

**IMOBILISASI KULTUR *Acetobacter xylinum* MENGGUNAKAN
PERBEDAAN KONSENTRASI Na-alginat UNTUK PRODUKSI NATA DE
COCO**

(Skripsi)

Oleh

**NAFIATUL FITRIAH
1914231018**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF *Acetobacter xylinum* CULTURES USING DIFFERENCES IN Na-alginate CONCENTRATIONS FOR NATA DE COCO PRODUCTION

By

NAFIATUL FITRIAH

The starter inoculum in liquid form will easily drop during storage, as well as difficult in its management. One way to maintain cell culture is by immobilization techniques. In this study using the entrapment technique. This study aims to determine the characteristics of immobilized cells, apply them to the manufacture of nata de coco, and determine the pore shape and surface of immobilized cells after fermentation. This research uses a descriptive method by presenting research results in the form of tables and narratives, and visual observations. This study used one factor, namely various concentrations of Na-alginate, namely 2%, 3%, 4%, and 5% w/v. Different concentrations of Na-alginate produce different characteristics of immobilized cells. Immobilized cells applied to the manufacture of nata de coco only 3% Na-alginate concentration resulted in a nata fiber layer close to control. Immobilized cells with a Na-alginate concentration of 2% have a cracked, slightly porous surface with a size of 60.37 μm , while a Na-alginate concentration of 5%, have a smooth, multi-pore surface, with a size of 10.55 μm . Different concentrations of Na-alginate affect the characteristics of immobilized cells, Application of immobilized cells with a Na-alginate concentration of 3% produces nata de coco with the characteristics of a fairly thick and stable fiber layer (close to control), Immobilized cells with a Na-alginate concentration of 2% produce pores measuring 60.37 μm , small amounts, and cracked surfaces, while 5% Na-alginate concentration produces pores measuring 10.55 μm , large quantities, and smooth surfaces.

Keywords : Immobilization, *Acetobacter xylinum*, and Nata de coco

ABSTRAK

IMOBILISASI KULTUR *Acetobacter xylinum* MENGGUNAKAN PERBEDAAN KONSENTRASI Na-alginat UNTUK PRODUKSI NATA DE COCO

Oleh

NAFIATUL FITRIAH

Inokulum starter dalam bentuk cair potensinya akan mudah turun selama penyimpanan, serta sulit dalam pengelolaannya. Salah satu cara menjaga kultur sel yaitu dengan teknik imobilisasi. Pada penelitian ini menggunakan teknik penjerab (*entrapment*). Penelitian ini bertujuan mengetahui karakteristik sel imobil, mengaplikasikannya pada pembuatan nata de coco, serta mengetahui bentuk pori dan permukaan sel imobil pasca fermentasi. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan menyajikan hasil penelitian dalam bentuk tabel dan narasi, dan pengamatan secara visual. Penelitian ini menggunakan satu faktor, yaitu berbagai konsentrasi Na-alginat yaitu 2 %, 3 %, 4%, dan 5% w/v. Konsentrasi Na-alginat yang berbeda menghasilkan karakteristik sel imobil yang berbeda pula. Sel imobil yang diaplikasikan pada pembuatan nata de coco hanya konsentrasi Na-alginat 3% menghasilkan lapisan serat nata yang mendekati kontrol. Sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 2% memiliki permukaan yang retak, sedikit pori dengan ukuran 60.37 μm , sedangkan konsentrasi Na-alginat 5%, memiliki permukaan halus, banyak pori, dengan ukuran 10.55 μm . Konsentrasi Na-alginat yang berbeda mempengaruhi karakteristik sel imobil, Aplikasi sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 3% menghasilkan nata de coco dengan karakteristik lapisan serat cukup tebal dan stabil (mendekati kontrol), Sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 2% menghasilkan pori berukuran 60.37 μm , jumlah sedikit, dan permukaan retak, sedangkan konsentrasi Na-alginat 5% menghasilkan pori berukuran 10.55 μm , jumlah banyak, dan permukaan halus.

Kata kunci : Imobilisasi, *Acetobacter xylinum*, dan Nata de coco

**IMOBILISASI KULTUR *Acetobacter xylinum* MENGGUNAKAN
PERBEDAAN KONSENTRASI Na-alginat UNTUK PRODUKSI NATA DE
COCO**

Oleh

Nafiatul Fitriah

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**

Pada

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **IMOBILISASI KULTUR *Acetobacter xylinum*
MENGUNAKAN PERBEDAAN
KONSENTRASI Na-Alginat UNTUK
PRODUKSI NATA DE COCO**

Nama : **Nafiatul Fitriah**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1914231018

Program Studi : **Teknologi Industri Pertanian**

Fakultas : **Pertanian**



Prof.Dr.Dra.Maria Erna Kustyawati, M.Sc.
NIP. 19710930 199512 2 001

Lathifa Indraningtyas, S.TP., M.Sc.
NIP. 19910918 201903 2 023

Mengetahui

2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

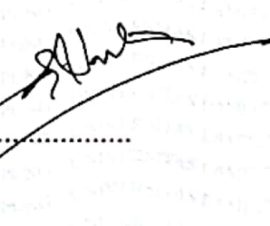
Dr. Erdi Suroso, S.TP., M.T.A.
NIP. 19721006 199803 1 005

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji


Ketua : Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc. 

Sekretaris : Lathifa Indraningtyas, S.TP., M.Sc. 

Penguji bukan pembimbing : Dr. Dewi Sartika, S.TP., M.Si. 

2. Dekan Fakultas Pertanian




Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIDN 19641118 198902 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 15 Desember 2023

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nafiatul Fitriah

NPM : 1914231018

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri yang berdasarkan pada pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukanlah hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 25 Januari 2024

Yang membuat pernyataan,



METERAL
TEMPEL
SERI 14ALX034967075

Nafiatul Fitriah

NPM. 1914231018

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tanjung Tirto 10 Juli 2001, sebagai anak pertama dari Bapak Ali Nurdin dan Ibu Ani Andayani. Penulis memiliki dua adik Perempuan Bernama Safinatun Najah dan Amelia Husna Putri. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di MI Muhammadiyah Bungur pada tahun 2013, pendidikan Sekolah Menengah Pertama di MTS Muhammadiyah 1 Way Bungur tahun 2013, dan Pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Muhammadiyah 1 Purbolinggo tahun 2019. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2019 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) dengan program Bidikmisi.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Januari-Februari 2022 di Desa Braja Caka, Kecamatan Way Jepara, Kabupaten Lampung Timur, Lampung. Pada bulan Juli – Agustus tahun 2022, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT. Sungai Bungur Indo Perkasa, di Kecamatan Way Bungur, Kabupaten Lampung Timur, dengan judul “Mempelajari Proses Produksi Dan Pengendalian Mutu Tapioka Di PT. Sungsi Bungur Indo Perkasa”. Penulis juga melakukan penelitian pada Maret – September 2023 di Laboratorium yang ada di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian dan Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung.

Selama menjadi mahasiswa, penulis mengikuti beberapa organisasi kemahasiswaan yaitu Forum Studi Islam (FOSI FP) selama dua periode. Periode 2019/2020 sebagai anggota bidang Hubungan Masyarakat dan sebagai anggota Kajian Strategis dan Hubungan Luar (KASTRAHULU) pada divisi BSO

IMMPERTI (Ikatan Mahasiswa Muslim Pertanian) periode 2020/2021. Pada tahun yang sama, penulis juga mengikuti organisasi Birohmah selama dua periode. Periode 2019/2020 sebagai anggota bidang MTQ SI dan periode 2020/2021 sebagai anggota bidang Hubungan Masyarakat. Periode 2020/2021. Penulis juga mengikuti kegiatan Bidikmisi Goes To School (BMGTS) pada tahun 2020 sebagai relawan dan tahun 2021 sebagai relawan serta Koordinator Kabupaten Lampung Timur.

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah swt., atas berkat dan rahmat-Nya. Shalawat serta salam penulis hanturkan kepada Nabi Muhammad saw., sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Proses penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, motivasi, serta bimbingan, serta do'a dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A. selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Bapak Ir. Harun Al Rasyid, M.T., selaku Kepala Program Studi Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
4. Ibu Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc., selaku Pembimbing Akademik dan dosen pembimbing utama yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, saran, serta motivasi kepada penulis selama perkuliahan, penelitian, hingga penyelesaian skripsi penulis.
5. Ibu Lathifa Indraningtyas, S.TP., M.Sc selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, saran dan motivasi kepada penulis selama penelitian hingga penyelesaian skripsi penulis.
6. Ibu Dr. Dewi Sartika, S.TP., M.Si. selaku dosen pembahas yang telah memberikan saran, masukan, dan motivasi kepada penulis selama proses penyelesaian skripsi penulis.
7. Bapak dan Ibu dosen pengajar, staf, dan karyawan yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat dan membantu penulis selama menjadi mahasiswa di

8. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
9. Bapak Ali Nurdin dan Ibu Ani Andayani yang sangat berperan penting dalam penyelesaian studi penulis, yang selalu memberikan dukungan moril, finansial, motivasi, kasih sayang dan do'a yang tidak pernah terputus untuk kesuksesan penulis.
10. Adik-adik tercinta Safinatun Najah dan Amelia Husna Putri yang senantiasa menguatkan, menghibur dan menjadi salah satu alasan penulis untuk menjalankan hingga menyelesaikan studi dengan baik agar menjadi contoh bagi adik-adik.
11. Keluarga besar Abdul Charir dan Suratmin yang selalu memberikan dukungan dan do'a yang tidak pernah terputus untuk kesuksesan penulis.
12. Keluarga besar Teknologi Industri Pertanian angkatan 2019, teman-teman, sahabat, dan semua pihak yang telah membantu penulis selama penelitian, serta memberikan dukungan, dan semangat kepada penulis hingga menyelesaikan skripsi ini.
13. Diri sendiri yang telah berjuang dan tetap kuat selama menjalani studi hingga berada pada tahap akhir penyelesaian skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak terlepas dari kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pihak yang memerlukan dan dipergunakan sebaik-baiknya.

Bandar Lampung, 25 Januari 2024

Penulis

Nafiatul Fitriah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Kerangka Pemikiran.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Pengertian Imobilisasi.....	6
2.2 Jenis-jenis Imobilisasi	6
2.3 Teknik Imobilisasi	7
2.4 Kelebihan Imobilisasi	8
2.5. <i>Acetobacter xylinum</i>	9
2.6. Natrium Alginat	11
2.7. Kalsium Klorida (CaCl ₂)	14
2.8 Fermentasi Nata de coco.....	15
III. METODOLOGI PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.3 Metode Penelitian	18
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	18
3.4.1 Pembuatan Kultur Stok <i>Acetobacter xylinum</i>	18
3.4.2 Proses Pembuatan Imobilisasi Kultur Sel <i>Acetobacter xylinum</i>	26
3.4.3 Pembuatan Nata De Coco dengan Sel Imobil dan Starter	
<i>Acetobacter xylinum</i>	27
3.4.4 Pemisahan Lapisan Nata dari Sel Imobil.....	29
3.5 Pengamatan.....	29
3.5.1 Bentuk Fisik dan Warna Sel Imobil Pasca Fermentasi.....	30
3.5.2 Permukaan dan Pori-pori Sel Imobil	30
3.5.3 Lapisan Serat Nata de Coco.....	30

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Karakteristik Sel Imobil dengan Perbedaan Konsentrasi Na-alginat	31
4.2 Jumlah Bakteri Berdasarkan Kekeruhan Menggunakan Standar McF	34
4.3 Aplikasi Sel Imobil Pada Pembuatan Nata de coco	35
4.4 Analisis SEM untuk Mengamati Pori-pori dan Permukaan Sel Imobil	40
V.SIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Simpulan.....	43
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Standar Mc Farland	23
2. Karakteristik sel imobil dengan perbedaan konsentrasi Na-alginat	31
3. Hasil perhitungan bakteri berdasarkan nilai turbiditas menggunakan standar McF dan nilai konversinya	34
4. Hasil fermentasi nata de coco	35
5. Hasil pengamatan dengan SEM pada sel imobil	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	10
2. Struktur alginat.....	12
3. Pembentukan matriks alginat	14
4. Diagram pembuatan kultur agar miring <i>A.xylinum</i>	19
5. Diagram alir pembuatan kultur agar cawan <i>A.xylinum</i>	21
6. Diagram alir pembuatan kultur broth <i>A.xylinum</i>	22
7. Diagram alir pembuatan suspense kultur <i>A.xylinum</i>	24
8. Diagram alir pembuatan larutan Na-alginat.....	25
9. Diagram alir pembuatan larutan CaCl ₂	26
10. Diagram alir proses pembuatan imobilisasi sel <i>A.xylinum</i>	27
11. Diagram alir pembuatan nata de coco	28
12. Diagram alir pemisahan lapisan serat nata dari sel imobil.....	29
13. Penimbangan media NA dan NB	52
14. Pencampuran media NA dan NB	52
15. Pemanasan media	52
16. Sterilsasi media dengan autoclaf	52
17. Stok media agar miring	52
18. Inokulasi isolate murni <i>A.xylinum</i>	52
19. Melapisi penutup sumbat tabung dengan plastik wrap	53
20. Melapisi cawan dengan plastic.....	53
21. Inkubasi pada inkubator selama	53
22. Pertumbuhan <i>A.xylinum</i> pada media agar cawan.....	54
23. Inokulasi kultur <i>A.xylinum</i> dari agar cawan pada media NB	54
24. Pertumbuhan bakteri <i>A.xylinum</i> pada media NB	54
25. Perhitungan jumlah bakteri <i>A.xylinum</i> dengan metode.....	54
26. Sentrifuge media dan kultur bakteri <i>A.xylinum</i>	54
27. Hasil sentrifuge	54
28. Suspensi kultur	55
29. Larutan Na-alginat berbagai konsentrasi	55
30. Pencampuran larutan Na-alginat dengan kultur <i>A.xylinum</i>	55
31. Penetesan ke dalam larutan CaCl ₂	55
32. Sel imobil	55
33. Penyimpanan sel imobil pada larutan pepton.....	55
34. Sel imobil setelah diaplikasikan pada fermentasi nata de coco	56
35. Pelapisan sel imobil	56

36. Proses vacuum untuk menghilangkan kadar air sel imobil.....	56
37. Pengamatan pori dan permukaansel imobil menggunakan mikroskop	56
38. Penyimpanan sel imobil tanpa larutan papton setelah 2 hari	56
39. Penyimpanan sel imobil dalam larutan pepton setelah satu bulan.....	56
40. Penyimpanan sel imobil dalam larutan pepton setelah 3 bulan	57
41. Penyimpanan sel imobil dalam larutan pepton setelah 4 bulan	57

I.PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nata merupakan selulosa yang diperoleh dari hasil aktifitas bakteri *Acetobacter xylinum*. Nata berbentuk padat, berwarna putih, transparan, bertekstur kenyal, menyerupai gel dan terapung pada bagian permukaan cairan. (Hamad *et al.*, 2014). Nata berkembang sebagai suatu pangan populer dikonsumsi untuk diet rendah kalori atau diet tinggi serat (Azhari, 2014). Kandungan air dalam nata dapat membantu memperlancar proses metabolisme tubuh. Serat nata di dalam tubuh, mengikat semua unsur sisa metabolisme yang tidak diserap oleh tubuh, kemudian dibuang melalui anus (Kuncara, 2017).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi terbentuknya nata de coco, salah satunya adalah kualitas kultur bakterinya, yaitu *Acetobacter xylinum* (*A.xylinum*). Starter *A.xylinum* selama pertumbuhannya akan memperbanyak jumlah koloni dan menghasilkan enzim pembentuk nata de coco. Starter juga berguna untuk adaptasi bakteri sebelum proses fermentasi. Keberhasilan nata yang dihasilkan dalam proses fermentasi juga sangat bergantung dengan banyaknya populasi *A. xylinum* yang ada dalam starter. Jumlah populasi *A.xylinum* juga berperan penting dalam fermentasi menghasilkan nata de coco (Hamad *et al.*, 2014).

Pembuatan nata de coco umumnya masih dengan menginokulasi *A.xylinum* secara langsung ke dalam media kultur dari air kelapa. Metode inokulasi langsung selalu menyisakan sedikit starter jika akan digunakan untuk fermentasi selanjutnya. Disamping itu, inokulasi *A.xylinum* secara langsung memiliki kelebihan antara lain proses yang mudah dan biaya murah. Namun demikian, inokulasi starter secara langsung memiliki risiko kultur starter menjadi rentan terhadap kontaminasi.

Penanganan yang tidak tepat, terutama pada saat penyimpanan sebelum digunakan untuk fermentasi berikutnya mudah menyebabkan kontaminasi kultur. Kontaminasi yang terjadi pada proses fermentasi dapat mengakibatkan produksinya menjadi tidak optimal. Dengan demikian, untuk menjaga sel kultur nata de coco perlu diupayakan, salah satunya dengan teknik imobilisasi (Darmawan and Pradipta, 2015).

Imobilisasi sel didefinisikan sebagai metode untuk mengurung atau secara fisik menempatkan mikroba sel dalam ruang tertentu, dimana sel masih memiliki aktivitas katalitik dan dapat digunakan secara terus menerus dan berkali-kali. Keadaan sel yang tidak bergerak ini dapat dalam keadaan tumbuh, istirahat, dan keadaan autolysis (Darmawan and Pradipta, 2015). Teknik imobilisasi sel menyebabkan terjerabnya sel dalam suatu matriks atau membran. Imobilisasi sel bertujuan untuk membuat sel menjadi tidak bergerak atau ruang gerakannya berkurang, sehingga sel menjadi terhambat pertumbuhannya dan substrat yang diberikan hanya digunakan untuk menghasilkan produk (Marlinda *dkk.*, 2019).

Imobilisasi diterapkan untuk melindungi sel dari lingkungan yang tidak menguntungkan dengan cara menjerab sel dalam suatu matriks hidrokoloid. Metode dalam imobilisasi ada tiga, yaitu *cross linking* (ikatan silang), *carrier binding* (adsorpsi), dan *entrapment* (penjerapan) (Mubarokah, 2018). Pada penelitian ini, imobilisasi menggunakan metode *entrapment*, dengan pertimbangan memiliki resiko kegagalan yang rendah dan mudah dilakukan. apabila dibandingkan dengan dua metode lainnya. Selain itu, metode *entrapment* merupakan yang paling banyak dikembangkan untuk imobilisasi sel. Metode ini dilakukan dengan membuat sel mikroorganisme terperangkap di dalam matriks polimer (Rahayu, 2018). Menurut Souza *et al.*, (2014), penjerapan (*entrapment*) merupakan salah satu teknik imobilisasi enzim dengan cara terperangkap enzim dalam matriks polimer yang berukuran mikro. Sedangkan menurut Betha (2009), metode *entrapment* ini didasarkan pada terjadinya inklusi enzim di dalam suatu jaringan atau matriks, yang bertujuan untuk mencegah sel berdifusi ke lingkungan atau medium disekitarnya, akan tetapi enzim tersebut masih dapat berinteraksi dengan substrat.

Imobilisasi dengan metode *entrapment* pada dasarnya membiarkan sel-sel menembus ke dalam matriks berpori hingga mobilitasnya (ruang gerak) terhalang oleh sel lain atau bahan berpori yang dibentuk in situ ke dalam kultur sel. Metode *entrapment* ini didasarkan pada penyertaan sel dalam jaringan kaku untuk mencegah sel menyebar ke media sekitarnya, dengan tetap memungkinkan transfer massa nutrisidan metabolit. Contoh karakteristik dari jenis imobilisasi ini adalah jebakan ke dalam gel polisakarida seperti alginat, k-karagenan, agar, kitosan dan asam poligalakturonat atau matriks polimer lainnya seperti gelatin, kolagen dan polivinil alkohol (Pratiwi *dkk.*, 2021).

Pada penelitian ini, natrium alginat (Na-alginat) sebagai bahan matriks yang menjerab sel (Ratnasari *et al.*, 2014). Alginat dalam bentuk garamnya yaitu natrium alginat, memiliki sifat mampu membentuk gel dengan cara berikatan dengan garam kalsium, salah satunya yaitu kalsium klorida (CaCl_2), yang berperan sebagai kation. Ion Ca^{+2} pada kalsium klorida berfungsi menguatkan struktur gel alginat (Mubarokah, 2018). Berdasarkan penelitian Jobanputra (2011) penggunaan konsentrasi CaCl_2 pada kisaran 0,1 M - 0,5 M mendapatkan perlakuan terbaik pada konsentrasi 0,2 M, dengan aktivitas enzim yang tinggi. Aktivitas enzim menurun dengan meningkatnya konsentrasi CaCl_2 0,4 M dan 0,5 M, karena perubahan pH oleh kandungan garam yang tinggi.

Larutan garam alginat larut dalam air dan membentuk gel dalam larutan menjadi asam oleh adanya ion kalsium dan kation logam kovalen lainnya. Kekuatan gel yang terbentuk dapat diatur, yaitu lunak, elastis, ataupun keras karena dipengaruhi oleh konsentrasi Na-alginat. Konsentrasi Na-alginat yang berbeda akan berpengaruh terhadap kemampuan matriks dalam menahan sel keluar dari beads, sehingga dapat berpengaruh terhadap karakter produk imobil (Ratnasari *et al.*, 2014). Kemampuan Na-alginat tersebut dikarenakan penggantian kation Na^+ yang berasal dari Na-alginat dengan kation Ca^{2+} yang berasal dari CaCl_2 yang terjadi lebih dari 35%, sehingga interaksi yang terjadi antar kation akan menghentikan pergeseran molekul dan akan membentuk struktur gel atau matriks yang stabil (Gayo, 2016). Semakin tinggi konsentrasi alginat dan derajat polimerisasinya (jumlah unit monomer yang ada dalam polimer), maka akan semakin kuat gel

yang akan terbentuk (Putriyana *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Saputra *et al* (2018) Na-alginat dengan konsentrasi di bawah 4% memiliki viskositas yang rendah, sehingga beads yang dihasilkan mudah hancur atau kurang kokoh dan bentuknya kurang seragam. Hal ini mengindikasikan bahwa matriks tidak dapat mempertahankan atau melindungi viabilitas sel imobil selama penyimpanan. Na-alginat dengan konsentrasi lebih dari 8%, memiliki viskositas yang tinggi sehingga menyebabkan kesulitan dalam pembentukan beads (Saputra *et al.*, 2018). Akibatnya, viabilitas sel dalam produk imobil menurun selama penyimpanan.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Mengetahui karakteristik sel imobil meliputi bentuk, ukuran, tekstur, dan warna.
2. Mengaplikasikan sel imobil *A.xylinum* pada pembuatan nata de coco.
3. Mengetahui bentuk pori-pori dan permukaan sel imobil pasca diaplikasikan pada pembuatan nata de coco.

1.3 Kerangka Pemikiran

Nata de coco merupakan salah satu makanan kaya akan serat, yang berasal dari hasil aktifitas bakteri *A.xylinum* pada media, yaitu air kelapa. Pembuatan nata de coco saat ini umumnya masih menggunakan metode menginokulasikan kultur *A.xylinum* secara langsung ke dalam media, dengan menyisakan sedikit starter untuk fermentasi selanjutnya, sehingga memerlukan penambahan starter baru yang berarti menambah biaya produksi. Disamping itu, selama ini inokulum starter tersedia dalam bentuk cair yang dikemas dengan botol dan penutup berupa sumbat kapas ataupun kertas yang diikat. Kultur dalam keadaan cair mudah mengalami kontaminasi, potensinya mudah turun selama penyimpanan, dan sulit dalam pengelolaannya (Dewi, 2009). Keberlanjutan proses produksi produk fermentasi memerlukan starter kultur mikrobial yang tersedia secara terus menerus dalam keadaan siap pakai, dengan potensi yang maksimal yang mudah

dikelola dan dapat disimpan dalam waktu lama dengan aktivitas produksi yang tetap tinggi. Kultur yang disimpan diharapkan dalam keadaan stabil, dalam arti tidak mengalami mutase genetik (Isaac and Jennings, 1995), sehingga kualitas produk terjaga baik. Salah satu cara mendapatkan kultur yang tersedia secara terus menerus dan dapat digunakan berulang yaitu dengan imobilisasi.

Imobilisasi *A.xylinum* dianggap sebagai temuan baru mempertahankan viabilitas sel dalam produksi nata de coco. Imobilisasi sel merupakan suatu metode mengurung atau menjerab sel dalam suatu matriks hidrokoloid yang bertujuan untuk melindungi sel dari lingkungan luar yang tidak menguntungkan, sehingga sel hanya akan fokus menghasilkan produk. Imobilisasi sel dengan teknik menjerab atau entrapment, umumnya menggunakan natrium alginat (Na-alginat), yang biasa digunakan sebagai pengental pada industri makanan. Natrium alginat akan membentuk gel yang kuat bila bereaksi dengan garam kalsium, salah satunya kalsium klorida (CaCl_2). Kekuatan gel yang terbentuk dapat diatur menggunakan konsentrasi natrium alginat yang tepat, untuk menghasilkan gel dengan ketahanan yang kuat. Kekuatan gel dapat bersifat lunak, elastis, ataupun keras. Penggunaan konsentrasi Na-alginat yang berbeda berpengaruh terhadap daya perlindungan matriks dalam menahan sel keluar dari *beads*, serta dapat berpengaruh terhadap karakter produk imobil (bentuk, warna, dan tekstur). Kultur starter *A.xylinum* diharapkan dapat dibuat dengan teknik imobilisasi menghasilkan sel imobil *A.xylinum* dan dapat diaplikasikan untuk membuat nata de coco.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Imobilisasi

Imobilisasi adalah suatu teknik yang secara fisik mengandung atau meletakkan sel-sel mikroba pada suatu daerah tertentu, dimana sel-sel masih mempunyai aktivitas enzimatis yang dapat digunakan secara terus menerus dan berulang pada berbagai permukaan organik. Mikroorganisme dapat distabilkan pada berbagai matriks dengan berbagai mekanisme, termasuk penekanan sel, adsorpsi atau adhesi, jebakan dalam bahan berpori, serta interaksi kovalen dan ionik (Hassanzadeh, *et al.*, 2017). Imobilisasi sel juga dapat dikatakan suatu teknik membungkus sel dalam polimer matriks, sehingga biomassa sel dapat tetap terkonsentrasi untuk menghasilkan aktivitas metabolisme yang tinggi. Ukuran pori-pori matriks yang kecil dapat mendukung sensitivitas sel yang rendah terhadap fluktuasi suhu dan pH, serta kemampuannya untuk menahan toksisitas kimia, memungkinkan difusi toksin menjadi lebih halus (Elakkiya, 2016).

2.2 Jenis-jenis Imobilisasi

Terdapat dua jenis imobilisasi, yaitu imobilisasi aktif dan pasif. Penjebakan (*entrapment*) dan pengikatan (*binding*), umumnya dikenal sebagai imobilisasi aktif yang disebabkan oleh kekuatan fisik atau kimia. Beberapa bahan yang digunakan pada penjebakan fisik yaitu bahan yang berpori (agar, alginat, karagenan, poliakrilamida, kitosan, gelatin, kolagen), saringan logam berpori, poliuretan, silika gel, polistirena, dan selulosa triasetat. Metode penempelan atau pelekatan yang melapisi perkembangan sel pada permukaan media pendukung, umumnya digunakan untuk imobilisasi pasif dengan bentuk biofilm. Kedua media yang dapat digunakan yaitu inert dan fisiologis aktif (Kardena *et al.*, 2020).

2.3 Teknik Imobilisasi

Teknik imobilisasi umumnya dibagi menjadi tiga yakni *carrier binding*, *cross linking* dan *entrapment*, yang mana tergantung jenis interaksi antara enzim dan matriksnya.

1. Entrapment

Imobilisasi *entrapment* merupakan pemerangkapan sel dalam jaringan polimer yang memungkinkan substrat dan produk masuk, tetapi sel tetap dipertahankan. Teknik imobilisasi *entrapment* tidak melibatkan ikatan kimia antara matrik dan protein (enzim), dimana protein berada dalam matrik tiga dimensi yang tidak mungkin terdifusi keluar (Zhao, 2015). Matriks yang paling baik untuk digunakan pada imobilisasi enzim dengan metode ini adalah silika dengan teknik sol-gel. Teknik sol-gel merupakan proses pembentukan senyawa anorganik dalam bentuk tiga dimensi yang berasal dari partikel suspensi koloid dengan diameter 1-10 nm (Rahayu, 2018).

Sol-gel berbasis silika memiliki ruang pengunci atau *interlocking cavasities* yang memberikan media dengan luas permukaan besar sehingga memungkinkan enzim untuk terperangkap. Kelebihan dari teknik sol-gel adalah cara kerja sederhana, gel yang digunakan bersifat tidak toksik, porositas besar untuk berdifusi, lebih stabil terhadap suhu tinggi, serta lama penyimpanan yang panjang. Kekurangan dari teknik *entrapment* ini adalah masa transfer terbatas dan enzim atau sel mudah bocor (Jose, 2013).

2. Cross linking

Imobilisasi *cross linking* merupakan proses imobilisasi enzim yang melibatkan pembentukan ikatan kovalen antara molekul protein, seperti menggunakan *glutaraldehyde*. Teknik ini dapat mendukung bergabungnya enzim untuk membentuk struktur tiga dimensi. Selain itu juga memiliki kestabilan yang tinggi terhadap pH dan temperatur, serta kebocoran yang minimal. Kekurangan dari teknik ini yaitu difusi massa transfer substrat terbatas, serta metode ini mengakibatkan adanya modifikasi kimia pada permukaan protein sehingga dapat kehilangan aktivitas enzim (Zuca *et al.*, 2014).

3. *Carrier binding*

Imobilisasi *carrier binding* (ikatan pembawa), dimana enzim akan terikat dengan *carier*. Umumnya *carier* mengandung residu ion *exchange*. Proses *anionic exchange* cukup cepat, yang mana langkah pembuatan imobilisasi selesai dalam waktu 60 menit, akan tetapi aktivitas enzim sedikit menurun selama prosedur imobilisasi. Proses *carier binding* dapat dengan mudah terbentuk, tetapi interaksi antara enzim dan *carrier* sangat kuat dibandingkan dengan *physical adsorption*. Adanya ikatan tersebut menyebabkan sedikit perubahan konformasi dan sisi aktif enzim. Kekurangan teknik ini yaitu ikatan ini kurang kuat dibandingkan dengan ikatan kovalen dan kebocoran sel dapat terjadi jika substrat tinggi senyawa *carrier* seperti ionik atau adanya variasi pH (Zuca *et al.*, 2014).

Ketiga teknik tersebut juga dapat dikelompokkan menjadi dua, yakni teknik imobilisasi *irreversible* dan *reversible*. Imobilisasi dikatakan irreversible saat enzim yang sudah terimobilisasi dengan matriks tidak dapat terlepas tanpa merusak matriks, maupun adanya aktifitas biologis enzim. Metode yang termasuk ke dalam imobilisasi *irreversible* yaitu *covalent binding*, *entrapment* dan *cross linking*. Imobilisasi *reversible* yaitu saat enzim yang dapat dengan mudah terlepas dari matriksnya. Metode yang termasuk ke dalam imobilisasi *reversible* yaitu *adsorption*, ikatan ion dan ikatan logam (Zhao, 2015).

2.4 Kelebihan Imobilisasi

Imobilisasi sel memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan kultur tersuspensi. Kelebihan yang dimiliki diantaranya dapat menghasilkan konsentrasi sel tinggi, sel dapat digunakan kembali, mengurangi biaya pemisahan sel, serta mengurangi sel yang terbawa pada laju dilusi yang tinggi. Kombinasi konsentrasi sel tinggi dan laju aliran tinggi memungkinkan akan memperoleh produktivitas volumetris yang tinggi, menguntungkan kondisi lingkungan mikro (kontak antar sel, gradien produk nutrisi, gradien pH untuk sel), serta melindungi sel dari kerusakan akibat pergeseran. Selain itu, imobilisasi dapat memungkinkan untuk dilakukannya reaksi enzim beberapa tahap, tidak memerlukan tahap ekstraksi atau pemurnian enzim, dapat dilakukan pemisahan sel dengan mudah serta umur sel

dapat diperpanjang (Kardena *et al.*, 2020). Imobilisasi dapat menghentikan sel bakteri untuk keluar dari matriks dan berinteraksi dengan lingkungan yang tidak bersahabat, sehingga dapat membuat sel dalam bioreaktor lebih stabil daripada dalam kondisi bebas. (Khalid *et al.*, 2018). Sel-sel yang tidak bergerak juga dapat mengurangi masalah penyapuan sel pada tingkat tertentu pengenceran tinggi dan memberikan kondisi lingkungan mikro termasuk: kontak antar sel, gradien produk nutrisi, gradien pH yang lebih menguntungkan. (Kardena *et al.*, 2020). Keuntungan imobilisasi lainnya yakni mampu mempertahankan konsentrasi biomassa yang tinggi dalam suatu perangkat polimer, sehingga aktifitas metabolisme juga akan meningkat dan mampu bertahan terhadap perubahan temperatur, pH, tekanan fisik. Selain itu, sel juga mampu bertahan terhadap bahan kimia yang didukung dengan kecilnya ukuran pori-pori matrik sehingga difusi toksin menjadi sedikit (Elakkiya, 2016).

2.5. *Acetobacter xylinum*

Acetobacter xylinum (*A.xylinum*) merupakan bakteri gram negatif yang mampu mensintesis selulosa sebagai bagian dari metabolisme glukosa. Selulosa merupakan polimer alami yang jumlahnya melimpah, serta merupakan bagian penting sebagai penyusun dinding sel *A.xylinum* (Yohana, 2021). Dinamakan bakteri gram negatif karena mengandung substansi lipid yang tinggi dan memiliki dinding sel tipis, lebih rentan pada antibiotik, penghambatan warna basa kurang dihambat, pertumbuhan nutriennya relatif sederhana, dan tahan terhadap perlakuan fisik. *A.xylinum* dapat tumbuh pada pH 3,5 – 7,5, namun akan tumbuh optimal bila pH nya 4,3, sedangkan suhu ideal bagi pertumbuhan bakteri *A.xylinum* pada suhu 25°- 30°C (Azhari, 2014). Bakteri *A.xylinum* merupakan bakteri yang menguntungkan bagi manusia dan tidak bersifat patogen (berbahaya) (Puji, 2014). Menurut Nita (2011), klasifikasi *A.xylinum* yaitu sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Class : *Alphaproteobacteria*

Ordo : *Rhodospirillales*

Family : *Acetobacteraceae*

Genus : *Acetobacter*

Spesies : *Acetobacter xylinum*

Genus *Acetobacter* termasuk ke dalam kelompok bakteri asam asetat yang memiliki sifat non motil atau spesies bakteri yang tidak memiliki kemampuan dan struktur yang memungkinkan mereka untuk bergerak sendiri, dengan kekuatannya sendiri melalui lingkungannya. Bakteri yang tergolong kedalam genus *Acetobacter* dapat memproduksi asam asetat dan etanol. *A.xylinum* berbentuk batang dengan panjang 0,8 - 1,6 μ dan lebar 0,5 μ , bersifat aerob, tidak mempunyai flagella, tidak berpigmen, tidak membentuk spora dan bersifat kemotropik. Kemotropik adalah energi yang digunakan dalam metabolisme zat dalam sel bakteri, energi ini didapat dari hasil penambahan senyawa kimia (Fardiaz, 1992). Berbeda dengan jenis bakteri asam asetat lainnya, *A.xylinum* bila ditumbuhkan dalam media yang mengandung gula mampu memecah komponen gula dan membentuk suatu polisakarida yang dikenal dengan *extracellular cellulose*, sehingga bakteri ini sering disebut sebagaibakteri polisakarida (Sultanto, 2002). Bentuk bakteri *A.xylinum* dapat dilihat sebagai berikut :



Gambar 1. Bakteri *Acetobacter xylinum*

Sumber : muhtaufiqmunawar.blogspot.com

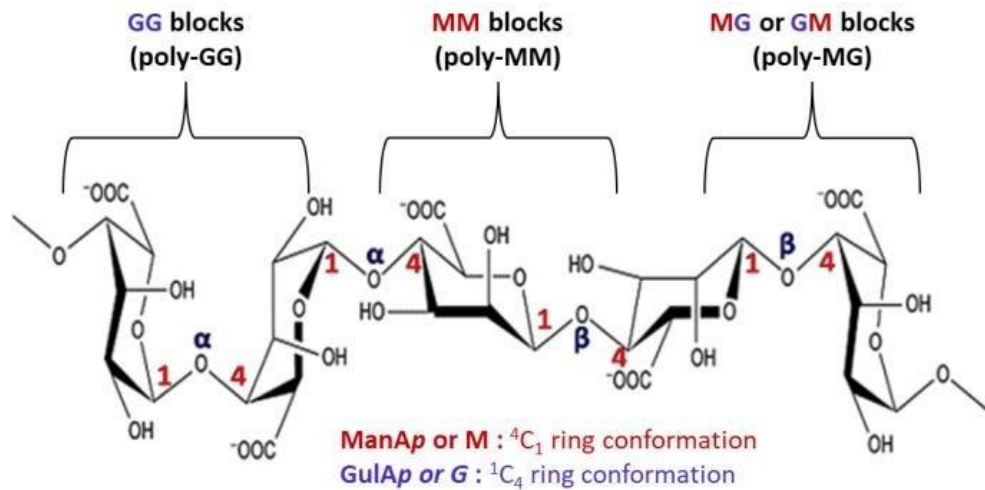
A.xylinum dalam medium cair mampu membentuk suatu lapisan dan dapat mencapai ketebalan beberapa centimeter, dan lapisan tersebut biasa disebut dengan nata (Yohana, 2021). Nutrisi yang cukup akan mempengaruhi kadar serat yang dihasilkan. Hal tersebut dikarenakan selama proses fermentasi, *A.xylinum* terus menerus menggunakan nutrisi untuk membentuk produk metabolisme. Penggunaan starter bakteri bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri. (Kuncara, 2017).

Starter merupakan populasi mikroba dalam jumlah yang mencukupi dan dalam kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi. Starter atau biasa disebut biang dalam pembuatan nata adalah *A.xylinum*. Penggunaan starter bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri *A.xylinum* yang akan menghasilkan enzim pembentuk nata. Starter nata dapat diisolasi dari air kelapa atau buah-buahan yang telah masak. Hasil isolasi tersebut selanjutnya akan dikembangkan sebagai starter nata siap pakai. Isolat yang dihasilkan sebagian akan disimpan sebagai kultur stok, atau sebagai bahan dalam penelitian pengembangan kemampuan bertumbuh *A.xylinum* (Kuncara, 2017).

2.6. Natrium Alginat

Natrium alginat merupakan polisakarida alami yang diekstraksi dari alga coklat dari kelompok *Phaeophyceae*. Alginat yang telah dimurnikan, yaitu natrium alginat (Na-alginat) terdiri dari (1,4) asam β -D-mannuronic (M) dan α -1-guluronic (G) yang terikat, yang keduanya dalam konformasi piranosik, tersusun dalam blok homogen (MM atau GG) dan heterogen (MG atau GM), sehingga menyebabkan keragaman besar struktur, berat molekul, dan sifat fisikokimia (Khajouei *et al.*, 2022), seperti pembentukan gel terhadap ion-ion logam yang relatif kaku atau fleksibel (Draget, 2005). Komponen dinding sel rumput laut terdiri dari alginat dan fucosidan yang kaya akan polisakarida anion, yakni ion bermuatan negatif, dan sebagian besar bercampur dengan garam (sodium, potasium, calcium, magnesium), tidak toksik, *biocompatible* dan lebih hidrofilik. Kekokohan sel imobil selain dipengaruhi oleh konsentrasi Na-alginat juga dipengaruhi oleh penggunaan jenis kation. (Mubarokah, 2018). Penelitian ini

menggunakan natrium alginat (Na-alginat) sebagai katalis dan kalsium klorida (CaCl_2) sebagai kation, sehingga disebut sebagai imobilisasi Ca-alginat.



Gambar 2. Struktur alginat
Sumber : Khajouei *et al.*, (2022)

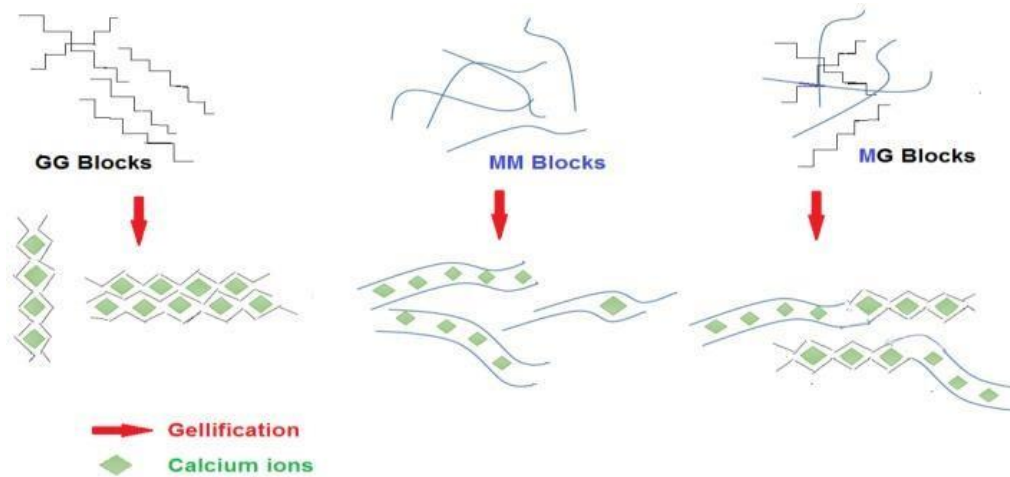
Natrium alginat (Na-alginat) bersifat tidak berbau, berbentuk bubuk putih hingga kuning kecoklatan, tidak berasa, dan dapat membentuk koloid dengan konsentrasi alginat 1%. Na-alginat memiliki pH 5 - 7,5 serta tidak memiliki titik didih dan titik cair namun pada suhu $>200^\circ\text{C}$, dan natrium alginat akan otomatis terbakar. Sifat kelarutan natrium alginat tidak larut pada kondisi asam namun larut dalam kondisi basa (Mubarokah, 2018).

Alginat juga merupakan salah satu jenis hidrokoloid, yaitu suatu sistem koloid oleh polimer organik di dalam air. Alginat dapat membentuk gel yang stabil terhadap panas, yang mana dapat disimpan pada suhu kamar (Herawati, 2018). Pemanfaatan alginat didasarkan pada tiga sifat utamanya. Sifat alginat yang pertama yaitu kemampuannya dalam menaikkan viskositas larutan apabila alginat dilarutkan dalam air. Sifat kedua yaitu mampu membentuk gel, dimana gel yang terbentuk berasal dari larutan natrium alginat yang ditambahkan garam Ca (Cahyono *et al.*, 2021).

Gel yang terbentuk berasal dari penambahan kation seperti kalsium, yang mana campuran sel dan Na-alginat diteteskan ke dalam larutan yang mengandung multivalent kation, dan seketika akan terjadi pembentukan beads oleh ionotropic (kontaksi antar molekul) gelatinisasi. Pembentukan gel oleh jenis kation merupakan hal yang penting, karena afinitas (kecenderungan membentuk ikatan kimia dengan senyawa lain) alginat terhadap alkalin mengalami peningkatan secara berurutan $Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$ dalam kesetimbangan *ion-exchange* divalent. Divalent kation (X^{+2}) hampir tidak memiliki selektifitas dengan polymannurote (blok M), sementara dengan polyguluronate (blok G) cenderung memiliki selektifitas mengikat (Mubarokah, 2018).

Reaksi kimia yang terjadi pada proses pembentukan gel tersebut, Ca akan menggantikan posisi natrium dari alginat dan mengikat molekul alginat yang panjang. Proses ini tidak memerlukan panas dan gel yang terbentuk tidak akan meleleh jika dipanaskan. Berbeda dengan gel agar yang memerlukan pemanasan untuk pembentukan gelnya, sehingga air harus dipanaskan hingga suhu $80^{\circ}C$ untuk membentuk *swelling* atau gelatinisasi agar, dan gel akan terbentuk pada suhu di bawah $40^{\circ}C$. Sifat ketiga dari alginat yaitu mampu untuk membentuk film dari natrium atau kalsium alginat dan fiber dari kalsium alginat (Cahyono et al., 2021).

Matriks alginat pada pembuatan immobilisasi sel dapat terbentuk karena terjadinya reaksi *crosslinking* antar rantai polimer dengan bentuk struktur tiga dimensi. Struktur tiga dimensi tersebut biasa disebut dengan “*egg box*” karena adanya interaksi antar multivalent kation (Ca^{2+}) dari kalsium klorida dengan rantai karbon guluronate (blok G) dari Na-alginat. Rantai blok G akan terlipat dan bertumpuk di bawah interaksi ikatan, sehingga transformasi struktur rantai alginat yang berdekatan yang tidak beraturan menjadi terstruktur seperti pita. Interaksi yang terjadi menyebabkan fleksibilitas dari molekul alginat meningkat dengan urutan blok $MG < MM < GG$, sehingga jika dalam alginat memiliki banyak blok G maka bentuk struktur matrik akan lebih kokoh, tetapi struktur matrik akan lebih elastis jika memiliki banyak blok M (Wijffels, 1996).



Gambar 3. Pembentukan matriks alginat
Sumber : Khajouei *et al.*, (2022)

2.7. Kalsium Klorida (CaCl_2)

Kalsium klorida memiliki sifat mudah larut dengan air dingin, air panas, aseton, alkohol dan juga asam asetat. Titik didih dari kalsium klorida 1670°C , titik lebur 772°C dan memiliki toksisitas yang rendah, yaitu LD50 1000 mg/kg (Manage Material Safety Data Sheets, 2015). Selain itu, kalsium klorida memiliki pH 4,5-9,2 (5% w/v), sangat mudah larut dalam air dan etanol 95%, tetapi sulit larut dalam dietil eter, serta dapat berfungsi sebagai antimikroba, agen terapeutik dan juga agen yang dapat menyerap air. Kalsium klorida biasa diaplikasikan pada bidang farmasi, yaitu sebagai pengawet antimikroba, desikan, dan astringent pada pembuatan lotion mata (Gayo, 2016).

Kalsium klorida dalam bentuk murninya akan memiliki sifat beracun jika dikonsumsi dan diberikan secara intravena, intramuscular, intraperitoneal, dan rute subkutan. Secara kimiawi, kalsium klorida merupakan zat yang bersifat stabil, tetapi perlu dilindungi dari kelembaban, sehingga dalam penyimpanannya memerlukan tempat yang kering dan wadah yang kedap udara. Kalsium klorida juga tidak kompatibel dengan larutan karbonat, fosfat, sulfat, dan oksalat (Gayo, 2016). Ion Ca^{2+} yang terkandung pada kalsium klorida dalam proses pembuatan imobilisasi berfungsi menguatkan struktur gel alginat, dengan konsentrasi larutan

kation yang berbeda. Hal ini akan memiliki efek yang signifikan pada kestabilan dan ukuran pori-pori pada *beads* gel imobilisasi (Mubarokah, 2018).

2.8 Fermentasi Nata de coco

Fermentasi merupakan suatu cara untuk mengubah substrat menjadi produk tertentu yang diinginkan dengan menggunakan bantuan mikroba. Produk-produk tersebut biasanya dimanfaatkan sebagai minuman atau makanan. Fermentasi merupakan cara yang telah dikenal dan digunakan sejak lama sejak jaman kuno (Azhari, 2014). Bakteri *A. xylinum* akan beradaptasi dengan lingkungan (media) selama 3 hari. Tumbuhnya bakteri *A. xylinum* dapat dilihat dari keruhnya media cair setelah difermentasi selama 24 jam pada suhu kamar. Lapisan tipis yang tembus cahaya akan mulai terbentuk di permukaan media dan cairan di bawahnya menjadi semakin jernih setelah difermentasi selama 36 - 48 jam (Kuncara, 2017).

Secara fisik, bakteri *A. xylinum* mampu mengoksidasi glukosa menjadi rantai polimer yang panjang yang disebut dengan polisakarida atau selulosa berupa serat-serat putih, yang terbentuk secara bertahap dari lapisan tipis pada awal fermentasi. Lapisan tersebut mencapai ketebalan sekitar 12 mm pada akhir fermentasi, kemudian disebut sebagai nata yang merupakan metabolit sekunder. Selain metabolit sekunder, *A. xylinum* juga menghasilkan metabolit primer berupa asam asetat, air, dan energi yang digunakan kembali dalam siklus metabolismenya. Selama proses fermentasi akan terjadi penurunan pH dari 4 menjadi 3. Derajat keasaman (pH) medium yang tinggi merupakan syarat tumbuh bagi *A. xylinum*. (Kuncara, 2017).

Media yang asam sampai pada kondisi tertentu akan menyebabkan reproduksi dan metabolisme sel menjadi lebih baik, sehingga akan menghasilkan produk yang lebih banyak. Penurunan pH disebabkan karena terurainya gula menjadi etanol oleh *A. xylinum*, yang kemudian berubah menjadi asam asetat. Bakteri *A. xylinum* pada puncak pertumbuhannya akan mengeluarkan enzim ekstraseluler yang mampu menyusun satuan gula (glukosa) menjadi senyawa selulosa, sehingga membentuk matriks menyerupai gel yang disebut dengan nata. Lama fermentasi

yang digunakan dalam pembuatan nata pada umumnya yaitu 1-2 minggu. Minggu ke-2 dari waktu fermentasi merupakan waktu maksimal dalam produksi nata. (Kuncara,2017).

Proses pembentukan selulosa oleh *A. xylinum* terdiri dari empat tahap reaksi. Tahap pertama adalah hidrolisis sukrosa yang menghasilkan fruktosa dan glukosa oleh enzim sukrase, yaitu sejenis protein yang berperan sebagai katalis. Tahap kedua yaitu adanya reaksi perubahan intramolekuler α -D-glukosa menjadi β -D-glukosa dengan bantuan enzim isomerase. Proses ini karena glukosa yang berperan dalam pembentukan selulosa adalah glukosa dalam bentuk β . Tahap ketiga yaitu terjadinya reaksi intermolekul glukosa melalui ikatan 1,4 B-glikosida. Tahap yang terakhir adalah pembentukan selulosa dengan unit ulangnya, yaitu selobiosa. (Kuncara,2017).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – September 2023, di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada imobilisasi sel yaitu jarum suntik (syringe) 20 ml, timbangan analitik, gelas beker, batang pengaduk, tabung reaksi, saringan, penggaris, SEM (Scanning Electron Microscope), densitometer McFarland DEN-1B, dan wadah cup plastic, dan refrigerator. Peralatan yang digunakan pada pembuatan kultur kerja dan suspensi kultur yaitu jarum ose, bunsen, vortex, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, hot plate, autoclaf, erlenmayer, inkubator, cawan petri, laminar air flow, dan sentrifuge. Alat yang digunakan pada pembuatan nata de coco yaitu loyang plastik, pisau, pH meter, kompor, panci, pengaduk, saringan, kertas, dan karet gelang.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu starter bakteri *Acetobacter xylinum*, Na- alginat, kalsium klorida (CaCl_2), larutan pepton, larutan buffer fosfat, air kelapa muda, asam cuka, ZA (*Zwavelzur amoniak*) food grade, gula pasir, aquades, media NA (Nutrient Agar) (merek Merck) dan media NB (Nutrient Broth) (merek Merck).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan yaitu menggunakan metode deskriptif dengan menyajikan hasil pengamatan dalam bentuk tabel dan narasi, yang kemudian dilakukan analisis secara deskriptif dan pengamatan secara visual. Penelitian ini hanya menggunakan satu faktor, yaitu berbagai konsentrasi Na-alginat yang digunakan dalam pembuatan imobilisasi sel *A.xylinum*. Faktor tersebut terdiri dari 4 konsentrasi Na-alginat yang berbeda, yaitu 2 %, 3 % , 4% dan 5% w/v.

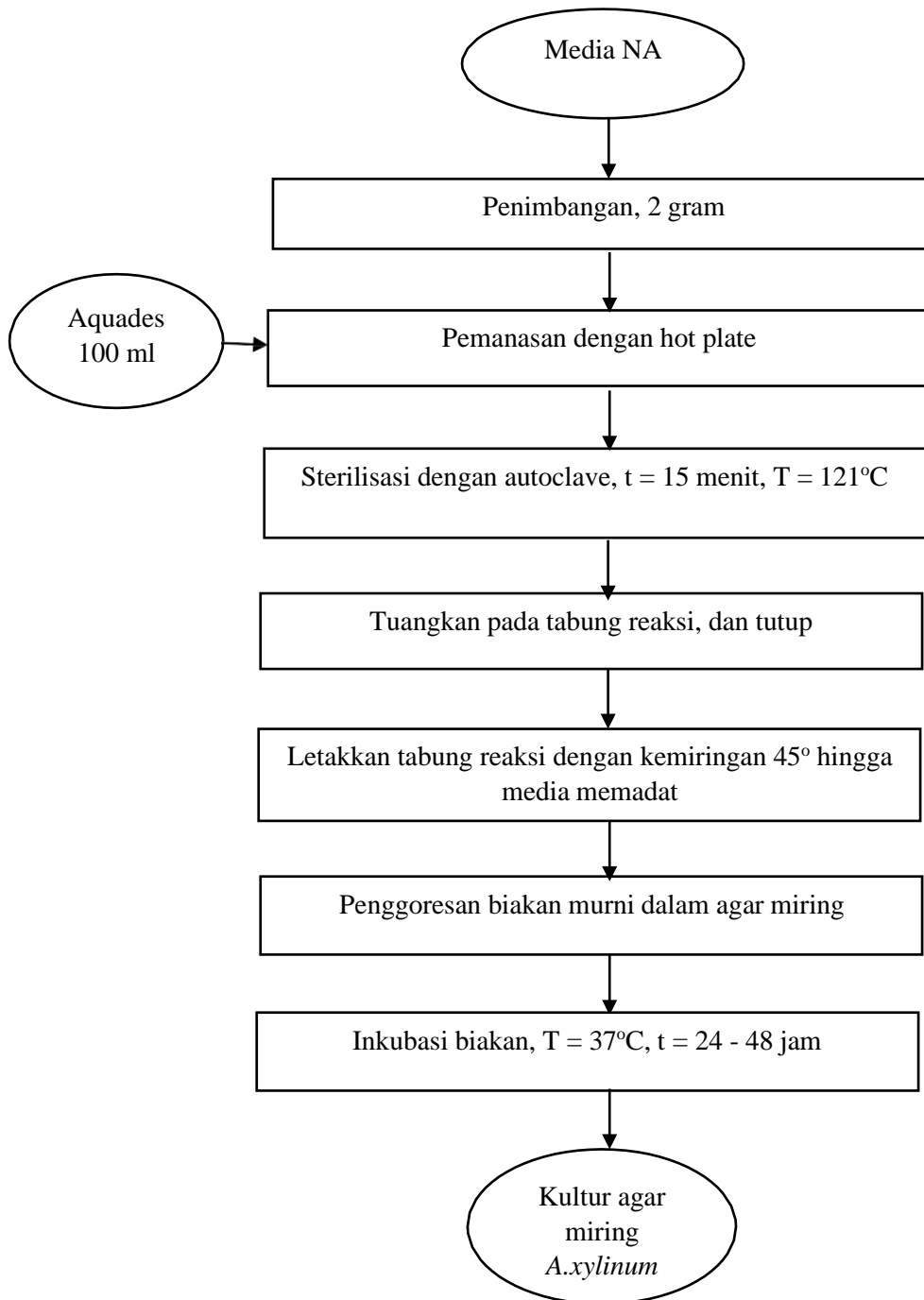
Pelaksanaan penelitian diawali dengan pembuatan kultur kerja, yang bertujuan untuk memperbanyak kultur, sehingga dapat dijadikan sebagai kultur stok. Selanjutnya yaitu melakukan imobilisasi sel, yang kemudian akan diaplikasikan pada pembuatan nata de coco. Sel imobil kemudian diuji menggunakan mikroskop SEM untuk dilihat pori-pori dan juga permukaannya.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan Kultur Stok *Acetobacter xylinum*

a.) Pembuatan Kultur Agar Miring *Acetobacter xylinum*

Pembuatan kultur mobil agar miring diawali dengan menyiapkan nutrient agar (NA) sebanyak 100 ml. Selanjutnya nutrient agar ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmayer, lalu tambahkan aquades sebanyak 100 ml. Kemudian dipanaskan dengan hot plate hingga nutrient agar larut. Selanjutnya media di sterilisasi menggunakan autoclaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media NA yang telah steril dituangkan ke dalam 10 tabung reaksi, dengan isi masing-masing tabung sebanyak 10 ml, dan ditutup. Tabung reaksi yang berisi agar NA steril tersebut dan diletakkan dengan posisi miring dan biarkan hingga memadat. Setelah memadat, diambil satu ose biakan murni *A.xylinum* dan digoreskan pada agar miring dengan aseptis. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Proses pembuatan kultur agar miring *A.xylinum* dapat dilihat pada Gambar 4.

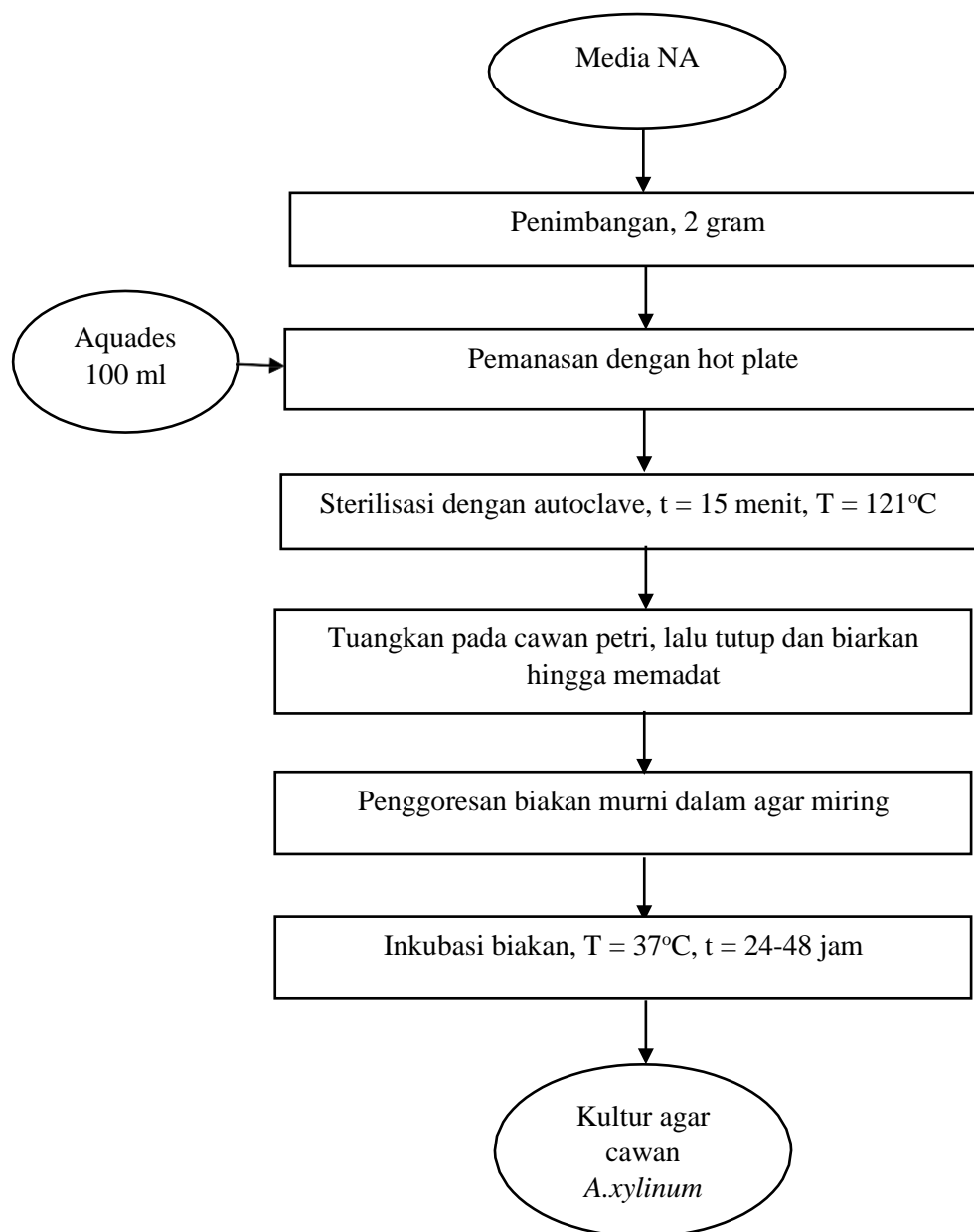


Gambar 4. Diagram pembuatan kultur agar miring *A.xylinum*
Sumber : Sujaya (2017)

b.) Pembuatan Kultur *Acetobacter xylinum* Pada Agar Cawan

Proses pembuatan kultur pada cawan tidak jauh berbeda dari pembuatan kultur agar miring, hanya saja menggunakan cawan petri sebagai wadahnya. Kultur *A.xylinum* diletakkan pada cawan karena inokulasi pada agar miring tidak tumbuh dengan baik. Kondisi tersebut dikarenakan bakteri *A.xylinum* merupakan bakteri yang bersifat aerob atau yang karakteristik bakteri *A.xylinum* yang bersifat aerobik atau membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya, sehingga dalam perlakuannya memerlukan wadah dengan penutup yang berongga. Pembuatan kultur diawali dengan menyiapkan nutrient agar (NA) sebanyak 100 ml.

Selanjutnya nutrient agar ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmayer, lalu tambahkan aquades sebanyak 100 ml. Kemudian dipanaskan dengan hot plate hingga nutrient agar larut. Kemudian larutan NA disterilisasi menggunakan autoclaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Setelah media dingin, media dituangkan pada 4 cawan petri, lalu ditutup dan biarkan hingga memadat. Setelah memadat, diambil satu ose biakan murni *A.xylinum* dan digoreskan pada agar miring dengan aseptis. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Peremajaan kultur stok dilakukan maksimal satu bulan sekali dengan proses yang sama. Proses pembuatan kultur pada cawan petri *A.xylinum* dapat dilihat pada Gambar 5.

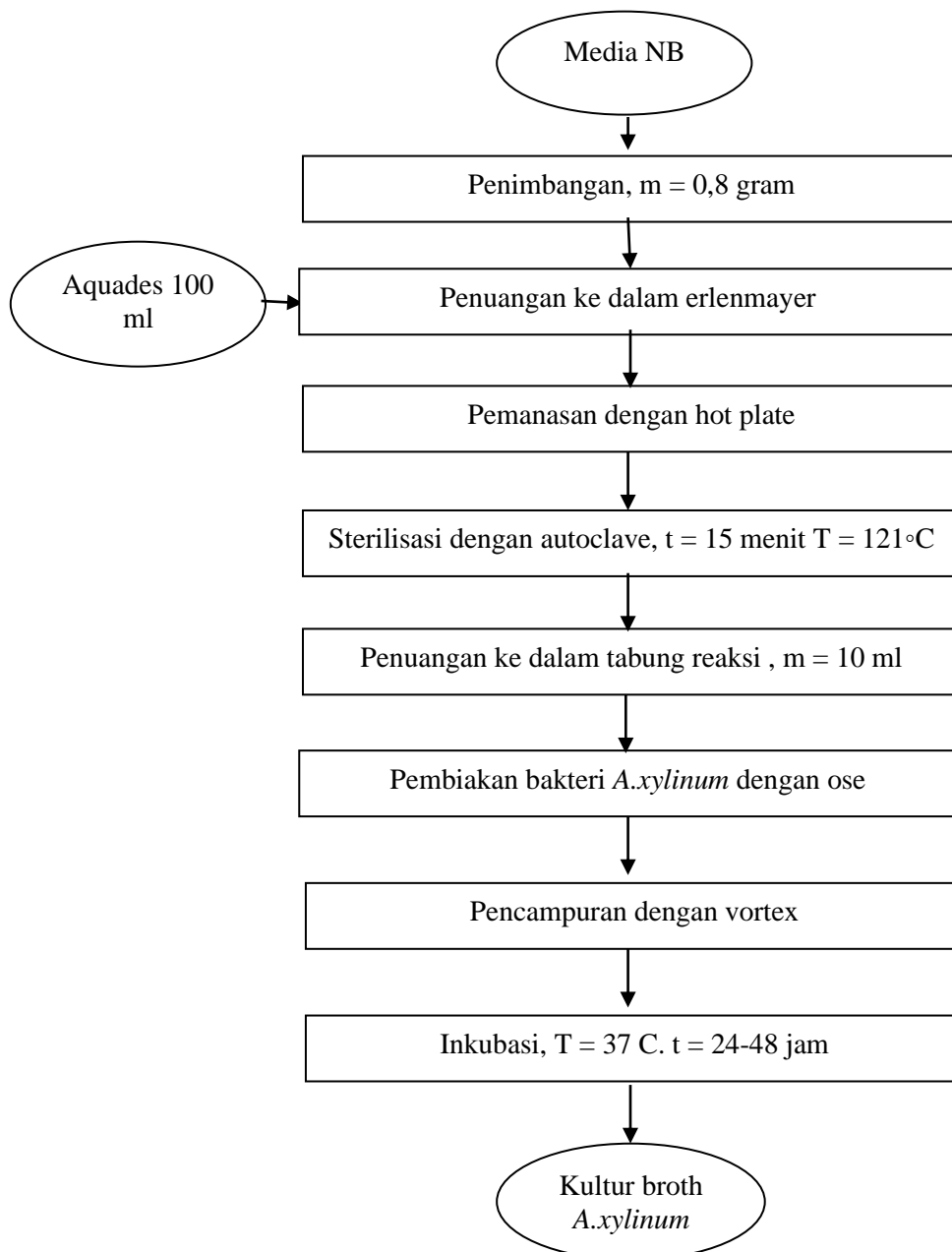


Gambar 5. Diagram alir pembuatan kultur agar cawan *A.xylinum*
 Sumber : Sujaya (2017) dimodifikasi

c.) Pembuatan Kultur Broth *Acetobacter xylinum*

Pembuatan kultur broth (cair) diawali dengan menyiapkan nutrient broth (NB) sebanyak 100 ml. Selanjutnya nutrient broth ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmayer, lalu tambahkan aquades sebanyak 100 ml. Kemudian dipanaskan dengan hot plate hingga nutrient broth larut. Kemudian media di sterilisasi menggunakan autoclaf selama 15 menit dengan suhu 121°C.

Selanjutnya media dituangkan pada 10 tabung reaksi dengan masing-masing tabung berisi 10 ml, dan ditutup menggunakan sumbat kapas. Tabung reaksi yang berisi media NB steril tersebut dan diletakkan pada rak tabung reaksi dan biarkan hingga dingin. Setelah dingin, diambil satu ose biakan murni *A.xylinum* dari agar cawan dan dimasukkan pada media NB dengan aseptis. Selanjutnya media NB berisi kultur dicampurkan menggunakan vortex. Setelah itu, biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam, hingga media terlihat keruh. Proses pembuatan kultur broth *A.xylinum* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir pembuatan kultur broth *A.xylinum*
 Sumber : Sujaya (2017) dimodifikasi

d.) Perhitungan Jumlah Bakteri *Acetobacter xylinum*

Perhitungan bakteri merupakan suatu cara yang digunakan untuk menghitung dan mengetahui jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada suatu media pembiakan.

Perhitungan bakteri dapat dilakukan melalui metode turbidity (kekeruhan), perhitungan sel secara langsung (TPC), dan perhitungan secara tidak langsung. Pada penelitian ini perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan cara turbidimetri atau melihat kekeruhan yang dibandingkan dengan standar Mc Farland (McF).

Kekeruhan tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Standar kekeruhan dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu persatu, sehingga lebih efisien waktu dan tenaga. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan membandingkan turbiditas (kekeruhan) kultur bakteri dengan standar McF 0,5-10, yang terdapat pada tabel standar McF, sehingga dapat dilihat turbiditas kultur bakteri mana yang sesuai dengan tabel. Tabel standar McF dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Standar Mc Farland

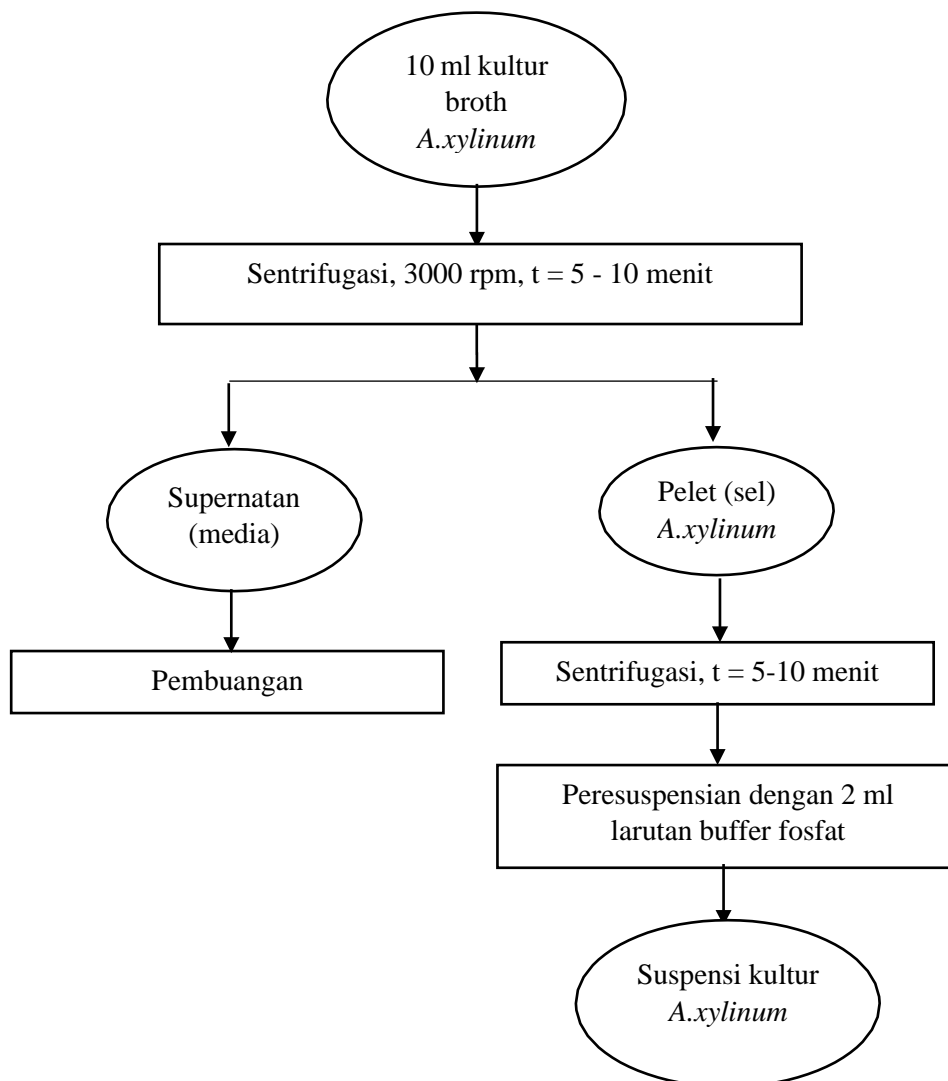
Standart Mc Farland	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	Jumlah Bakteri (CFU/ml)
0,5	0,05	9,95	1,5 x 10 ⁸
1,0	0,10	9,90	3,0 x 10 ⁸
2,0	0,20	9,80	6,0 x 10 ⁸
3,0	0,3	9,7	9,0 x 10 ⁸
4,0	0,4	9,6	1,2 x 10 ⁹
5,0	0,5	9,5	1,5 x 10 ⁹
6,0	0,6	9,4	1,8 x 10 ⁹
7,0	0,7	9,3	2,1 x 10 ⁹
8,0	0,8	9,2	2,4 x 10 ⁹
9,0	0,9	9,1	2,7 x 10 ⁹
10,0	1,0	9,0	3,0 x 10 ⁹

(Whitman and Macnair, 2004)

Keterangan : Misalnya, untuk membuat larutan standar McF0,5 memerlukan 0,05 ml larutan BaCl₂ 1% dan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1%.

e.) Pembuatan Suspensi Kultur *Acetobacter xylinum*

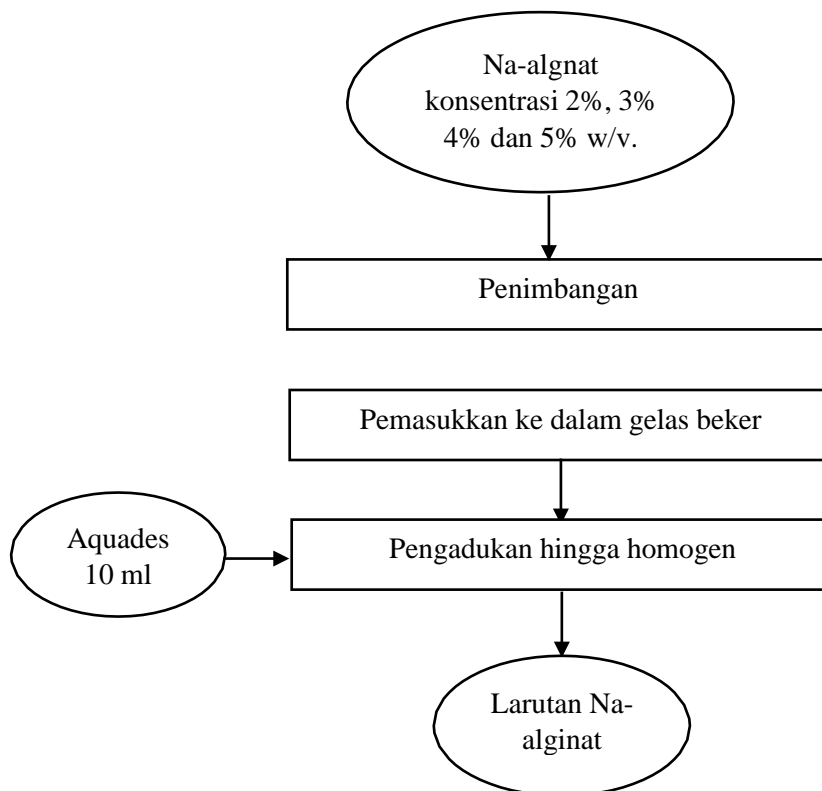
Pembuatan suspensi kultur diawali dengan memasukkan kultur broth *A.xylinum* yang berumur 24 – 48 jam ke dalam tabung sentrifuge. Kemudian kultur disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 - 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disentrifuge kembali. Selanjutnya diresuspensi dengan 2 ml buffer fosfat sehingga diperoleh suspensi kultur. Pembuatan suspensi kultur bakteri *A.xylinum* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir pembuatan suspensi kultur *A.xylinum*
Sumber : Ifadah dkk. (2016)

f.) Pembuatan Larutan Na-alginat

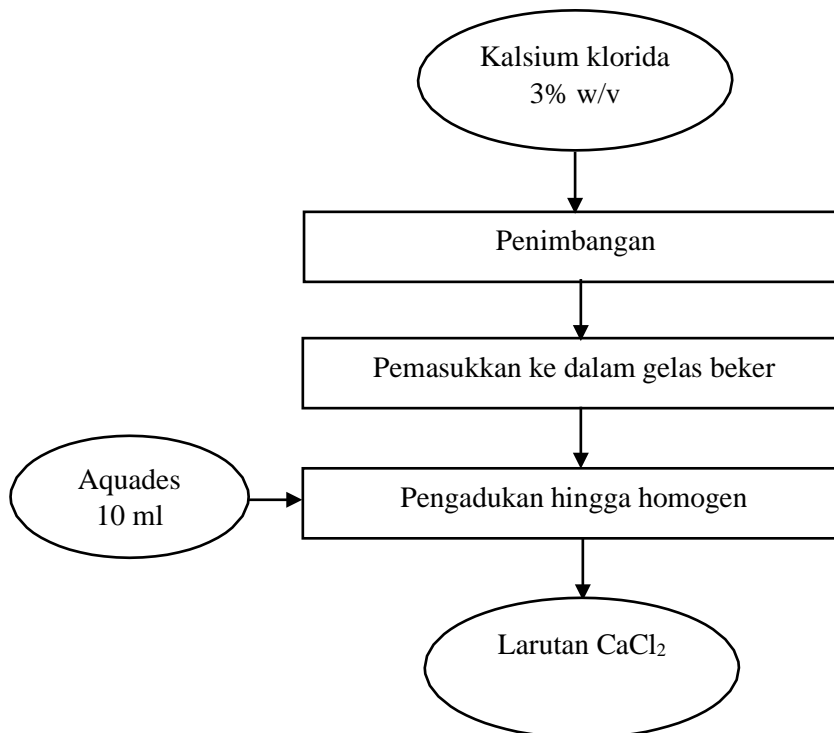
Proses pembuatan larutan na-alginat diawali dengan menimbang Na-alginat sesuai dengan konsentrasi, yaitu 2%, 3%, 4%, dan 5% w/v. Selanjutnya Na-alginat dimasukkan ke dalam gelas beker. Kemudian aquades dimasukkan sebanyak 10 ml ke dalam gelas beker berisi Na-alginat, lalu diaduk hingga homogen. Proses pembuatan larutan Na-alginat dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir pembuatan larutan Na-alginat
Sumber : Mubarokah, (2018)

g.) Pembuatan Larutan Kalsium Klorida (CaCl₂)

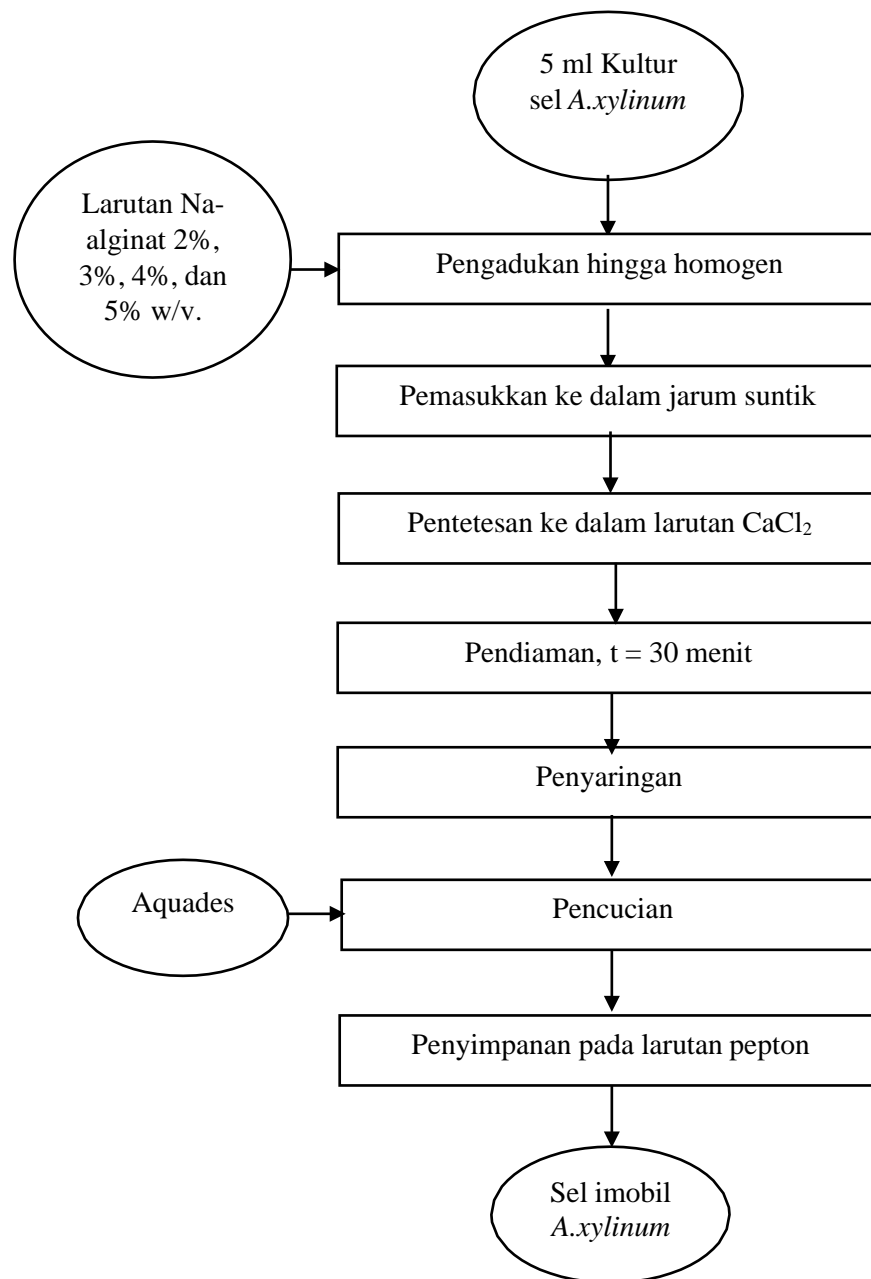
Proses pembuatan larutan kalsium klorida diawali dengan menimbang kalsium klorida sesuai dengan konsentrasi, yaitu 3% w/v. Selanjutnya kalsium klorida dimasukkan ke dalam gelas beker. Kemudian aquades dimasukkan sebanyak 10 ml ke dalam gelas beker berisi kalsium klorida, lalu diaduk hingga homogen. Proses pembuatan larutan kalsium klorida dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir pembuatan larutan CaCl_2
Sumber : Mubarokah (2018)

3.4.2 Proses Pembuatan Imobilisasi Kultur Sel *Acetobacter xylinum*

Proses imobilisasi kultur sel *A.xylinum* diawali dengan mencampur kultur sel sebanyak 5 ml dengan larutan Na-alginat sesuai dengan konsentrasi, yaitu 2%, 3%, 4%, dan 5% w/v, lalu diaduk hingga homogen. Selanjutnya campuran kultur sel dengan Na-alginat dimasukkan ke dalam jarum suntik, dan diteteskan ke dalam larutan CaCl_2 . Kemudian *beads* (bulatan sel imobil) didiamkan selama 30 menit agar bentuknya tidak hancur. Selanjutnya *beads* disaring dan dicuci dengan aquades. Kemudian sel imobil disimpan dalam larutan pepton. Proses imobilisasi kultur sel *A.xylinum* dapat dilihat pada Gambar 10.

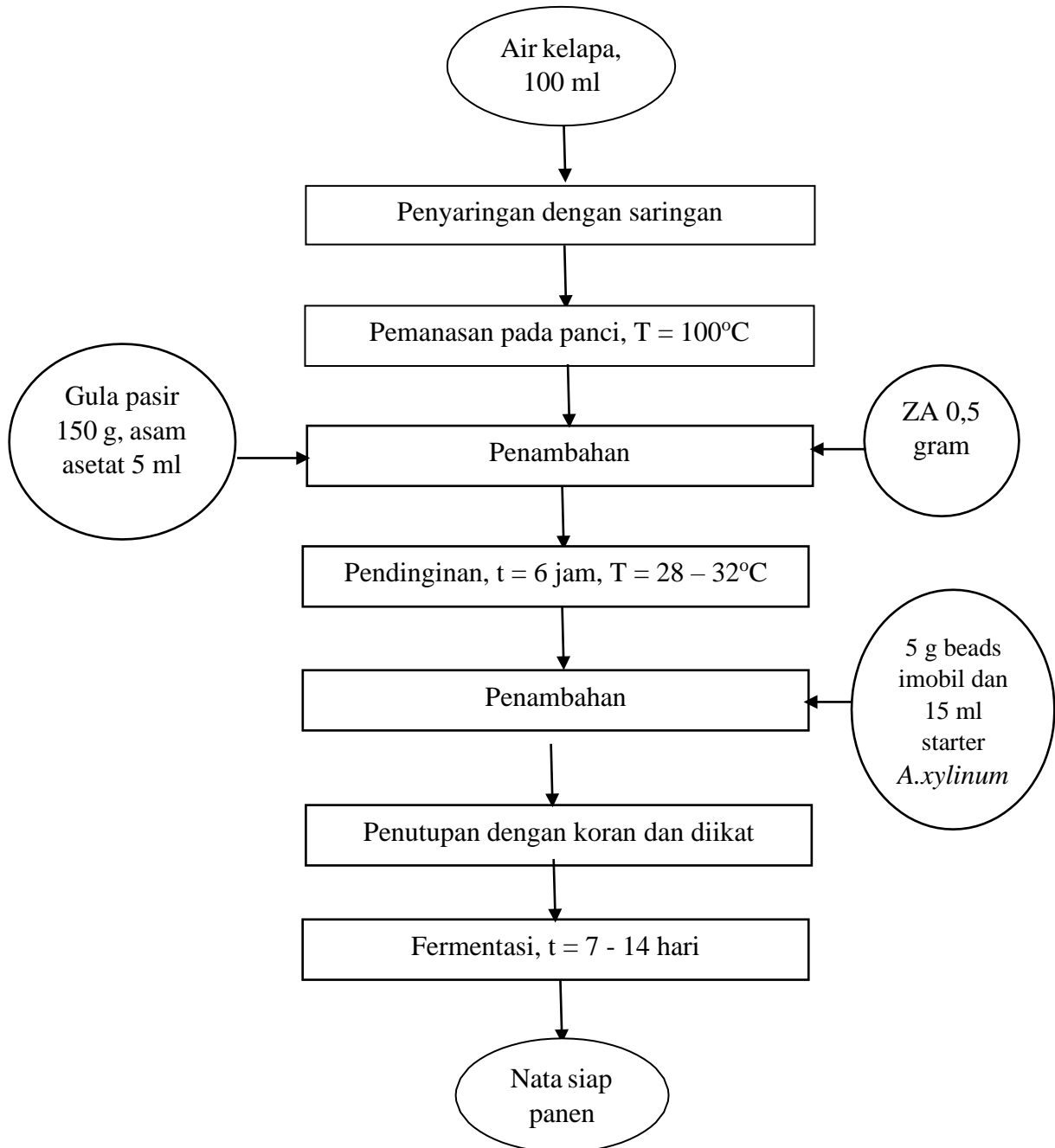


Gambar 10. Diagram alir proses pembuatan immobilisasi sel *A.xylinum*
 Sumber : Cahyono, *et al.* (2021)

3.4.3 Pembuatan Nata De Coco dengan Sel Imobil dan Starter *Acetobacter xylinum*

Pembuatan nata dengan sel imobil *A.xylinum* diawali dengan menyaring air kelapa sebanyak 100 ml dengan saringan, lalu dipanaskan dengan suhu 100°C. Selanjutnya asam asetat, gula pasir dan juga ZA dimasukkan sesuai dengan takaran yang telah ditentukan. Setelah mendidih, campuran tersebut dituangkan dalam nampan dan

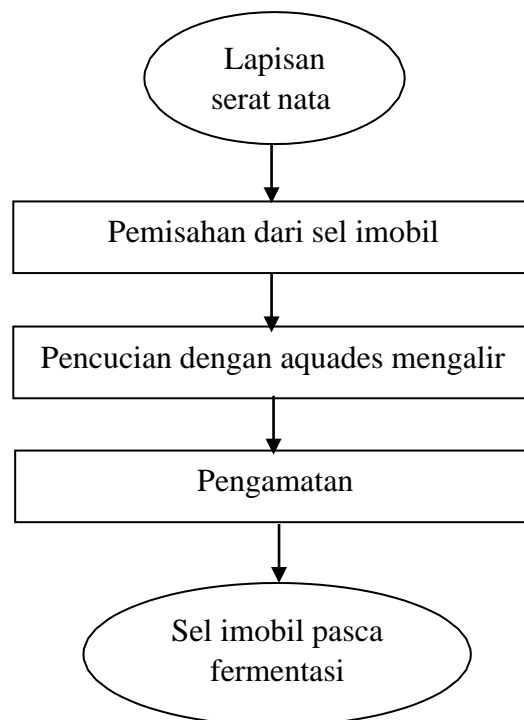
ditutup dengan kertas dan didinginkan pada suhu ruang. Kemudian beads ditambahkan sebanyak 5 gram dan 15 ml starter, lalu nampan ditutup kembali menggunakan kertas. Selanjutnya kertas diikat menggunakan karet gelang, agar tidak terkontaminasi lingkungan dari luar. Setelah itu diinkubasi selama 7 - 14 hari, dengan menjaga agar tidak terkena guncangan. Selanjutnya nata siap untuk di panen. Proses pembuatan nata de coco dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Diagram alir pembuatan nata de coco.
Sumber : Azhari (2014) dimodifikasi

3.4.4 Pemisahan Lapisan Nata dari Sel Imobil

Setelah 10 - 14 hari fermentasi nata dilakukan, akan terbentuk lapisan putih yang siap diambil dari wadah. Pada penelitian ini, lapisan yang terbentuk sangat tipis dan belum menjadi nata de coco sepenuhnya. Lapisan yang terbentuk dipisahkan dari sel imobil dan bagian lain yang rusak. Selanjutnya sel imobil dicuci dengan aquades yang mengalir. Setelah itu, sel imobil diamati secara visual apakah terjadi perubahan yang signifikan. Selanjutnya dilakukan pengamatan lebih lanjut terkait kenampakan struktur sel imobil menggunakan SEM (Scanning Electron Microscope). Proses pemisahan nata dari sel imobil dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir pemisahan lapisan serat nata dari sel imobil
Sumber : Azhari (2014) dimodifikasi

3.5 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu karakteristik sel imobil, meliputi bentuk fisik, warna, dan tekstur sebelum dan setelah fermentasi yang dilakukan secara visual. Sedangkan pengamatan pori-pori dan permukaan sel imobil dilakukan menggunakan mikroskop SEM.

3.5.1 Bentuk Fisik dan Warna Sel Imobil Pasca Fermentasi

Pengamatan bentuk fisik dan warna sel imobil pasca proses fermentasi bertujuan untuk melihat sel imobil mengalami perubahan yang signifikan selama proses fermentasi atau tidak.

3.5.2 Permukaan dan Pori-pori Sel Imobil

Pengamatan pori-pori dan permukaan sel imobil dilakukan menggunakan SEM (Scanning Electron Microscope). Penggunaan SEM banyak dimanfaatkan untuk mengamati struktur morfologi permukaan sampel dalam perbesaran yang tinggi, dengan menggunakan berkas elektron berenergi tinggi. Dimensi sampel yang akan diamati menggunakan SEM hanya dibatasi oleh ukuran bilik sampel dari alat SEM itu sendiri, karena sampel tidak harus ditembus oleh berkas elektron (Ardhika *dkk.*, 2018).

Pengamatan menggunakan SEM diawali dengan sampel sel imobil yang akan dianalisis ditempelkan dengan menggunakan *conducting glue* pada tempat bahan. Selanjutnya *hand blower* digunakan pada sampel agar dapat menempel dengan baik pada *conducting glue*. Lalu dilakukan proses *coating*, yaitu melapisi sampel dengan logam Pt atau Au agar sampel tidak rusak saat proses *scanning*. Sampel yang telah melalui proses *coating* kemudian dilakukan vakum untuk menghilangkan kadar air pada sampel. Setelah itu sampel siap untuk dianalisis (Anggraeni, 2008).

3.5.3 Lapisan Serat Nata de Coco

Pengamatan terhadap lapisan serat nata bertujuan untuk melihat apakah terdapat aktivitas bakteri *A.xylinum* setelah dilakukan imobilisasi. Aktivitas bakteri yang baik dan tidak terhambat tentunya akan membentuk lapisan nata selama proses fermentasi berlangsung. Terbentuknya lapisan nata pada pembuatan nata de coco menggunakan sel imobil *A.xylinum* sebagai data pengamatan.

V.SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Simpulan yang diperoleh pada penelitian ini yaitu :

1. Konsentrasi Na-alginat yang berbeda mempengaruhi karakteristik bentuk, ukuran, tekstur dan warna sel imobil. Na-alginat 2% menghasilkan sel imobil berbentuk bulat, berukuran 3 mm, tekstur sedikit lunak dan warna putih bening. Na-alginat 3% menghasilkan sel imobil berbentuk bulat, berukuran 4 mm, tekstur padat dan warna putih keruh. Na-alginat 4% menghasilkan sel imobil berbentuk bulat, ukuran 6 mm, tekstur padat dan warna putih kecoklatan. Na-alginat 5% menghasilkan sel imobil berbentuk bulat berekor, ukuran 6 mm, tekstur padat kokoh dan warna kecoklatan.
2. Aplikasi sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 3% menghasilkan nata de coco dengan karakteristik lapisan serat cukup tebal dan stabil (mendekati kontrol), sedangkan pada sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 4% dan 5% menghasilkan lapisan serat yang tipis.
3. Sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 2% menghasilkan pori-pori berukuran $60.37 \mu\text{m}$, jumlah yang sedikit, dan permukaan yang pecah (*cracking*), sedangkan sel imobil dengan konsentrasi Na-alginat 5% menghasilkan pori-pori berukuran $10.55 \mu\text{m}$, jumlah yang banyak, dan permukaan yang halus.

5.2 Saran

Saran yang sebaiknya dilakukan untuk penelitian ini yaitu :

1. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap lama penyimpanan sel imobil, viabilitas (daya hidup) sel dan stabilitasnya.
2. Melakukan perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode Total Plate Count (TPC) sebagai perbandingan dengan metode turbidity yang telah dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, T. 2015. 3D Cell Culture In Alginate Hydrogels. *Microarrays*. 4 : 133-161.
- Angsari, T, F., dan Rudiana, A. 2020. Pengaruh Variasi Konsentrasi Amilase Dari Kedelai (*Glycine max L.*) dan Natrium Alginate Sebagai Matriks Enzim Terhadap Efektivitas Imobilisasi. *UNESA Journal of Chemistry*. 9 (3) : 203 – 211.
- Anggraeni, N, D. 2008. *Analisa SEM (Scanning Electron Microscopy) dalam Pemantauan Proses Oksidasi Magnetite Menjadi Hematite*. Seminar Nasional – VII. Institut Teknologi Nasional. Bandung. 50-56.
- Aulia, N., Nurwantoro., dan Siti,S. 2020. Pengaruh Periode Fermentasi Terhadap Karakteristik Fisik, Kimia dan Hedonik Nata Sari Jambu Biji Merah. *Jurnal Teknologi Pangan*.4 (1) : 36-41.
- Ardhika, D, R., Atsarina, A, L., Vny,T,V., dan Heni, R. 2018. *Teknik Pengamatan Sampel Biologi dan Non-konduktif Menggunakan Scanning Electron Microscopy*. Seminar Nasional Instrumentasi, Kontrol dan Otomasi (SNIKO). Institut Teknologi Bandung. Bandung. 5 hlm.
- Azhari, M. 2014. Pemanfaatan Limbah Cair Tahu Menjadi Nata De Soya Dengan Menggunakan Air Rebusan Kecambah Kacang Tanah Dan Bakteri *Acetobacter xylinum*. *Tesis*. Program Pasca Sarjana. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 109 hlm.
- Betha, O. 2009. Amobilisasi Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116 dan *Bacillus licheniformis* F11.4 untuk Demineralisasi dan Deproteinasi Limbah Kulit Udang dalam Pengolahan Kitin. *Thesis*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. 104 hlm.
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L., and Adelberg, E. A. 2013. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Climate Change 2013. *The Physical Science Basis*. 53 hlm.

- Cahyono, K., Endang, N., Sri, W., Bambang, I, dan Sumardi. 2021. Imobilisasi Bakteri Asam Laktat Dengan Menggunakan Alginat. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*. 4 (1) : 33-40.
- Darmawan, N, A., and Pradipta, A. 2015. Characterization of Nata de Coco Produced by Fermentation of Immobilized *Acetobacter xylinum*. *Agriculture and Agricultural Science*. 3 : 278-282.
- Dewi, P. 2009. Ketahanan Hidup Sel *Acetobacter xylinum* pada Pengawetan secara Kering-Beku Menggunakan Medium Pembawa. *BIOSANTIFIKA*. (1) : 41-48.
- Draget, Kurt Ingar. Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G. 2005. *Alginate From Algae*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Norwegian. 30 hlm.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PT. Gramedia Pustaka. Jakarta. 279 hlm.
- Elakkiya, M. Prabhakaran, D. and Thirumarimurugan, M. 2016. Methods Of Cell Immobilization and Its Applications. International. *Journal Of Innovative Research In science, Engineering and Technology*. 5 : 2347-6710.
- Gayo, C, D. 2016. Pengaruh Variasi Konsentrasi Natrium Alginat Terhadap Efisiensi Penjerapan Mikrokapsul Minyak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa L.*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. 86 hlm.
- Halim, E, C., Kezia, A,T., Venisa, Y., dan Agustin, W, K. 2019. Pengaruh Persentase PVA-Alginat Beads Terhadap Tingkat Dekolorisasi Pewarna Sintetis Azo Menggunakan Konsorsium Bakteri Amobil. *Chimica et Natura Acta*. 7 (2) : 63-68.
- Hamad, A., Nur, H, A., dan Endar, P. 2014. Pengaruh Umur Starter *Acetobacter xylinum* Terhadap Produksi Nata De Coco. *Techno*. 15 (1) : 37-49.
- Handayani, Y., Budiyanoro, dan Yanis, M. 2019. Pemanfaatan Sumber N Organik pada Pembuatan Nata De Soya Sebagai Pengganti Za (Ammonium Sulfate). *Buletin Pertanian Perkotaan*. 9 (2) : 45-56.
- Hassanzadeh, A, M., Khiabani, M, S., Sadrnia, M., Divband, B., Rahmanpour, O., Jabbari, V., Gholizadeh, P., and Kafil, H.S. 2017. Immobilization And Microencapsulation of *Lactobacillus caseii* and *Lactobacillus Plantarum* Using Zeolite Base And Evaluating Their Viability In Gastroesophageal-Intes-Tine Simulated. *Ars Pharm*. 58 (4) : 163-170.

- Herawati, H. 2018. Potensi Hidrokoloid Sebagai Bahan Tambahan pada Produk Pangan dan Nonpangan Bermutu. *Jurnal Litbang Pertanian*. 37 (1) :17-25.
- Ifadah, R, A., Joni, K., dan Sudarma, W, D. 2016. Strain Improvement *Acetobacter xylinum* Menggunakan Ethyl Methane Sulfonate (EMS) Sebagai Upaya Peningkatan Produksi Selulosa Bakteri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 4 (1) : 273-282.
- Issac S., and Jennings, D. 1995. *Microbial Culture*. First Edition. BIOS Scientific Publishers.Oxford-UK. 144 hlm.
- Jobanputra, A. H. Karode B. A. and Chincholkar, S. B. 2011. Calcium Alginat As Supporting Material For The Immobilization Of Rifamycin Oxidase From *Chryseobacterium* Species. *Biotechnol.* 1: 529-532.
- Jose, M., G. 2013. *Immobilization Of Enzymes and Cells*: Third Edition. Springer Science. New York. 375 hlm.
- Kardena, E., Himawan, P, G., dan Qomarudin, H. 2020. Imobilisasi Kultur Campuran Mikroba Dan Karakteristik Aktifitasnya dalam Menurunkan Organik dan Amoniak Pada Limbah Cair Domestik. *Jurnal Teknik Lingkungan*. 26 (1) : 73-86.
- Khajouei, R., Latifa, T., Nasim,S., Anil, L, K., Slim, A., and Philippe, M. 2022. Structures, Properties and Applications of Alginates. *Marine Drugs*. 20 hlm.
- Khalid, S., Han, J., Hashmi, I., Hasnain, G., Ahmed, M, A., Khan, S, J., and Arshad, M. 2018. Strengthening Calcium Alginate Microspheres Using Polysulfone And Its Performance Evaluation: Preparation, Characterization And Application For Enchanced Biodegradation Of Chlorpyrifos. *Science of the Total Environment*. : 631-632.
- Kuncara, Y, A, D. 2017. Pengaruh Penggunaan Filtrat Kecambah Kacang Kedelai Sebagai Sumber Nitrogen Terhadap Karakteristik Nata De Soya Berbahan Dasar Limbah Tahu. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Biologi. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta. 167 hlm.
- Lee, B.B., Ravindra, P., and Chan, E.S. (2013). Size and Shape Of Calcium Alginate Beads Produced By Extrusion Dripping. *Chemical Engineering and Technology*. 36 (10) : 1627-1642.

- Lotfipour, F., Mirzaeei, S., and Maghsoodi, M. 2012. Evaluation Of The Effect Of CaCl₂ And Alginate Concentrations And Hardening Time On The Characteristics Of *Lactobacillus Acidophilus* Loaded Alginat Beads Using Response Surface Analysis. *Andanced Pharmaceutical Bulletin*. 2 :71-78.
- Luwihana, S., Kapti, K, R., Endang, R,S., dan Slamet,S. 2010. Fermentasi Asam Asetat Dengan Sel Amobil Acetobacter pasteurianus INT-7 Dengan Variasi pH Awal Dan Kadar Etanol. *Agritech*. 30 (2) : 123 – 132.
- Marlinda, Ramli, dan Ardis. 2019. Pengaruh Konsentrasi Imobilisasi Sel Saccharomyces Cerevisiae Pada Pembuatan Bioetanol Dari Nira Nipah. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat*. Pp : 135-139.
- MSDS. 2015. Alginates Handling / Process.
<https://www.ams.usda.gov/Sites/Default/Files/Media/Alginates%20TR%202015.Pdf>. Diakses pada 15 November 2023 Pukul 01.31 WIB.
- Mubarokah, I. 2018. Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Karakteristik Sel Pseudomonas Fluorescens Terimobilisasi Untuk Produksi Biodiesel. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. 87 hlm.
- Muchtadi, Tien R. 1997. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 141 hlm.
- Muhtaufiqanwar.blogspot.com. 2009. Diakses pada 9 November 2023 Pukul 22.21 WIB.
- Nadiyah., Krisdianto, dan Ajizah,A. 2005. Kemampuan bakteri *Acetobacter xylinum* mengubah karbohidrat pada limbah padi (bekatul) menjadi sellulosa. *Jurnal Bioscientiae*. 2 (2) : 37-47.
- Nita, D. 2012. *Kajian produksi selulosa mikrobial melalui dua tahap kultivasi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 70 hlm.
- Nedovic, V., and Willaert, R. 2004. *Fundamentals Of Cell Immobilisation Biotechnology*. Springer Science + Business Media B.V. Belgium. 555 hlm.
- Pratiwi, N., Inayatul, F., Wilya, Y, P., dan Irdawati. 2021. Tinjauan Literatur : Industri Alkohol menggunakan Imobilisasi Sel. *Prosiding SEMNAS BIO*. Universitas Negeri Padang. Padang. 12 hlm.
- Puji, L., Nitariani, E., Ani, S. and Yadi, S. 2014. Study on the Production of Bacterial Cellulosa from *Acetobacter xylinum* using Agro-Waste. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 7 (1) : 75-80.

- Putriana, I., dan Aminah, S. 2013. Mutu fisik, kadar serat dan sifat organoleptik nata de cassava berdasarkan lama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Gizi*.4 (7) : 29-38.
- Putriyana, R, S., Ibnu, A., Ining, P., dan Lusiana, S. 2018. Sintesis Natrium Alginat Dari *Sargassum sp.* Dengan Proses Leaching. *Prosiding Industrial Research Workshop and National Seminar*. 9 :89-93.
- Rahayu, S, F. 2018. Optimasi Media Sol-Gel Untuk Imobilisasi Enzim Asetilkolinesterase Dengan Teknik Entrapment Sebagai Aplikasi Biosensor Pendeteksi Pestisida. *Skripsi*. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang : 1-123.
- Ratnasari, N., Netty, K., dan Indah, K. 2014. Pengaruh Konsentrasi Natrium Alginat Sebagai Penjerat Sel *Lactobacillus Acidophilus* FNCC 0051 dan Lama Penyimpanan Terhadap Jumlah Sel Yang Terlepas Dan Karakter Carrier. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*.13 (2) : 81-86.
- Rohmani B, dan Kristianingrum D., 2012. *Laporan Tugas Akhir Pembuatan Nata De Lerry*. Solo. Universitas Sebelas Maret. 16 hlm.
- Saputra, I, M, Y., Nyoman, A, S., dan Ida, B, G, W. 2018. Pengaruh Konsentrasi Na-Alginat Dan Ukuran Beads Terhadap Stabilitas Beads Dan Aktivitas Sel *Agrobacterium tumefaciens* LSU20 Immobil Dalam Biodesulfurisasi Dibenzothiofena. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*.6 (2) :169-177.
- Souza, Ranyere L., Emanuelle L. P. Faria, Renan T. Figueiredo, Alini T. Fricks, Gisella M. Zanin, Onélia A. A. Santos, Álvaro S. Lima, and Cleide M. F. Soares. 2014. Use of Polyethylene Glycol in the Process of Sol-gel Encapsulation of *Burkholderia Cepacia* Lipase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.117 (1) : 301-6.
- Sujaya, I, N. 2017. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat Universitas Udayana. 26 hlm.
- Sultanto, A. 2002. *Pra Rencana Pabrik Nata de Coco*. Universitas Ktolik Widya Mandala Surabaya. Surabaya. 8 hlm.
- Whitman, K. A. and Macnair, G, N. 2004. *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures*. Iowa State Press. A Blackwell Publishing Company. pp. 121-243.

- Wijffels, R.H. 1996. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. First Edition. Elsevier. Tokyo. 11. 852 hlm.
- Yadav and Neha 2009. Various Non-Injectable Delivery System For The Treatment Of Diabetes Mellitus. *Drugs Targets*. 9 : 1-13.
- Yohana, G. 2021. Penerapan Teknologi Hasil Pertanian Dan Pengawasan Mutu Nata De Coco Di Kwt Kec. Sukatani Kab. Bekasi Provinsi Jawa Barat. *Laporan Praktik Kerja Lapangan (PKL)*. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Politeknik Enjiniring Pertanian Indonesia. Banten : 1-103.
- Zhao, X. 2015. Lipase Catalyzed Process For Biodiesel Production: Enzyme Immobilization, Process Simulation and Optimaztion. *Renewble and Sustainable Energy*. 44 : 182-197.
- Zuca, P. and Sanjust, E. 2014. Inorganic Materials As Support For Covalent Enzyme Imobilization : Method And Mecahnisms. *Molecules*. 19 : 14139-14194. 56 hlm.