc-T-1	30
8. Pelikel BNC Hasil Kultur Isolat Kc-T-1 pada Berbagai pH.....	34
9. Grafik Perbandingan Berat Basah Pelikel pada Berbagai pH.....	35
10. Pelikel BNC Hasil Kultur Isolat Kc-T-1 pada Berbagai Sumber Karbon	38
11. Grafik Perbandingan Berat Basah Pelikel pada Berbagai Sumber Karbon	39
12. Pelikel BNC Hasil Kultur Isolat Kc-T-1 pada Berbagai Sumber Nitrogen	42
13. Grafik Perbandingan Berat Basah Pelikel pada Berbagai Sumber Nitrogen	43
14. Pelikel BNC Hasil Kultur Isolat Kc-T-1 pada Berbagai Sumber Fosfat	45
15. Grafik Perbandingan Berat Basah Pelikel pada Berbagai Sumber Fosfat	46
16. Pelikel BNC pada Medium HS-T	52
17. Grafik Perbandingan Presentase <i>Water Hold Capacity</i> (WHC)	53
18. Morfologi Permukaan <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC).....	55
19. Spektrum IR <i>Bacterial Nanocellulose</i> (BNC)	57
20. Pelikel Basah pH Kultur Optimum	75
21. Pelikel Kering pH Kultur Optimum.....	75
22. Pelikel Basah Sumber Karbon Optimum	76
23. Pelikel Kering Sumber Karbon Optimum.....	76
24. Pelikel Basah Sumber Nitrogen Optimum.....	76
25. Pelikel Kering Sumber Nitrogen Optimum	77

26. Pelikel Basah Sumber Fosfat Optimum	77
27. Pelikel Kering Sumber Fosfat Optimum.....	77

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Biomassa berbasis selulosa menjadi bahan baku dengan sumber daya terbarukan terbesar yang ditemukan di bumi, dimana sekitar 1,5 triliun ton selulosa diproduksi setiap tahunnya. Selulosa dapat disintesis oleh beberapa jenis bakteri, alga dan jamur. Selulosa bakteri (BC) merupakan sumber selulosa paling umum diantara selulosa non-tumbuhan, sehingga dapat dijadikan alternatif yang cocok untuk pengganti selulosa tumbuhan dalam berbagai aplikasi farmasi dan industri. Selulosa merupakan sediaan material yang dapat diperbaharui atau bersifat terbarukan (*renewable*). Hal tersebut dapat menjamin tersedianya pasokan bahan baku dan tidak perlu bergantung pada bahan baku fosil. BC termasuk biomaterial dengan ukuran mikro (polisakarida ekstraselular) yang diproduksi oleh bakteri asam asetat dari genus *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, dan *Komogataeibacter* untuk memproduksi selulosa dan nanoselulosa (Iguchi *et al.*, 2000).

Selulosa merupakan polimer yang memiliki rumus kimia $C_6H_{11}O_5$ tersusun dari monomer-monomer glukosa dalam bentuk beta yang dihubungkan melalui reaksi kondensasi oleh ikatan glikosidik 1,4. Umumnya, selulosa memiliki banyak keunggulan seperti densitas yang rendah, sifat mekanik yang baik, melimpah, relatif murah, ramah lingkungan, mudah didegradasi, tidak beracun dan merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui (Ludwicka *et al.*, 2020). Potensi pemanfaatan selulosa umumnya hampir memenuhi semua aspek standar kebutuhan manusia, seperti pemanfaatan dari bahan konvensional meliputi industri kayu dan kertas, sampai material modern yang meliputi komposit, sumber penyedia energi, penghantar obat

(*drug delivery*) dan aplikasi biomedis (Fernandes *et al.*, 2013).

Nanoselulosa adalah selulosa dengan ukuran nano yang diproduksi dari selulosa alami pada sel tumbuhan. Nanoselulosa umumnya akan mempertahankan sifat *biodegradable* dan regeneratif dari selulosa alami. Selain itu nanoselulosa juga mempunyai luas permukaan spesifik yang relatif besar, biokompatibilitas, tidak beracun dan kemampuan untuk membentuk ikatan hidrogen yang efektif antar rantai-rantai selulosa hingga matriks polimer lain. Nanoselulosa dapat dibagi menjadi 3 bentuk utama diantaranya selulosa nanofibril (CNF), selulosa nanokristal (CNC), dan nanoselulosa bakterial (BNC) (Shankar & Jong-Whan, 2016).

Bacterial nanocellulose adalah polimer linier glukosa berbentuk kristalin yang disintesis oleh bakteri terutama *Gluconacetobacter xylinus*. atau *G. xylinus* merupakan produsen mikroba utama untuk BNC dan telah menjadi sistem model untuk studi mekanisme biosintesis BNC. Hal ini disebabkan karena BNC memiliki ikatan hidrogen yang lebih banyak dan lebih kuat daripada selulosa tanaman. Umumnya, BNC memiliki bentuk kristal Ia dan Ib, bersifat non toksik, kekuatan tarikan yang baik, tidak menyebabkan reaksi alergi dan mudah dibiodegradasi. Selain itu, BNC juga memiliki luas permukaan yang besar dengan diameter serat 20-200 nm sehingga dapat menyerap air dalam jumlah yang besar serta mempunyai *adherence* yang baik. Berdasarkan sifat dan karakteristik tersebut, BNC dapat dimanfaatkan dalam berbagai macam industri seperti industri kertas, industri tekstil, hingga farmasi (Asthary *et al.*, 2020).

Hasil sintesis bakteri aerobik seperti bakteri asam asetat akan menghasilkan BNC yang memiliki bentuk berupa selulosa murni dengan diameter berukuran nano. Kelompok strain bakteri asam asetat penghasil BNC umumnya ditumbuhkan dalam media yang mengandung nutrisi seperti glukosa yang berfungsi sebagai sumber karbon. Potensi limbah yang mengandung karbon dapat dijadikan media fermentasi untuk BNC. Penelitian tentang pemanfaatan bahan baku yang minim biaya sangat penting dilakukan sebagai alternatif

produksi BNC. Residu pertanian terbarukan dan produk sampingan industri seperti kulit dan jus buah, jerami gandum, sekam padi, kurma dan tetes tebu telah dipelajari sebelumnya sebagai substrat untuk produksi selulosa. Limbah tebu mengandung molase atau tetes tebu yang dapat dijadikan sebagai substrat fermentasi untuk mikroba dan dapat digunakan untuk biosintesis selulosa. Pemanfaatan molase untuk produksi nanoselulosa juga telah banyak dilakukan di berbagai industri. Umumnya penelitian tentang BNC berfokus pada bakteri penghasil BNC dengan memperoleh kondisi optimum produksi BNC dalam skala laboratorium (Gatenholm & Klemm, 2010).

Sementara itu, Azizah (2022) telah melakukan studi untuk produksi BNC menggunakan limbah cair tebu sebagai upaya untuk mengurangi biaya produksi BNC. Kandungan molase yang tinggi pada limbah cair tebu dapat digunakan sebagai sumber substrat untuk pengganti glukosa pada medium produksi BNC. Hasil yang didapatkan dari seleksi mikroba dengan media GEY berupa isolat Kc-T-1 yang menghasilkan indeks *halo* sebesar 2,2. Isolat Kc-T-1 ditumbuhkan pada medium HS cair steril, dan variasi konsentrasi medium molase sebesar 2%, 4% dan 6% Brix dalam kondisi statis dan agitasi. Kondisi optimum produksi BNC ditunjukkan pada kondisi statis pada variasi konsentrasi medium molase sebesar 6% Brix dengan masa inkubasi selama 14 hari yang menghasilkan berat pelikel basah 12,80 g. Isolat mikroba Kc-T-1 disimpan di Laboratorium Biokimia.

Walaupun isolat mikroba Kc-T-1 mampu memproduksi BNC dengan baik. Namun, optimasi produksi pada BNC masih perlu dilakukan secara intensif. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi produksi nanoselulosa bakterial dari limbah cair tebu dengan variasi pH kultur, sumber karbon, sumber nitrogen, dan sumber fosfat. Dari kondisi yang diperoleh kemudian dilakukan analisis kualitatif terhadap BNC yang dihasilkan menggunakan SEM dan FTIR. Hasil yang didapatkan diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai referensi atau rujukan bagi penelitian BNC selanjutnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Mendapatkan kondisi optimum produksi BNC dengan variasi pH, sumber karbon, sumber nitrogen, dan sumber fosfat.
2. Mengetahui karakteristik pelikel BNC dengan menggunakan SEM dan FTIR.

1.3 Manfaat Penelitian

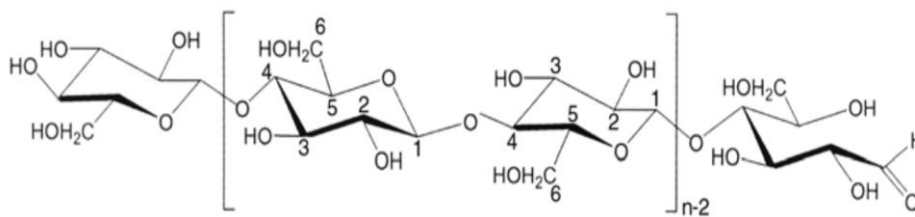
Hasil penelitian diharapkan dapat menambah wawasan atau ilmu pengetahuan bagi para pembaca dan mahasiswa serta dapat dijadikan referensi atau rujukan bagi penelitian BNC selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Selulosa

2.1.1 Pengertian Selulosa

Selulosa adalah suatu komponen utama yang digunakan sebagai pembangun dinding sel tumbuhan dari tingkat tinggi seperti pohon hingga organisme primitif seperti flagelata, bakteri, dan alga. Selulosa merupakan komponen karbohidrat rantai lurus dimana glukosa menjadi monomer penyusunnya. Antar monomer tersebut dihubungkan oleh ikatan hidrogen. Selulosa termasuk homopolimer yang tersusun dari unit β -D-glukopiranososa yang terikat oleh ikatan (1,4)-glikosida, dimana n adalah derajat polimerisasi selulosa (DP) (Klemm *et al.*, 2005). Bentuk struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 1:



Gambar 1. Struktur Molekul Selulosa (Asmoro *et al.*, 2018).

Selulosa adalah polimer linear yang memiliki ikatan dan unit-unit yang seragam. Unit pengulangan pada polimer selulosa tersusun dari dua unit glukosa anhidrida atau lebih dikenal dengan unit selobiosa. Dua unit glukosa yang saling berdekatan akan bersatu dengan mengeliminasi satu molekul air yang terletak di antara gugus hidroksil pada C₁ dan C₄. Gugus OH yang terdapat pada C₁ dan C₄ umumnya memiliki sifat yang berbeda. Gugus C₁-OH adalah gugus hidrat aldehida yang

bersifat pereduksi, sedangkan gugus C₄-OH adalah gugus hidroksil alkohol yang memiliki sifat bukan pereduksi. Panjang rangkaian selulosa bergantung pada derajat polimerisasinya, sehingga semakin panjang rangkaiannya maka selulosa akan memiliki serat yang lebih kuat serta lebih tahan terhadap cahaya, mikroba, dan bahan kimia (Trache *et al.*, 2016).

Pada dasarnya, tipe selulosa dikelompokkan menjadi 4 kelompok diantaranya selulosa alam, selulosa murni, selulosa laboratorium dan selulosa komersial/teknis (pulp). Proses-proses yang digunakan untuk pembuatan pulp biomassa lignoselulosa termasuk teknik sediaan selulosa secara komersial. Adapun, teknik ekstraksi dengan pereaksian dengan natrium klorit secara berulang yang dilanjutkan pereaksian dengan alkali adalah rangkaian tahap penyediaan selulosa secara laboratorium. Setiap tipe selulosa yang dihasilkan mempunyai karakteristik dan kadar selulosa yang berbeda-beda (Rowell, 2005).

Sediaan komersial selulosa dalam bentuk nano dapat dibedakan menjadi *cellulose nanofibrils* (CNF), *bacterial nanocellulose* (BNC), dan *cellulose nanocrystal /whisker* (CNC/CNW). *Cellulose nanofibrils* (CNF) adalah suatu untaian *elementary fibril* yang tersusun dari fase amorf dan fase kristal, sedangkan CNC adalah suatu untaian yang hanya tersusun dari fase kristal sehingga memiliki ukuran yang lebih pendek (Bondenson *et al.*, 2006). Umumnya, sediaan CNF dapat dihasilkan dengan proses mekanik dan CNC dapat dihasilkan dari proses hidrolisis asam yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fase amorf dari selulosa (Nechyporchuk *et al.*, 2016).

Selulosa adalah polimer yang cenderung stabil karena terdapat ikatan hidrogen. Selulosa tidak dapat larut dalam air dan tidak mempunyai titik leleh. Selulosa mikroba atau selulosa bakteri dapat diproduksi dari pembiakan strain *Acetobacter xylinum* yang diklasifikasikan dalam genus *Glunacetobacter*. Bakteri tersebut umumnya dapat ditemukan pada sayur mayur, cuka, buah-buahan yang membusuk, minuman beralkohol dan jus buah. Bakteri yang termasuk dalam genus *Glunacetobacter* dapat mengubah etanol menjadi asam asetat (Rangaswamy *et al.*, 2015).

2.1.2 Struktur Selulosa

a) Ikatan Hidrogen

Selulosa mempunyai ikatan rantai linear yang relatif kuat karena adanya interaksi dengan ikatan hidrogen baik secara intramolekuler maupun intermolekuler. Sifat kimia dan fisik selulosa ditentukan oleh gugus OH pada selulosa (Liu *et al.*, 2015). Ikatan hidrogen memiliki karakteristik sebagai berikut:

- 1) Kekuatan energi ikatan bergantung pada kerapatan muatan dan sudut antara satu atom dengan atom lainnya terikat satu sama lain.
- 2) Distribusi elektron tidak simetris disebabkan oleh faktor sterik.
- 3) Kinetika jembatan –H, terjadinya perubahan kedudukan proton yang disebabkan oleh frekuensi gugus-gugus NH atau OH yang bergetar (Fengel & Wegener, 1983).

Tabel besaran energi ikatan antar molekul disajikan dalam Tabel 1:

Tabel 1. Besaran Energi Ikatan Antar Molekul

Bentuk ikatan	Energi ikatan (KJ mol ⁻¹)
H–OH (ikatan kovalen)	499
H–H (ikatan kovalen)	436
Ion-ion	250
Ikatan hidrogen (medium)	21 - 62
Ikatan hidrogen (lemah)	0,42 – 4,2
<i>London dispersion force</i>	2
<i>Dipole-dipole</i>	0,6 - 2

(Fatriasari *et al.*, 2019).

b) Derajat Polimerisasi

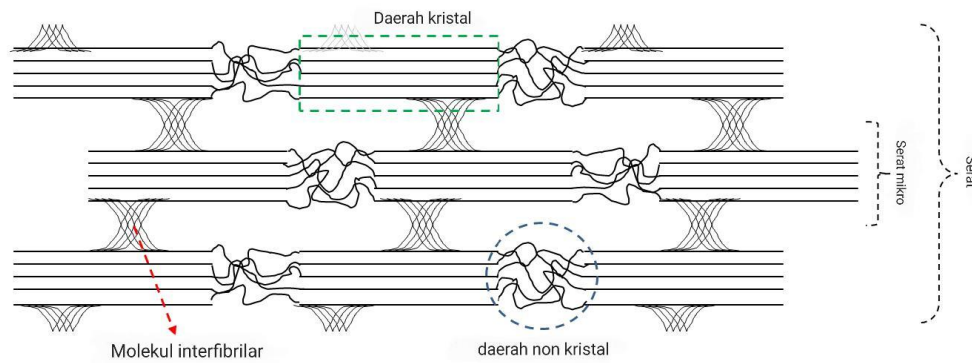
Derajat polimerisasi (DP) adalah ukuran panjang pendeknya rantai molekul yang dimiliki selulosa. DP dijadikan sebagai rasio antara berat molekul satu unit glukosa atau berat molekul selulosa. DP pada rantai selulosa yang ada di alam berkisar antara sepuluh ribu unit glukopiranosida pada kayu hingga lima belas ribu

pada kapas. Mikrokrystalin selulosa (MCC) Avicel PH, MCC-serat alfa, serat alfa komersial, dan MCC komersial masing-masing memiliki rata-rata sebesar 294, 318, 844 dan 294 (Hubbell & Ragauskas, 2010). Rata-rata DP yang dimiliki oleh polimer selulosa antara 300-3000 dan rata-rata bobot molekulnya berkisar antara 50.000-500.000 g.mol⁻¹. Proses hidrolisis menyebabkan penurunan bobot molekul mikrokrystalin selulosa antara 30.000 sampai 50.000 g.mol⁻¹ akibat pemutusan rantai pada selulosa yang membuat DP selulosa akan lebih kecil dari 400. Selain itu, DP selulosa dapat juga dipengaruhi oleh metode isolasi selulosa, metode penentuan DP dan perbedaan tumbuhan yang digunakan (Thoorens *et al.*, 2014).

c) Struktur Kristal Selulosa

Polimer selulosa tersusun dari dua bagian utama, bagian kristalin yang memiliki struktur yang teratur dan bagian amorf yang memiliki struktur yang tidak teratur. Susunan molekul selulosa yang teratur umumnya diselingi dengan susunan yang tidak teratur setiap rentang 60 nm sehingga memungkinkan terjadinya lipatan pada rantai selulosa (De Souza *et al.*, 2002). Selulosa kristalin yang memiliki struktur yang kuat dan rapat cenderung sulit dipisahkan ikatannya. Rasio antara bagian amorf dan kristalin disebut derajat kristalinitas selulosa. Bagian kristalin tersebut dapat mencakup 2/3 bagian dari total selulosa (Chum *et al.*, 1985).

Bagian kristalin terbentuk oleh ikatan hidrogen antara rantai selulosa dan adanya gaya van der Waals yang terjadi antara molekul glukosa. Umumnya, derajat kristalinitas selulosa berkisar antara 40-60% dimana telah mencakup berbagai macam sumber bergantung dari asal dan praperlakuan pada sampel saat pengukuran kristalinitas serta metode pengukuran derajat kristalinitas yang digunakan pada selulosa (Fink & Walenta, 1994). Fase pada selulosa dapat dilihat pada Gambar 2:



Gambar 2. Fase Kristal, Fase Amorf, dan Koneksi Antarmolekul Selulosa (Zuliat *et al.*, 2020).

Bagian amorf selulosa menunjukkan tingkat hidrolisis yang lebih tinggi dibandingkan bagian kristalin serta bagian ruahan (*bulk*) dimana selulosa amorf tidak bisa terakses saat hidrolisis asam (Keshwani, 2009).

d) Hornifikasi

Hornifikasi adalah suatu kondisi berkurangnya kemampuan serat untuk mengembang saat direndam kembali dalam air setelah melalui proses pengeringan. Pembasahan dan pengeringan yang berulang dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan ikatan silang antara mikrofibril-mikrofibril akibat penambahan ikatan hidrogen (Diniz *et al.*, 2004).

2.1.3 Sumber Selulosa

a) Selulosa Tumbuhan

Selulosa tumbuhan atau dikenal dengan selulosa tanaman merupakan selulosa yang bersumber dari tumbuhan. Selulosa ini dapat ditemukan di kayu dan diisolasi dengan proses kimiawi dalam skala besar serta mempunyai derajat polimerisasi (DP) selulosa sekitar 10.000. Melalui proses fotosintesis, selulosa dapat diproduksi oleh tanaman karena terjadinya penumpukan glukosa. Namun, selulosa tanaman umumnya bukan bentuk selulosa murni melainkan masih berbentuk lignoselulosa, lignin, pektin dan hemiselulosa. Oleh karena itu, diperlukan

perlakuan khusus agar dapat mengisolasi selulosa dari tanaman, contohnya dengan metode hidrolisis alkali yaitu pemisahan suatu senyawa dengan bantuan basa (Gromet-elhanan & Hestrin, 1962). Tabel komposisi kimiawi biomassa penghasil selulosa disajikan dalam Tabel 2:

Tabel 2. Komposisi Kimiawi Biomassa Penghasil Selulosa

Sumber	Komposisi (%)			
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin	Ekstrak
Bagasse	40	30	20	10
Batang jagung	35	25	35	5
Bonggol jagung	45	35	15	5
Jerami gandum	30	35	15	5
Kapas	95	2	1	0,4
Kayu keras	43 - 47	25 - 35	16 - 24	2 - 8
Kayu lunak	40 - 44	25 - 29	25 - 31	1 - 5

(Gea, 2010).

b) Selulosa Bakteri

Selulosa bakteri merupakan selulosa hasil sintesis atau sekresi bakteri dengan membentuk untaian benang selulosa yang terhubung membentuk membran selulosa. Membran selulosa dapat diproduksi sebagai usaha agar bakteri aerob selalu berada pada permukaan media dan dapat melindungi diri dari sinar ultraviolet (Iguchi *et al.*, 2000). Jenis bakteri yang banyak digunakan untuk menghasilkan selulosa bakteri adalah *Acetobacter sp.* Selulosa dari aktivitas bakteri ini mempunyai banyak keunggulan dibandingkan selulosa dari lignoselulosa. Keunggulan tersebut diantaranya tidak memiliki komponen selulosa sehingga mempunyai derajat kristalinitas yang tinggi (hingga 85%) (Joonobi *et al.*, 2015), elastisitas dapat mencapai 114 Gpa, densitas rendah, daya serap air mencapai 99%, biokompatibel dan struktur kristal yang mudah dibentuk dengan pendekatan *in situ* saat proses polimerisasi bakteri (Castro *et al.*, 2015).

Selulosa yang dihasilkan dari bakteri memiliki bobot yang ringan, tidak beracun, sifat mekanik yang tinggi, dan kemurnian yang tinggi. Produksi mikroba selulosa termasuk sumber serat nano selulosa berdasarkan sumber karbon yang murah meliputi residu agroindustri dan limbah cair (Putra *et al.*, 2008). Selulosa bakteri (BC) diproduksi sebagai metabolit primer ekstraseluler oleh bakteri yang termasuk dalam genus *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* dan *Salmonella*. Bakteri yang termasuk produsen paling efisien adalah bakteri asam asetat gram negatif yaitu *Acetobacter xylinum* yang telah direklasifikasi ke dalam genus *Gluconacetobacter* sebagai *G. xylinus*. Kultur bakteri dibuat dalam kondisi statis pada suhu 28-30°C. Sistem awalnya akan keruh disusul terbentuknya pelikel putih di permukaan bejana fermentasi. Karena bakteri yang digunakan bersifat aerob, pelikel selulosa hanya akan terbentuk di sekitar permukaan udara-cairan yang mengandung oksigen dengan cara mengadopsi bentuknya (Charreau *et al.*, 2013).

2.2 Isolasi Selulosa

2.2.1 Proses Mekanik

Cellulose nanofibril (CNF) merupakan material dengan bentuk gel dari serat kayu yang diproses hingga menjadi pulp menggunakan proses mekanik dengan metode *high pressure homogenizer* (HPH) dan pemanasan. Karena ikatan hidrogen pada serat pulp, energi yang diperlukan untuk proses fibrilasi cenderung sangat tinggi (700-1.400 MJ kg⁻¹) karena proses ini membutuhkan siklus yang banyak melalui mesin HPH. Pada proses ini, selulosa dihancurkan hingga menjadi bubur dalam alat sehingga serat selulosa akan rusak secara fisik (Nechyporchuk *et al.*, 2016).

2.2.2 Proses Enzimatik

Enzim yang banyak digunakan untuk memproduksi selulosa adalah enzim selulose hasil produksi jamur. Enzim selulose digolongkan menjadi tiga kelas diantaranya eksoglukanase berfungsi untuk mendegradasi fase amorf dan kristal selulosa secara progresif hingga menjadi disakarida (selobiosa). Enzim

endoglukanase merupakan yang paling efektif sebagai pendegradasi selulosa. Sedangkan, β -glukosidase berfungsi untuk menghidrolisis tetrasakarida dan disakarida menjadi glukosa (Zhou & Ingram, 2000).

2.2.3 Proses Kimia

Proses kimia dapat menghasilkan selulosa tanpa atau adanya perubahan pada gugus fungsi. Sifat permukaan selulosa dapat berubah menjadi kationik atau anionik karena perlakuan kimia dapat menentukan karakteristik CNC atau CNF yang dihasilkan. Gugus kationik dan anionik yang terbentuk pada permukaan selulosa dapat menyebabkan gaya tolak menolak antar muatan sehingga serat akan mengalami proses delaminasi (Isogai, 1994).

2.3 Limbah Tebu

Tebu adalah suatu tanaman yang dapat dijadikan sebagai bahan baku utama dalam pembuatan gula dan sumber kalori yang relatif murah. Pada industri pembuatan gula, dihasilkan *bagasse* dan molase dari tebu sebagai limbah industri. *Baggase* tebu berbentuk limbah padat dengan kandungan lignoselulosa yang tinggi. Molase merupakan limbah cair berwarna kehitaman yang mengandung glukosa dan fruktosa sehingga sulit untuk mengkristal. Selain itu, tetes tebu (SCM) juga termasuk produk samping dari industri gula. SCM mengandung gula, vitamin, mineral, nitrogen, dan asam nukleat sehingga media yang menggunakan SCM sebagai sumber karbon umumnya dapat meningkatkan produksi selulosa bakteri. Molase sebagai substrat fermentasi untuk mikroba terdiri dari glukosa, fruktosa, sukrosa yang bergabung bersama vitamin dan nitrogen untuk biosintesis selulosa (Tyagi & Suresh, 2016).

2.4 Nanoselulosa

2.4.1 Pengertian Nanoselulosa

Nanoselulosa adalah selulosa dengan ukuran nano yang diproduksi dari selulosa

alami pada sel tumbuhan. Nanoselulosa umumnya akan mempertahankan sifat *biodegradable* dan regeneratif dari selulosa alami. Selain itu nanoselulosa juga mempunyai luas permukaan spesifik yang relatif besar, biokompatibilitas, tidak beracun dan kemampuan untuk membentuk ikatan hidrogen yang efektif antar rantai-rantai selulosa hingga matriks polimer lain (Shankar & Jong-Whan, 2016).

Nanoselulosa dapat dibagi menjadi 3 bentuk utama diantaranya selulosa nanofibril, selulosa nanokristal, dan nanoselulosa bakterial. Tipe-tipe nanoselulosa tersebut umumnya mempunyai komposisi kimia yang sama, namun ketiganya mempunyai perbedaan dalam hal kristalinitas, ukuran partikel, morfologi, properti yang bergantung pada sumber biomassa dan metode ekstraksi yang dipakai. Selulosa nanokristal atau selulosa *nanowhiskey* diperoleh menggunakan metode hidrolisis asam dimana bagian amorf yang berada di selulosa *fiber* akan dihilangkan sehingga hanya menyisakan bagian kristalin. Selulosa nanokristal umumnya berbentuk batang pendek dan memiliki diameter 2-20 nm dengan panjang 100-500 nm. Selulosa nanofibril atau selulosa mikrofibril dapat diekstrak dari selulosa fibril dengan proses mekanis dimana bagian amorf dan bagian kristalin tetap ada (Ningtyas *et al.*, 2020). Bentuk nanoselulosa murni dapat dilihat pada Gambar 3:



Gambar 3. *Bacterial Nanocellulose (BNC)* (Sarkono *et al.*, 2011).

Nanoselulosa mempunyai diameter 1-100 nm dengan panjang 500-2000 nm. Nanoselulosa umumnya mempunyai dimensi ukuran yang menyebabkan

nanoselulosa mempunyai luas permukaan yang besar dan jumlah gugus hidroksil yang banyak. Hal ini memudahkan apabila akan dilakukan modifikasi permukaan pada nanoselulosa. Beberapa metode dikembangkan untuk mengekstrak nanoselulosa dari selulosa, seperti hidrolisis asam, proses mekanis dan hidrolisis enzimatis. Penggunaan metode-metode tersebut memungkinkan dihasilkan nanoselulosa dengan properti dan tipe yang berbeda (Julianto *et al.*, 2017).

2.4.2 Prospek Pemanfaatan Nanoselulosa

a) Kertas Nano

Nanoselulosa hasil isolasi selulosa umumnya mempunyai luas permukaan yang besar pada dimensi nano yang membuat rasio aspeknya relatif tinggi. Gugus karboksil dan hidroksil terpapar di permukaan selulosa sehingga bisa meningkatkan afinitas serat pulp dan dapat membentuk struktur tiga dimensi yang mengakibatkan peningkatan sifat mekanik kertas yang dihasilkan. Penambahan nanoselulosa juga dapat menurunkan intensitas fibrilasi dikarenakan CNF akan berperan sebagai promotor pada ikatan antar serat (Kalia *et al.*, 2014). Produksi kertas nano berbahan 100% selulosa dapat meningkatkan modulus dan kekuatan kertas masing-masing sebesar 317% dan 228%, dimana ukuran ini lebih tinggi dari kertas yang dibuat dengan bahan pulp dengan ukuran mikro (Gonzalez *et al.*, 2014). Nanoselulosa dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan ketahanan lapisan film berbasis kertas terhadap lemak dan oksigen dengan metode pelapisan permukaan yang dapat mempengaruhi penurunan porositas film (Shimizu *et al.*, 2016).

b) Nano Komposit Selulosa

Pada material nano komposit yang menggunakan selulosa sebagai penguat, ikatan antarmuka antara selulosa dan matriks polimer umumnya sangat kecil karena perbedaan gugus fungsi antara keduanya. Gugus fungsi selulosa bersifat hidrofilik, sedangkan gugus fungsi matriks polimer bersifat hidrofobik (Masrucin & Subyakto, 2012). Nanoselulosa perlu dimodifikasi sebelum digunakan dalam nanokomposit. Dapat dilakukan dengan modifikasi esterifikasi seperti proses

karboksimetilasi dan proses asetilasi, atau modifikasi amidasi seperti proses pengikatan oktadesilamina yang dilakukan pada gugus hidroksil selulosa (Habibi *et al.*, 2010).

c) Energi Terbaharukan dan Penyimpanan Energi

Pada produksi energi terbarukan nanoselulosa bertindak sebagai material yang dapat digunakan untuk memproduksi hidrogen, material pendukung sel bahan bakar (*fuel cell*), dan material pendukung dalam sel surya. Selain itu, nanoselulosa bermanfaat sebagai material penyimpanan energi yang difokuskan pada komposit selulosa dengan polimer konduktif *polypyrrole* (PPy) dan baterai berbasis litium (LiB). Nanoselulosa dapat digunakan sebagai material pendukung pada sel surya. Bahan organik memiliki keunggulan jika dibandingkan bahan anorganik seperti *dye-sensitized solar cells* (DSCC) karena tidak beracun, lebih murah, dan ketersediannya yang melimpah (Nystrom *et al.*, 2009).

d) Penyerap Logam Berat

Nanoselulosa yang memiliki luas permukaan yang besar dan kandungan gugus karboksilnya dapat berfungsi menjerat logam berat. Sebelum dimanfaatkan sebagai penjerap, selulosa harus diberi perlakuan khusus terlebih dahulu, seperti perlakuan asam, perlakuan basa, dan pencakokan. Umumnya, selulosa yang digunakan dalam bentuk komposit selulosa. Nanoselulosa memiliki luas permukaan yang besar dan adanya gugus karboksil meningkatkan jerapan terhadap adanya logam berat (Jamsahid *et al.*, 2017).

e) Biomedis

Selulosa dapat dimanfaatkan sebagai material biomedis karena memenuhi kriteria sebagai bahan yang bersifat hidrofilik, tidak beracun, relatif kuat, dan kompatibel dengan tubuh dan organ manusia. Salah satu aplikasi selulosa pada bidang ini adalah sebagai material implan, sebagai kerangka pada rehabilitasi tendon dan ligamen yang luka, penghantar obat (*drug delivery*), serta digunakan sebagai

material diagnosa dan biosensor. Selain itu, selulosa juga dapat dimanfaatkan sebagai kajian dalam pengembangan *tissue engineering* (rekayasa jaringan) dan material diagnosa dan biosensor (Orelma *et al.*, 2012).

2.5 Bacterial Nanocellulose (BNC)

BNC termasuk selulosa murni dari bakteri yang mempunyai derajat polimerisasi yang relatif tinggi dibandingkan selulosa dari tanaman, yaitu mencapai 2000 sampai 6000 sehingga mempunyai kapasitas menahan air lebih tinggi. BNC adalah polimer linier glukosa berbentuk kristalin yang disintesis oleh bakteri terutama *Gluconacetobacter xylinus*. atau *G. xylinus* merupakan produsen mikroba utama untuk BNC dan telah menjadi sistem model untuk studi mekanisme biosintesis BNC. Hal ini disebabkan karena BNC memiliki ikatan hidrogen yang lebih banyak dan lebih kuat daripada selulosa tanaman (Gatenholm & Klemm, 2010).

Terdapat dua metode yang dapat digunakan untuk memproduksi BNC dengan menggunakan mikroorganisme yaitu dengan kultur statis dan kultur diaduk. Kultur statis umumnya menghasilkan akumulasi pelikel bakteri selulosa yang tebal dengan warna putih seperti kulit antarmuka di udara-cair (Kuo *et al.*, 2015). Pada kultur diaduk, selulosa disintesis secara terdispersi dalam media kultur sehingga akan membentuk pelet yang tidak beraturan atau serat yang tersuspensi (Krystynowicz *et al.*, 2002).

Pilihan antara kultur statis dan kultur diaduk bergantung pada aplikasi akhir BNC dikarenakan sifat fisik, morfologi dan mekanik dari polimer yang dibentuk akan bervariasi menyesuaikan dengan metode budidayanya. Umumnya, selulosa yang dihasilkan dari kultur yang diaduk mempunyai kekuatan mekanik yang lebih rendah dibandingkan dengan selulosa hasil kultur statis. Hasil kultur diaduk juga menghasilkan selulosa dalam jumlah yang lebih rendah daripada kultur statis dan memungkinkan mutasi yang lebih tinggi pada mikroorganisme yang dapat mempengaruhi produksi BNC. Namun, kultur statis membutuhkan area budidaya yang lebih luas dan waktu

kultur yang lebih lama dibandingkan kultur diaduk (Jozala *et al.*, 2016).

2.6 Biosintesis Nanoselulosa

Biosintesis nanoselulosa adalah suatu metode sintesis nanoselulosa dengan bantuan bakteri. Bakteri *Acetobacter xylinum* menggunakan glukosa sebagai sumber karbon utamanya untuk memproduksi selulosa. Selain itu, nanoselulosa dapat pula disintesis dari galaktosa, fruktosa, oligosakarida, xilosa dan gliserol (Keshk & Sherif, 2014). Nanoselulosa dapat diproduksi dengan empat tahap enzimatik. Pertama, glukosa ditransfer melalui membran yang ada di sel bakteri. Tahap kedua adalah fosforilasi yaitu dengan memanfaatkan enzim *glucose kinase* untuk memproduksi glukosa 6-fosfat. Tahap ketiga, glukosa 6-fosfat kemudian terisomerisasi hingga menjadi glukosa 1-fosfat dengan bantuan enzim *phospoglucomutase*. Kemudian, glukosa 1-fosfat akan diubah menjadi *uridine 5'-diphosphate glucose* atau UDPG dengan menggunakan bantuan enzim *UDPG pyrophosphorylase*. Tahap ke empat yaitu polimerisasi UDPG dengan menggunakan enzim *cellulose synthase* hingga menghasilkan nanoselulosa (Wong *et al.*, 1990).

2.7 Bakteri Asam Asetat

Bakteri asam asetat merupakan kelompok bakteri yang mengoksidasi etanol atau gula menghasilkan asam asetat saat fermentasi. Bakteri ini dapat diisolasi dari buah yang telah busuk atau nektar bunga. Selulosa bakteri (BC) diproduksi sebagai metabolit primer ekstraseluler oleh bakteri yang termasuk dalam genus *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* dan *Salmonella*. Bakteri yang termasuk produsen paling efisien adalah bakteri asam asetat gram negatif yaitu *Acetobacter xylinum* yang telah direklasifikasi ke dalam genus *Gluconacetobacter* sebagai *G. xylinus* (Charreau *et al.*, 2013).

Bakteri *Acetobacter xylinum*/*Gluconacetobacter xylinus* termasuk bakteri asam asetat yang tidak menimbulkan penyakit pada manusia. Bakteri

Gluconacetobacter xylinus dapat memproduksi selulosa bakteri dalam jumlah yang sangat banyak dari sumber nitrogen dan karbon (Chawla *et al.*, 2009). Biosintesis selulosa dapat dicapai menggunakan polimerisasi residu glukosa dengan substrat UDP-glukosa dan dikatalisis oleh enzim selulosa synthase dalam membran sel bakteri. Dalam biakan statis, *G. xylinus* memproduksi banyak fibril selulosa yang terikat membentuk pelikel yang mengikat sel-sel bakteri. Pelikel yang dihasilkan akan mengapung ke permukaan medium cair sehingga memungkinkan sel bakteri mendapatkan lebih banyak oksigen untuk memperbanyak diri dan sintesis selulosa (Suharjono *et al.*, 2016).

Bakteri asam asetat yang paling efisien dalam menghasilkan selulosa adalah *Acetobacter* dan *Gluconacetobacter*. Kedua bakteri tersebut termasuk bakteri gram negatif yang bersifat aerobik dengan bentuk batang. Bakteri tersebut akan memproduksi pelikel BC yang mempunyai struktur nanofibril dengan permukaan yang lebih padat di salah satu sisinya dan lapisan mirip gelatin di sisi lainnya. Hasil sintesis bakteri aerobik seperti bakteri asam asetat akan menghasilkan *Bacterial nanocellulose* (BNC) yaitu *Gluconacetobacter* spp dan *Acetobacter* sp. yang memiliki bentuk berupa selulosa murni dengan diameter berukuran nano (Gatenholm & Klemm, 2010).

2.8 Isolat Kc-T-1

Isolat Kc-T-1 merupakan isolat hasil isolasi mikroba penghasil BNC menggunakan medium HS (*Hestrin-Scrhamm Agar*). Sampel yang digunakan berupa kombucha yang diperoleh dari daerah Tangerang. Hasil penamaan didasarkan pada (Kombucha-Asal daerah kombucha-Nomor isolat). Metode awal isolasi isolat Kc-T-1 dilakukan dengan pembuatan media untuk adaptasi. Untuk mengetahui kadar gula, medium diukur nilai Brixnya dengan menggunakan Brix Refraktrometer. Selanjutnya, media diinkubasi selama seminggu dalam kondisi statis. Metode ini bertujuan agar bakteri yang berada pada kombucha dapat beradaptasi dalam medium HS sebelum dilakukan isolasi dan produksi. Pelikel yang telah terbentuk, kemudian diisolasi dengan media HS-Agar menggunakan teknik *spread plate* (Azizah, 2022).

Pelikel ditumbuk hingga menjadi butiran-butiran halus. Pelikel kombucha yang telah halus, lalu dimasukkan sebanyak 1 g ke dalam 9 mL air salin atau air salin pada konsentrasi 0,96% sehingga dapat dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-6} . Suspensi tersebut kemudian diambil sebanyak 100 mikro Liter dan disebar ke dalam cawan petri yang mengandung medium HS-Agar, lalu diinkubasi selama 48 jam. Morfologi koloni bakteri, umumnya berbentuk bulat dengan warna putih. Selanjutnya, bakteri penghasil BNC diseleksi menggunakan media padat GEY (*Glucose, Ethanol, Yeast Extract*) dan diinkubasi selama 48 jam. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni menunjukkan bahwa isolat bakteri dapat menghasilkan selulosa (Azizah, 2022).

Isolat yang telah melewati uji media GEY, selanjutnya dilakukan skrining menggunakan media HS padat. Peremajaan dilakukan dengan mengambil sebanyak 2 ose kultur dan digoreskan pada media HS-Agar hingga 3 kali penggoresan, lalu diinkubasi selama 48 jam. Isolat yang tumbuh, diisolasi kembali dengan media GEY padat untuk memastikan isolat murni sehingga dapat berpotensi menghasilkan BNC. Berdasarkan proses isolasi dan uji seleksi dihasilkan isolat Kc-T-1 yang berpotensi menghasilkan BNC. Isolat disimpan sebagai stok (Azizah, 2022).

2.9 Karakterisasi Bakteri Nanoselulosa

2.9.1 *Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR)*

Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR) merupakan suatu metode analisis instrumentasi yang dapat digunakan pada senyawa kimia dengan bantuan radiasi sinar infra merah. Umumnya, FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi pada senyawa organik. Apabila senyawa organik diradiasi dengan menggunakan sinar inframerah, maka sebagian sinar akan diteruskan sedangkan yang lainnya akan diserap oleh senyawa tersebut. Jumlah energi total akan sebanding dengan tetapan gaya dan frekuensi vibrasi melalui massa dan pegas dari dua atom yang terhubung. Prinsip kerja FTIR yaitu adanya interaksi materi dengan energi. Apabila molekul senyawa

organik ditembak dengan energi dari suatu sumber sinar maka molekul dapat mengalami vibrasi. Sumber sinar yang umumnya digunakan adalah material berbahan keramik sehingga jika dialiri arus listrik maka akan memancarkan sinar inframerah (Winarno *et al.*, 1980).

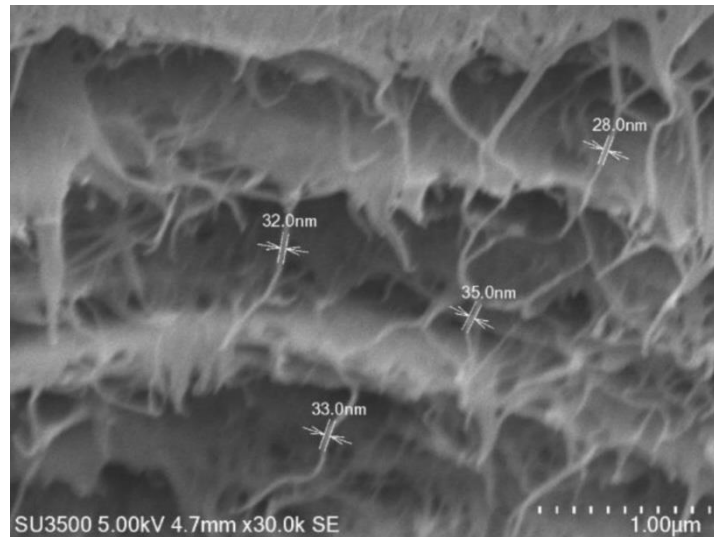
Hasil analisis gugus fungsi menggunakan FTIR dapat membuktikan hasil yang diperoleh adalah selulosa. Hasil spektrum IR atau puncak selulosa bakteri komersial umumnya terdapat pada panjang gelombang $1568,12\text{ cm}^{-1}$. Hal tersebut menunjukkan adanya gugus C=C pada cincin aromatik lignin. Sedangkan puncak hemiselulosa terlihat pada panjang gelombang $1408,04\text{ cm}^{-1}$. Gugus-gugus tersebut dapat membuktikan keberadaan lignin dan hemiselulosa. Selain itu, selulosa bakteri dapat juga dianalisis berdasarkan serapan gugus -OH stretching yang muncul pada daerah serapan 3600 cm^{-1} sampai 3300 cm^{-1} (Nurjannah *et al.*, 2020).

2.9.2 Scanning Electron Microscope (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) merupakan suatu mikroskop elektron yang memanfaatkan berkas elektron untuk menganalisis bentuk permukaan material. Fungsi SEM adalah untuk memindai balok halus elektron yang terdapat pada sampel secara terfokus. Elektron akan berinteraksi dengan sampel pada komposisi molekul. Energi pada elektron akan melewati sampel dalam proporsi dan jenis interaksi elektron yang dapat dihasilkan sampel. Serangkaian energi elektron yang terukur dihasilkan dan dianalisis dengan mikroprosesor menciptakan gambar tiga dimensi atau spektrum elemen khusus pada sampel yang dianalisis (Marlina, 2007).

Struktur molekul nanoselulosa umumnya memiliki sifat yang unik, karena adanya reaktivitas yang tinggi dari gugus OH pada selulosa. Nanoselulosa mempunyai daerah yang dominan teratur. Hal tersebut dikarenakan sebagian besar molekul dan kristal teratur terdapat pada jalur yang sejajar dengan rantai difibril yang sangat halus atau serat mikrofibril yang dapat membentuk gelombang atau goncangan pada permukaannya. Jaringan ikatan hidrogen yang luas, dapat

memberikan selulosa morfologi dan struktur serat kristalin dalam jumlah banyak (Stanislawski, 2016). Hasil uji SEM nanoselulosa ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji SEM Nanoselulosa pada Perbesaran 30.000 x (Sijabat *et al.*, 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2022 – Juni 2023 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis SEM dan FTIR dilakukan di Unit Pelayanan Terpadu Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung kaca 140 mL, gelas beaker, Erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, mikropipet, pinset, *Laminar Air Flow* (LAF) merek CURMA model 9005-FL, *Scanning Electron Microscope* (SEM) merek Zeiss evo MA10 dibuat di Kanada, *Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy* (FTIR) merek Cary 630 Agilent dibuat di California, *autoclave* model S-90N, bunsen, *hot plate*, oven, inkubator, pH meter, Refraktometer Brix (0-32%), jarum ose, neraca digital, cawan petri, kain kasa, dan kapas.

Bahan – bahan yang digunakan diantaranya D-glukosa, fruktosa, galaktosa, pepton, Na_2HPO_4 , NaOH, NaCl, *agar powder*, *yeast extract*, etanol 70%, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , akuades, *beef extract*, NH_4Cl , NaNO_3 , NH_4NO_3 , asam sitrat, molase dan isolat Kc-T-1.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap Persiapan Alat

Tahap pertama merupakan sterilisasi. Sterilisasi berfungsi untuk menghilangkan kontaminan atau mikroba lain yang tidak diinginkan pada alat dan media. Alat-alat gelas yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci hingga bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas secara rapat, untuk kemudian disterilisasi dengan *autoclave* dengan suhu 125°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, alat-alat gelas dikeringkan kembali dengan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 15 menit.

3.3.2 Pembuatan Media

3.3.2.1 Medium Hestrin-Schramm (HS) Cair

Medium HS cair dibuat dengan melarutkan 2 g *yeast extract*, 0,5 g pepton, 2 g glukosa, 0,12 g asam sitrat dan 0,27 g Na₂HPO₄ dalam 100 mL akuades.

Kemudian, media dipanaskan sampai seluruh bahan larut sempurna dan pH medium dibuat menjadi 6,0. Media lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 125°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.2.2 Medium Hestrin-Schramm (HS) Cair Termodifikasi

Medium HS cair termodifikasi dibuat dengan melarutkan 2 g *yeast extract*, 0,5 g pepton, 0,12 g asam sitrat dan 0,27 g Na₂HPO₄ dalam 100 mL limbah cair molase yang mengandung glukosa dengan nilai Brix sebesar 6%. Kemudian, media dipanaskan sampai seluruh bahan larut sempurna dan pH medium dibuat menjadi 6,0. Media lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 125°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.2.3 Medium Hestrin-Schramm (HS) Agar

Medium HS agar dibuat dengan melarutkan 2 g *agar powder*, 0,5 g *yeast extract*, 0,5 g pepton, 2 g glukosa, 0,12 g asam sitrat dan 0,27 g Na₂HPO₄ dalam 100 mL

akuades. Kemudian, media dipanaskan sampai seluruh bahan larut sempurna dan pH medium dibuat menjadi 6,0. Media lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil BNC

Tahap peremajaan berfungsi untuk mendapatkan isolat bakteri yang lebih murni dengan aktivitas yang baik. Kultur isolat yang dapat menghasilkan BNC ditumbuhkan dalam media standar Hestrin-Schramm Agar. Stok gliserol beku isolat Kc-T-1 dicairkan terlebih dahulu hingga suhunya mencapai suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 100µL cairan isolat dipindahkan pada medium HS Agar dan ditambahkan larutan salin steril dengan jumlah yang sama. Kemudian, keduanya dicampurkan dengan gerakan memutar menggunakan batang L hingga menyebar dan mengenai seluruh permukaan medium Agar, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah isolat tumbuh, dilakukan pemurnian dengan cara menggoreskan secara berulang pada medium HS Agar. Sebanyak 1 ose kultur diambil dan dilakukan pemurnian dengan metode *streak plate* pada 4 kuadran dan diinkubasi selama 24 jam.

3.3.4 Pembuatan Inokulum

Koloni tunggal hasil peremajaan sebanyak 2 ose diinokulasikan pada media Hestrin-Schramm cair sebanyak 25 mL. Inokulum dinkubasi pada suhu ruang selama 20 jam (semalaman) dalam kondisi agitasi 150 rpm.

3.3.5 Optimasi Kondisi Kultur Isolat

Kondisi Kultur Standar

Medium yang digunakan yaitu medium HS cair yang menggunakan glukosa sebagai sumber karbon dan medium HS-termodifikasi (limbah cair molase yang mengandung glukosa dengan nilai Brix sebesar 6%). pH awal kultur adalah pH 6,0 dalam kondisi statis dengan masa fermentasi 14 hari.

3.3.5.1 Variasi pH Kultur

Kultur hasil inokulum diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) dalam media HS termodifikasi sebanyak 50 mL dalam botol kaca 140 mL. Diinkubasi dengan pH masing-masing 4,5; 5,0; 5,5 dan 6,0 selama 14 hari. Kemudian, diukur berat BNC yang dapat dihasilkan. Isolat yang ditumbuhkan pada kondisi standar dijadikan sebagai kontrol.

3.3.5.2 Variasi Sumber Karbon (C)

Media dengan hasil variasi pH kultur terbaik digunakan sebagai media fermentasi sumber karbon. Kultur hasil inokulum diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) dalam medium HS termodifikasi sebanyak 50 mL dalam botol kaca 140 mL. Media HS termodifikasi sebelumnya ditambahkan sumber karbon lain diantaranya D-glukosa, galaktosa dan fruktosa dengan konsentrasi 2% (w/v). Sumber C terbaik kemudian diuji lebih lanjut dengan variasi konsentrasi 3%, 4%, dan 5% dalam komposisi medium yang digunakan dan difermentasi selama 14 hari. Kemudian, diukur berat BNC yang dapat dihasilkan.

3.3.5.3 Variasi Sumber Nitrogen (N)

Medium pertumbuhan dengan sumber karbon terbaik kemudian dilakukan variasi sumber nitrogen Kultur hasil inokulum diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) dalam medium HS termodifikasi sebanyak 50 mL dalam botol kaca 140 mL. Medium HS termodifikasi sebelumnya ditambahkan *beef extract*, NH_4Cl , NaNO_3 , dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ masing-masing sebanyak 1% (w/v). Selanjutnya, difermentasi selama 14 hari. Kemudian, diukur berat BNC yang dapat dihasilkan.

3.3.5.4 Variasi Sumber Fosfat

Medium pertumbuhan dengan sumber karbon dan nitrogen terbaik kemudian dilakukan variasi sumber fosfat. Kultur hasil inokulum diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) dalam medium HS termodifikasi sebanyak 50 mL dalam botol kaca 140 mL. Medium HS termodifikasi sebelumnya ditambahkan KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , dan

NaH₂PO₄ masing-masing 0,27%. Selanjutnya, difermentasi selama 14 hari. Kemudian, diukur berat BNC yang dapat dihasilkan.

3.3.6 Pengukuran *Water Hold Capacity*

Pelikel BNC yang telah terbentuk pada permukaan medium diambil dan ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui berat basah. Selanjutnya, dibersihkan menggunakan akuades agar sisa medium dapat dihilangkan secara keseluruhan. Pelikel yang telah dibersihkan direndam dalam larutan NaOH 0,1 M pada suhu 100°C selama 30 menit, lalu dicuci beberapa kali dengan akuades hingga pH mencapai 7. Lalu, dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 48 jam dan ditimbang kembali untuk mengetahui berat kering. Pengukuran kandungan air (%w/w) dalam pelikel didasarkan pada kehilangan berat saat pemanasan. Pengukuran berat air dilakukan untuk mengetahui kadar air dalam pelikel selulosa sehingga dapat diketahui kemampuan selulosa dalam menahan air dan kualitas selulosa yang akan dihasilkan. Pengukuran kandungan air dapat dihitung menggunakan Persamaan 1:

$$\text{WHC \%} = \frac{(\text{Berat basah} - \text{berat kering})}{\text{berat basah}} \times 100\% \quad (1)$$

3.3.7 Karakterisasi Nanoselulosa Bakterial

3.3.7.1 *Scanning Electron Microscope (SEM)*

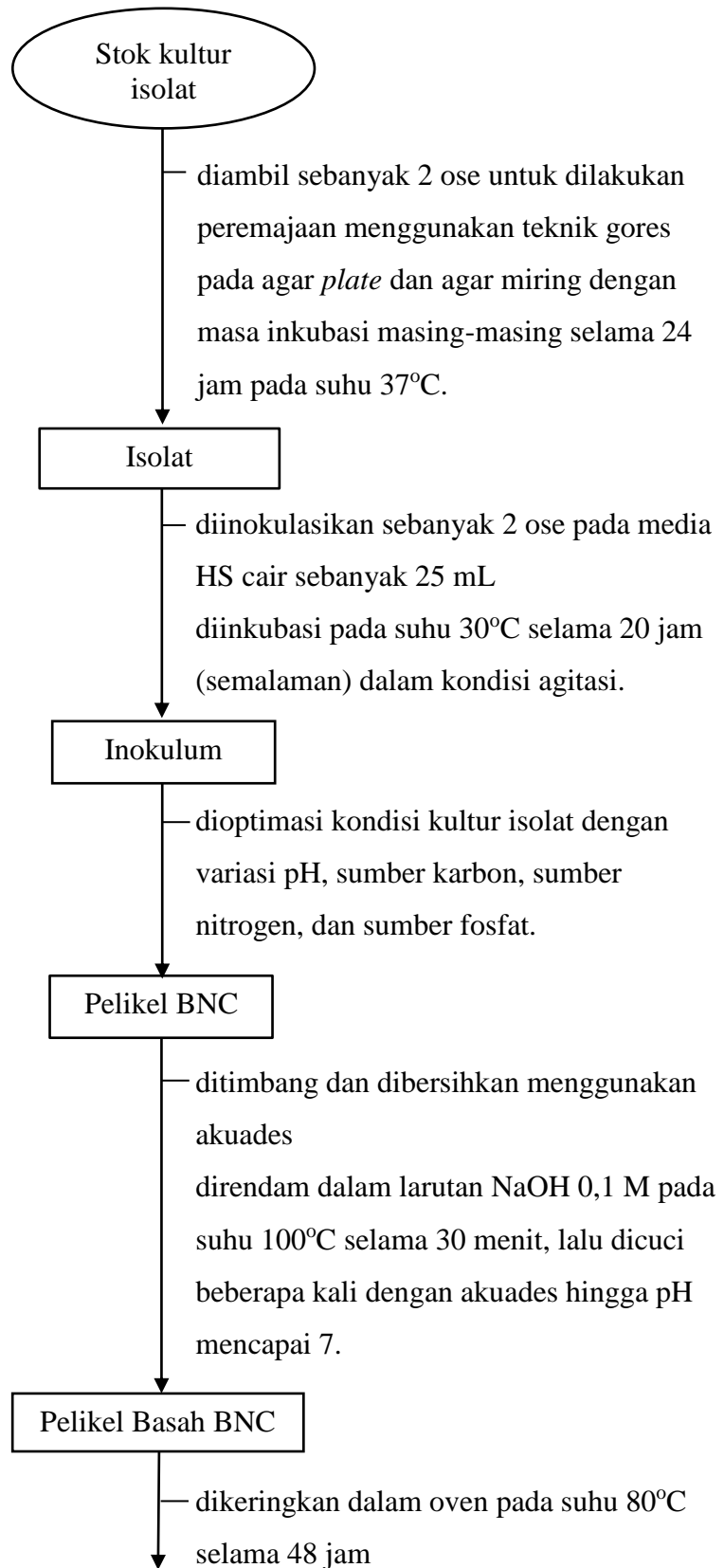
Sampel pelikel bakteri nanoselulosa dipotong-potong dan dikeringkan sampai beratnya konstan. Sampel yang telah kering lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk. Morfologi permukaan BNC dianalisis dengan instrumen SEM.

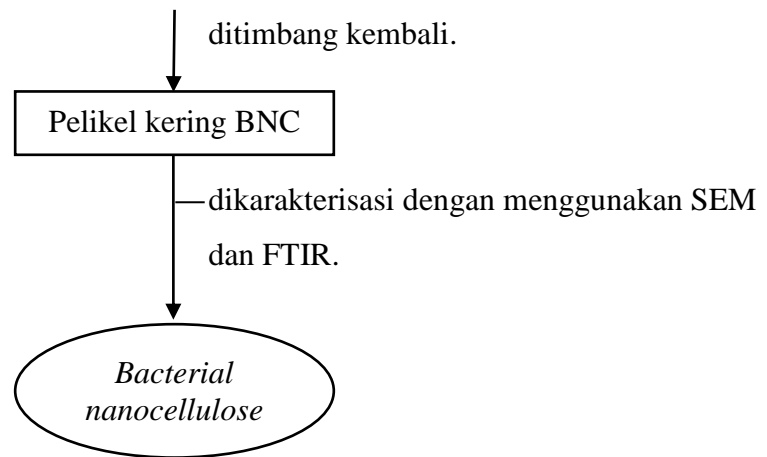
3.3.7.2 *Fourier Transform Infra - Red (FTIR)*

Sampel pelikel bakteri nanoselulosa dikeringkan sampai beratnya konstan. Sampel yang telah kering lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk. Analisis dilakukan dengan FTIR pada range spektrum 500-4000 cm⁻¹ pada suhu ruang.

3.4 Diagram Alir

Adapun diagram alir pada penelitian ini yaitu:





Gambar 5. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Penambahan sumber karbon pada medium HS termodifikasi menyebabkan penurunan hasil produksi BNC.
2. Berat basah yang dihasilkan setelah penambahan sumber fosfat cenderung tidak bertambah secara signifikan jika dibandingkan dengan medium tanpa penambahan sumber fosfat.
3. Hasil optimum produksi BNC oleh isolat Kc-T-1 pada medium HS termodifikasi ditunjukkan pada pH 6 dengan penambahan sumber nitrogen berupa *beef extract* tanpa penambahan sumber karbon dan sumber fosfat.
4. Presentase nilai *water hold capacity* (WHC) dari medium fermentasi dengan variasi pH kultur, sumber karbon, sumber nitrogen dan sumber fosfat berkisar antara 96%-98%.
5. Hasil analisis menggunakan SEM dan FTIR menunjukkan besaran partikel BNC berada pada permukaan nano dan termasuk golongan selulosa.

5.2 Saran

Adapun saran yang perlu disampaikan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

1. Memanfaatkan limbah industri lain yang mengandung glukosa untuk produksi BNC.
2. Mengeksplorasi aplikasi potensial BNC dalam berbagai bidang seperti industri makanan, elektronik dan biomedis.
3. Membuat sistem buffer untuk medium fermentasi BNC agar pH seimbang.

DAFTAR PUSTAKA

- Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., Virgina, P., & Devanthi, P. (2020). Isolation and Screening of Microbial Isolates from Kombucha Culture for Bacterial Cellulose Production Sugarcane Molasses Medium. *International Conference of Biotechnology and Life Sciences, KnE Life Sciences*, 111–127.
- Asmoro, N. W., Afriyanti, & Ismawati. (2018). Ekstraksi Selulosa Batang Tanaman Jagung (*Zea Mays*) Metode Basa. *Jurnal Ilmiah Teknosains*, 4(1), 24–28.
- Asthary, P. B., Saepulloh, Sanningtyas, A., Pertiwi, G. A., Purwita, C. A., & Septiningrum, K. (2020). Optimasi Produksi Bakterial Nanocellulose dengan Metode Kultur Agitasi. *Jurnal Selulosa*, 10(2), 89–100.
- Aswini, K., Gopal, N. O., & Uthandi, S. (2020). Optimized Culture conditions for bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology*, 20(46), 1–16.
- Azizah, L. (2022). *Produksi Bakterial Nanocellulose (BNC) Oleh Isolat Lokal Kc-T-1 Asal Kombucha dari Limbah Cair Molase*. Universitas Lampung.
- Bondenson, D., Mathew, A., & Oksman, K. (2006). Optimization of The Isolation of Nanocrystals from Microcrystalline Cellulose by Acid Hydrolysis. *Cellulose*, 171–180.
- Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of The Fermentation Process and Properties of Bacterial Cellulose : A Review. *Cellulose*, 23, 57–91.
- Castro, C., Corderio, N., Faria, M., Zuluaga, R., Putuaux, J. L., Filpponen, I., Valez, L., Rojas, A., & Ganan, P. (2015). In Situ Glyoxalization During Biosynthesis of Bacterial Cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 32–39.
- Charreau, H., Foresti, M. L., & Vazquez, A. (2013). Nanocellulose Patents Trends: A Comprehensive Review on Patents on Cellulose Nanocrystals, Microfibrillated and Bacterial Cellulose. *Recent Patents on Nanotechnology*, 7(1), 56–80.

- Chawla, P. R., Bajaj, S. A., Survase, & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Fermentation Food Technol. *Biotechnol*, 47(2), 107–124.
- Chum, H. L., Douglas, L. J., Feinberg, D. A., & Schroeder, H. A. (1985). *Evaluation of Pretreatments of Biomass for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Solar Energy Research Institute.
- De Souza, I. J., Bouchard, J., Methot, M., Berry, R., & Argyropoulos, D. S. (2002). Carbohydrates in Oxygen Delignification. Part I: Changes in Cellulose Crystallinity. *Journal of Pulp and Paper Science*, 28(5), 167–170.
- Diniz, J. M., Gil, M. H., & Castro, J. A. (2004). Hornification-Its Origin and Interpretation in Wood Pulps. Wood Science and Technology. *Wood Science and Technology*, 37(6), 489–494.
- Fajrin, I., Amrani, S. Z., & Muria, S. R. (2015). Pengaruh Volume Inokulum pada Produksi Bioetanol dari Limbah Kulit Nanas Menggunakan *Zymomonas Mobilis* dengan Metode Solid State Fermentation (SSF). *Jurnal Rekayasa Bioproses*, 1–5.
- Fatriasari, W., Masruchin, N., & Hermiati, E. (2019). *Selulosa: Karakteristik dan Pemanfaatannya*. LIPI Press.
- Febrianti, N. (2019). *Biosintesis Selulosa oleh Acetobacter xylinum menggunakan Limbah Cair Tahu sebagai Media Pertumbuhan dengan Penambahan Molase*.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1983). *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter.
- Fernandes, E. M., Pires, R. A., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2013). Bionanocomposites from Lignocellulosic Resources: Properties, Applications, and Future Trends for Their Use In The Biomedical Field. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1415–1441.
- Fifendy, M., Eldini, & Irdawati. (2013). Pengaruh Pemanfaatan Molase Terhadap Jumlah Mikroba dan Ketebalan Nata pada Teh Kombucha. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*, 67–72.
- Fink, H. P., & Walenta, E. (1994). Röntgenbeugungsuntersuchungen Zur Übermolekularen Struktur von Cellulose im Verarbeitungsprozess. *Das Papier*, 48(12), 739–748.
- Gao, Y., Li, Q., Shi, Y., & Cha, R. (2016). Preparation and Application of Cationic Modified Cellulose Fibrils as a Papermaking Additive. *International Journal of Polymer Sciences*, 1–8.

- Gatenholm, P., & Klemm, D. (2010). Bacterial Nanocellulose as a Renewable Material for Biomedical Applications. *MRS Bulletin*, 35(3), 208–2013.
- Gea, S. (2010). *Innovative Bio-nanocomposites Based on Bacterial Cellulose*. Queen Mary University of London.
- Gonzalez, I., Alcalá, M., Chinga-Carrasco, G., Vilaseca, F., Boufi, S., & Mutje, P. (2014). From Paper to Nanopaper: Evolution of Mechanical and Physical Properties. *Cellulose*, 21(4), 2599–2609.
- Gromet-elhanan, Z., & Hestrin, S. (1962). Synthesis Of Cellulose by Acetobacter Xylinum. *Bacterial Journal*, 284–292.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Celulose Nanocrystals: Chemistry, Self-assembly, and Applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3480–3500.
- Hubbell, C. A., & Ragauskas, A. J. (2010). Effect of Acid-Chlorite Delignification on Cellulose Degree of Polymerization. *Bioresource Tecnology*, 101(9), 7410–7415.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial Cellulose - a Masterpiece of Nature's Arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270.
- Indrianingsih, A. W. (2017). "Preliminary Study on Biosynthesis and Characterization of Bacteria Cellulose Films from Coconut Water." *Earth and Environmental Science*, 1–8.
- Isogai, A. (1994). *Cellulosic Polymers: Blends and Composites*. Hanser Publisher.
- Jamsahid, A., Hamid, A., Muhammad, N., Naseer, A., Ghauri, M., Iqbal, J., Rafiq, S., & Shah, N. S. (2017). Cellulose-based Materials for The Removal of Heavy Metals from Wastewater: An overview. *Chemical BioEngineering Reviews*, 4(4), 1–18.
- Joonobi, M., Oladi, R., Davoudpour, Y., Oksman, K., Dufresne, A., Hamzeh, Y., & Davoodi, R. (2015). Different Preparation Methods and Properties of Nanostructured cellulose from Various Natural resources and residues: A review. *Cellulose*, 22(2), 935–969.
- Jozala, A. F., Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., Santos-Ebinuma, V. C., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., Grotto, D., Gerenutti, M., & Chaud, M. V. (2016). Bacterial Nanocellulose Production and Application: a 10-year Overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2063–2072.
- Julianto, H., Farid, M., & Rasyida, A. (2017). Ekstraksi Nanoselulosa dengan Metode Hidrolisis Asam sebagai Penguat Komposit Absorpsi Suara. *Jurnal Teknik ITS*, 6(2), 242–245.

- Kalia, S., Boufi, S., Celli, A., & Kango, S. (2014). Nanofibrillated Cellulose: Surface Modification and Potential Applications. *Colloid and Polymer Science*, 292(1), 5–31.
- Keshk, M., & Sherif. (2014). Bacterial Cellulose Production and Its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2), 1–10.
- Keshwani, D. R. (2009). *Microwave Pretreatment of Switchgrass for Bioethanol Production*. North Carolina State University.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358–3393.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors Affecting The Yield and Properties of Bacterial Cellulose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 189–195.
- Kuo, C. H., Chen, J. H., Liou, B. K., & Lee, C. K. (2015). Utilization of Acetate Buffer to Improve Bacterial Cellulose Production by *Glucanoacetobacter xylinus*. *Food Hydrocoll*, 98–103.
- Liu, H., Lynne, S. T., & Edgar, K. J. (2015). The Role of Polymers in Oral Bioavailability Enhancement: A review. *Polymer*, 77, 399–415.
- Ludwicka, K., Kaczmarek, M., & Bialkowska, A. (2020). Bacterial Nanocellulose A Biobases Polymer for Active and Intelligent food Packaging Applications: Recent Advances and Developments. *International Journal of Polymer Science*, 2208–2209.
- Marlina, L. (2007). *Sintesis Nanopartikel Zinc Oxide (ZnO) untuk Aplikasi Sebagai Tinta Pengaman*. FMIPA ITB.
- Masrucin, N., & Subyakto. (2012). Investigation Characteristics of Pulp Fibers as Green Potential Polymer Reinforcing Agents. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, 13(2), 9–96.
- Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of Cellulose Nanofibrils: A Review of Recent Advances. *Industrial Crops and Products*, 2–25.
- Neera, Ramana, K. V, & Batra, H. V. (2015). Occurrence of Cellulose-Producing *Glucanoacetobacter* spp. in Fruit Samples Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. *Appl Biochem Biotechnol*, 1–12.
- Ningtyas, K. R., Muslihudin, M., & Sari, I. N. (2020). Sintesis Nanoselulosa dari Limbah Hasil Pertanian dengan Menggunakan Variasi Konsentrasi Asam. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 20(2), 142–147.

- Nurjannah, N. R., Sudiarti, T., & Rahmidar, L. (2020). Sintesis dan Karakterisasi Selulosa Termetilasi Sebagai Biokomposit Hidrogel. *Jurnal AL-Kimiya*, 7(1), 19–27.
- Nystrom, G., Razaq, A., Stromme, M., & Mihranyan, A. (2009). Ultrafast All-polymer Paper Based Batteries. *Nano Letters*, 9(10), 3635–3639.
- Orelma, H., Filpponen, I., Johansson, L. S., Osterberg, M., Rojas, O. J., & Laine, J. (2012). Surface Functionalized Nanofibrillar Cellulose (NFC) Film as A Platform for Immunoassays and Diagnostics. *Biointerphases*, 7, 1–4.
- Panjaitan, J. R. H., & Wibowo, A. (2022). Pengaruh variasi Sumber Nitrogen pada Produksi Selulosa Bakteri dari Limbah Kulit Pisang. *Journal of Chemical Process Engineering*, 7(2), 103–108.
- Park, M. S., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Kim, M. J., Bang, W. Y., & Lim, Y. W. (2019). Cellulosic Nanomaterial Production Via Fermentation by *Komagataeibacter* sp. SFCB22-18 Isolated from Ripened Persimmons. *Journal Microbiol Biotechnol*, 29(4), 617–624.
- Putra, A., Kakugo, A., Furukawa, H., Gong, J. P., & Osada, Y. (2008). Tubular Bacterial Cellulose Gel with Oriented Fibrils on The Curved Surface. *Polymer*, 85–91.
- Raharjo, B., Suprihadi, A., & Agustina, D. K. (2007). Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara In Vitro. *Jurnal Sains & Matematika*, 15(2), 45–54.
- Rahmayetty, Kanani, N., Alamsyah, Toha, M., & Witri, P. S. (2021). *Pemanfaatan Limbah Cair Industri Tepung Aren Sebagai Media Fermentasi dalam Sintesis Selulosa Bakteri (Nata de Arenga)*.
- Ramirez, C. M., Castro, M., Osorio, M., Taborda, M. T., Gomez, B., Zuluanga, R., Gomez, C., Ganan, P., Rojas, O. J., & Castro, C. (2017). Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low pH Resistant Strain *Komagataeibacter* *Medellinensis*. *Materials*, 10(639), 1–13.
- Rangaswamy, B. E., Vanitha, K. P., & Hungund, B. S. (2015). Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. *International Journal of Polymer Science*, 1–8.
- Rebello, A. (2018). Dehydration of Bacterial Cellulose and The Water Content Effects on Its Viscoelastic and Electrochemical Properties. *Science and Technology of Advanced Materials*, 19(1), 203–211.
- Rowell, R. M. (2005). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press.

- Salihu, R., Foong, C. ., Razak, S. ., Kadir, M. R. ., & Yusof, A. (2018). Overview of Inexpensive Production Routes of Bacterial Cellulose and Applications in Biomedical Engineering. *Cellulose Chemistry Technology*, 53, 1–13.
- Sarkono, Moeljopawiro, S., Setiaji, B., & Sembiring, L. (2011). Optimasi Kondisi Fermentasi untuk Produksi Selulosa bakteri oleh Strain SLK-1 dalam Media Dasar Air Kelapa. *Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi*, 490–495.
- Shankar, S., & Jong-Whan, R. (2016). Preparation of Nanocellulose from Microcrystalline Cellulose: The Effect on The Performance and Properties of Agar-based Composite Films. *Carbohydrate Polymers*, 18–26.
- Shimizu, M., Saito, T., & Isogai, A. (2016). Water-resistant and High Oxygen-barrier Nanocellulose Film With Interfibrillar Cross-Linkages Formed Through Multivalent Metal Ions. *Journal of Membrane Science*, 1–7.
- Sijabat, E. K., Avelina, Y. N., & Permatasari, A. (2017). Studi Awal Penggunaan Nanoselulosa Sebagai Bahan Baku Pembuatan Kertas. *Majalah Teknologi Agro Industri*, 9(2), 21–29.
- Silitonga, A. (2022). *Isolasi Bakteri Penghasil Selulosa dari Tanah Gambut Riau, Buah Jeruk dan Buah Anggur : Aplikasi dalam Industri Serat Tekstil*. Universitas Riau.
- Stanislawski, A. (2016). Bacterial Nanocellulose as a Microbiological Derived Nanomaterial. *Advances in Material Science*, 16(4), 45–57.
- Suharjono, Ardyati, T., Zubaidah, E., Munawaroh, & Citra, P. P. (2016). Production Of Bacterial Cellulose from coconut Fruit Water In The Varies Of Sucrose and Urea Concentration. *Seminar Nasional VIII Pendidikan Biologi*, 124–128.
- Thoorens, G., Krier, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Evrard, B. (2014). Microcrystalline Cellulose, a Direct Compression Binder In a Quality by Design Environment: A review. *International Journal of Pharmacy*, 473(1–2), 64–72.
- Trache, D., Hussin, M. H., Chuin, C. T., Sabar, S., Fazita, M. R., Taiwo, O. F., Hassan, T. M., & Haafiz, M. K. (2016). Microcrystalline Cellulose: Isolation, Characterization and Bio-composites Application-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Pt A), 789–804.
- Tyagi, N., & Suresh, S. (2016). Production of Cellulose from Sugarcane Molasses Using *Gluconacetobacter Intermedius* SNT-1: Optimization & Characterization . *Journal of Cleaner Production*, 112, 71–80.
- Villarreal-soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation : A Review. *Journal of*

Food Science, 83(3), 580–588.

- Wijayati, N., Astutiningsih, C., & Mulyati, S. (2016). Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), 24–28.
- Winarno, F. G., Fardiaz, S., & Fardiaz, D. (1980). *Pengantar Teknologi Pangan*. Gramedia.
- Wong, C. A., Fear, R. D., Calhoon, G. H., Eichinger, R., Mayer, D., Amikam, M., Benziman, D. H., Gelfand, J. H., Meade, A. W., Emerick, R., Bruner, A. B., Bassat, & Tal, R. (1990). Genetic Organization of The Cellulose Synthase Operon in *Acetobacter xylinum*. *Genetic*, 8130–8134.
- Wulandari, W. T., Rochliadi, & Marcana, I. (2016). Nanoselulosa Dibuat dengan Hidrolisis Asam Selulosa yang Diisolasi dari Ampas Tebu. *IOP Conf. Seri: Ilmu Dan Teknik Material*, 1–7.
- Yi, T. J., Francis, F., Mutalib, S. A., & Zaini, N. A. M. (2022). Aktiviti Antimikrob Selulosa Bakteria daripada *Komagataeibacter xylinus* menggunakan Minuman manis Komersial Tamat Tempoh sebagai Punca Karbon. *Sains Malaysiana*, 51(8), 2695–2711.
- Zahan, K. A., Pa'e, N., & Muhamad, I. I. (2015). Monitoring the Effect of pH on Bacterial Cellulose Production and *Acrtobacter xylinum* 0416 Growth in Rotary Discs Reactor. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1881–1885.
- Zhou, S., & Ingram, L. (2000). Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5676–5682.
- Zuliat, F. A., Suardi, M., & Djamaan, A. (2020). CNC (Cellulose Nanocrystals) Isolation from Various Agricultureand Industrial Waste Using Hydrolysis Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 15(6), 42–58.