

Aktiviti Antimikrob Selulosa Bakteria daripada *Komagataeibacter xylinus* menggunakan Minuman Manis Komersial Tamat Tempoh sebagai Punca Karbon (Antimicrobial Activity of Bacterial Cellulose from *Komagataeibacter xylinus* using Expired Commercial Sweet Drinks as a Source of Carbon)

TING JING YI¹, FABIANA FRANCIS¹, SAHILAH ABD MUTALIB^{1,2} & NURUL AQILAH MOHD ZAINI^{1,2*}

¹Department of Food Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Innovation Centre for Confectionery Technology (MANIS), Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 24 Februari 2022/Diterima: 21 April 2022

ABSTRAK

Selulosa bakteria (SB) adalah biopolimer yang penting kepada industri makanan kerana ciri uniknya seperti kapasiti pegangan air (WHC) dan kekuatan mekanikal yang tinggi. SB berpotensi untuk diinovasi dengan penambahan bahan pengawet bagi menyelesaikan masalah pencemaran makanan oleh bakteria patogen. Strain *Komagataeibacter xylinus* mampu menghasilkan SB yang tinggi melalui proses fermentasi. Namun, proses ini melibatkan penggunaan substrat berkos tinggi. Justeru, penyelidikan ini dijalankan untuk menghasilkan SB daripada punca bernilai rendah seperti minuman manis tamat tempoh dan menilai sifat antimikrob SB terhadap *Salmonella* Typhi. Fasa pertama kajian, faktor yang mempengaruhi penghasilan SB telah dikaji. Keputusan menunjukkan bahawa hari optimum untuk penghasilan SB adalah pada hari ke-10 fermentasi sebanyak 122.06 g/l. Nilai pH menurun daripada 5.82 pada hari 0 kepada 3.95 setelah 12 hari fermentasi. Kepekatan sukrosa dan protein menurun secara signifikan ($p < 0.05$) sepanjang tempoh fermentasi. WHC bagi SB adalah sebanyak 22.53 g air/g selulosa dan kadar penyerapan air meningkat apabila masa rendaman meningkat. Ujian biodegradasi pula menunjukkan SB basah mengurai lebih pantas (95.85%) berbanding dengan SB kering (68.1%) setelah 8 hari analisis. Pada fasa kedua kajian, SB telah ditambahkan dengan natrium benzoat dan kalium sorbat menggunakan masa rendaman (0.5, 3, 6 dan 24 jam) dan kepekatan yang berbeza (25, 50, 100, 250, 500 dan 1000 mg/mL) dalam keadaan basah dan kering. Keputusan menunjukkan SB mampu menyerap agen antimikrob dan berjaya menghalang pertumbuhan *S. Typhi*. SB basah menunjukkan zon perencatan terbesar (29 dan 17.5 mm) berbanding dengan SB kering (12 dan 14 mm) pada 24 jam rendaman dalam kepekatan 1000 mg/mL masing-masing untuk larutan natrium benzoat dan kalium sorbat. Kajian ini menunjukkan potensi selulosa bakteria untuk dijadikan sebagai pembungkus aktif bagi memanjangkan jangka hayat makanan.

Kata kunci: Jangka hayat; *Komagataeibacter xylinus*; minuman manis tamat tempoh; selulosa bakteria

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is an important biopolymer to the food industry because of its unique properties such as high in water holding capacity (WHC) and mechanical strength. BC has the potential to be innovated with the addition of preservatives to solve the problem of food contamination by pathogenic bacteria. *Komagataeibacter xylinus* is able to produce high amount of BC through fermentation process. However, the process involves the use of high cost substrates. Therefore, this study was conducted to produce BC from low value sources such as expired sugary drinks, and to evaluate the antimicrobial properties of BC against *Salmonella* Typhi. During the first phase of the study, the factors influencing the production of BC were studied. Results showed that the optimal period for BC production was on the 10th day of fermentation with 122.06 g/l BC produced. The pH value decreased from 5.82 on day 0 to 3.95 after 12 days of fermentation. Sucrose and protein concentrations decreased significantly ($p < 0.05$) during the fermentation period. The WHC for BC was 22.53 g water/g cellulose and the water absorption rate increased as the immersion time increased. Biodegradation tests showed that wet BC decomposed faster (95.85%) compared to dry BC (68.1%) after 8 days of

analysis. In the second phase of the study, dry and wet BC were supplemented with sodium benzoate and potassium sorbate at different immersion times (0.5, 3, 6, and 24 h) and different concentrations (25, 50, 100, 250, 500, and 1000 mg/mL). Results showed that BC was able to absorb antimicrobial agents and successfully inhibited the growth of *S. Typhi*. Wet BC showed the largest inhibition zone (29 and 17.5 mm) compared with dry BC (12 and 14 mm) at 24 h of immersion in a concentration of 1000 mg/mL of sodium benzoate and potassium sorbate solution, respectively. This study shows the potential of bacterial cellulose to be used as an active packaging to extend the shelf life of food.

Keywords: Bacterial cellulose; expired sugary drinks; *Komagataeibacter xylinus*; shelf life

PENGENALAN

Minuman manis adalah minuman yang ditambah dengan gula atau pemanis seperti sirap jagung fruktosa tinggi, sukrosa, glukosa, jus buah pekat dan lain-lain pemanis yang diluluskan oleh organisasi seperti Bahagian Keselamatan dan Kualiti Makanan (BKMM), Kementerian Kesihatan Malaysia dan *Food and Drug Administration* (FDA), Amerika Syarikat. Terdapat pelbagai jenis minuman manis di pasaran termasuklah minuman berkarbonat, jus buah-buahan, air berperisa dan produk tenusu. Pengambilan makanan dan minuman yang mengandungi gula yang tinggi secara berlebihan adalah tidak digalakkan kerana boleh menyebabkan masalah kesihatan. Justeru, Kementerian Kesihatan Malaysia telah mengesyorkan rakyat supaya menghadkan pengambilan gula kerana penggunaan gula berlebihan meningkatkan risiko kerosakan gigi, obesiti, sakit jantung dan masalah metabolisme (Sofia et al. 2016). Selain itu, kerajaan Malaysia juga telah menguatkuasakan cukai kepada minuman manis sejak Julai 2019 untuk mengurangkan pengambilan gula berlebihan dalam makanan (Shyam et al. 2019). Ini merupakan salah satu faktor yang mengurangkan permintaan terhadap minuman manis di Malaysia. Di Amerika Syarikat, *Nationwide Food Consumption Surveys* dan *National Health and Nutritional Examination Surveys* (NHANES) melaporkan bahawa pengambilan minuman manis telah menurun sejak awal tahun 2000 (Shrapnel & Butcher 2020). Hal ini walau bagaimanapun telah menyebabkan satu masalah baru iaitu lambakan minuman manis di pasaran. Biasanya, hayat untuk minuman manis komersial adalah antara 6 hingga 9 bulan. Selepas melepasi tarikh luput, kualiti produk akan menurun. Sebagai contoh, minuman berkarbonat akan kehilangan gas karbon dioksida dan bahan pengawet akan mengalami perubahan tindak balas kimia dan menyebabkan air minuman tersebut berlainan daripada rasa biasa. Selain itu, perubahan warna dalam minuman manis juga mungkin berlaku.

Air minuman yang tamat tempoh ini akan menyumbang kepada masalah pelupusan sisa.

Berdasarkan kenyataan Perbadanan Pengurusan Sisa Pepejal dan Pembersihan Awam (SWCorp), pada tahun 2019, Malaysia menjana 38,000 tan sisa sampah setiap hari dengan 55% antaranya adalah sisa makanan dan meningkat kepada 10.9 juta tan pada tahun 2020 (Kushairi 2019). Kebiasaannya, peruncit akan memulangkan minuman manis yang telah tamat tempoh kepada kilang pengeluaran dan minuman ini akan dirawat dengan pengurusan sisa buangan air. Dalam proses pengurusan sisa buangan air, sisa organik, pepejal terampai, bakteria, nitrat dan fosfat adalah antara bahan yang biasanya dikeluarkan. Selepas rawatan sisa buangan air, air sisa industri yang dirawat (atau efluen) dapat digunakan semula (Land Portal 2018). Bagi sisa minuman manis, walaupun telah tamat tempoh, ia masih mengandungi kandungan gula yang tinggi. Jadi, jika dirawat dengan teknologi pengurusan sisa buangan air, ia merupakan satu pembaziran kerana air minuman ini boleh dijadikan sebagai punca gula (karbon) alternatif untuk proses fermentasi bagi menghasilkan bahan bernilai tinggi seperti etanol, asid organik dan selulosa bakteria.

Selain daripada sisa makanan, plastik merupakan sisa pepejal yang ketiga terbesar dalam jumlah sisa pepejal di dunia (Zahan et al. 2020). Polimer plastik yang berpuncakan bahan petroleum tidak mudah terbiodegradasi kerana rantaian molekulnya yang besar, panjang dan susunan rapat antara satu sama lain menyebabkan mikroorganisma sukar untuk menguraikannya. Walaupun plastik boleh dikitar semula tetapi prosesnya akan mengeluarkan bahan toksik ke alam sekitar (Zahan et al. 2020). Oleh kerana sifat plastik yang tidak mudah terbiodegradasi, plastik dan pecahannya akan kekal di dalam ekosistem dan akan disalurkan ke sungai dan laut, ini menyumbang kepada pencemaran alam sekitar serta membahayakan hidupan akuatik. Disebabkan itu, penyelidik berusaha mencari bahan alternatif yang boleh terbiodegradasi untuk menggantikan plastik seperti bahan berasaskan selulosa.

Selulosa adalah biopolimer yang boleh diekstrak daripada tumbuh-tumbuhan dan juga boleh disintesis

melalui fermentasi bakteria. Walaupun kedua-dua jenis selulosa mengandungi struktur molekul yang sama, $(C_6H_{10}O_5)_n$, tetapi ciri-ciri fizikokimianya adalah berbeza. Selulosa bakteria (SB) mempunyai sifat ketulen, kekuatan mekanikal, sifat hidrofilik, keliatan dan kapasiti pengikat air yang tinggi berbanding selulosa tumbuhan (Azeredo et al. 2019; Betlej et al. 2021). SB boleh dihasilkan oleh beberapa jenis bakteria seperti *Komagataeibacter xylinus* secara semula jadi. Selulosa bakteria yang mempunyai kadar resapan air yang tinggi berpotensi untuk menyerap dan memerangkap agen kimia yang ditambah padanya (Amin et al. 2012).

Salah satu punca kerosakan makanan adalah daripada pencemaran oleh mikroorganisma yang akan mengubah rupa, rasa, bau, tekstur dan juga memberi kesan keracunan. Antara satu cara untuk mengawal kualiti makanan ialah menggunakan pengawet antimikrob pada makanan. Ia dapat memanjangkan jangka hayat makanan dengan mencegah pertumbuhan mikroorganisma yang berpotensi menyebabkan kerosakan makanan dan mikroorganisma patogen dan seterusnya meningkatkan keselamatan produk makanan. Penambahan agen antimikrob dalam pembungkus makanan seperti selulosa bakteria adalah inovasi yang berpotensi menjadikannya sebagai pembungkusan aktif dan melepasi agen antimikrob pada permukaan makanan bukannya ditambah secara langsung ke makanan (Augusto 2017). Ini meningkatkan keselamatan pengguna kerana kuantiti antimikrob yang ditambah adalah lebih kecil dan terkawal.

Dalam kajian ini, potensi selulosa bakteria yang dihasilkan oleh *Komagataeibacter xylinus* daripada minuman manis komersial tamat tempoh sebagai pembungkusan makanan yang lestari dikaji. Kajian ini dibahagikan kepada dua fasa. Pada fasa pertama, minuman manis yang telah tamat tempoh digunakan sebagai bahan suapan semasa proses fermentasi *K. xylinus* bagi menghasilkan SB. Manakala, dalam fasa kedua, SB yang terhasil ditambah dengan agen antimikrob komersial seperti natrium benzoat dan kalium sorbat untuk mengkaji kesan penambahannya terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi.

BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN MENTAH

Sampel yang digunakan untuk menghasilkan selulosa bakteria adalah minuman manis komersial (perisa anggur hitam) yang telah tamat tempoh. Sampel minuman manis diperolehi daripada kedai runcit di Selangor, Malaysia beberapa bulan sebelum kajian dijalankan. Dalam kajian

ini, minuman manis yang digunakan telah melepasi tarikh luputnya selama 5 bulan. Minuman manis mengandungi sukrosa, asid sitrik, natrium sitrat, bahan pengawet (sulfur dioksida) dan pewarna.

BAHAN KIMIA

Bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini ialah natrium hidroksida (NaOH) (Fisher chemical), kaldu De Man, Rogosa dan Sharpe (MRS) (Thermo 117 Scientific™), ekstrak yis (OXOID), Agar *Salmonella Shigella* (SS agar) (HIMEDIA), Agar Mueller Hinton (MH agar) (HIMEDIA), natrium benzoat (BDH Laboratory supplies) dan kalium sorbat (Thong Sheng Food Technology, Malaysia).

STRAIN MIKROORGANISMA

Bakteria *K. xylinus* ATCC 53582 diperolehi dari Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI), Serdang, Malaysia.

PENYEDIAAN INOKULUM *K. xylinus*

K. xylinus dikultur dalam media de Man Rogosa (MRS) (Thermo 117 Scientific™). Sebanyak 5 mL bakteria *K. xylinus* dimasukkan ke dalam kelalang kon yang mengandungi 45 mL kaldu MRS yang telah disteril pada 121 °C selama 15 minit. Pengeraman dijalankan dalam kaedah statik dalam incubator (Mettler Incubator 126 Oven INB200, Germany) selama 48 jam pada suhu 30 °C.

PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA DARIPADA MINUMAN MANIS YANG TELAH TAMAT TEMPOH PENYEDIAAN MEDIA FERMENTASI MINUMAN MANIS

Sebanyak 50 mL minuman manis komersial yang telah tamat tempoh dilarutkan dalam 450 mL air suling (pencairan 1:10) dan ditambah dengan 10 mg ekstrak yis (20 mg/L). Kemudian, media fermentasi disterilkan menggunakan autoklaf (Hirayama HVE 50, Amerika Syarikat) pada 121 °C selama 15 minit.

FERMENTASI *K. xylinus*

Fermentasi selulosa bakteria adalah merujuk kepada Fabiana et al. (2021). Sebanyak 8 mL media fermentasi dimasukkan ke dalam botol universal dan sebanyak 2 mL inokulum *K. xylinus* dimasukkan ke dalam media fermentasi (20% v/v). Kemudian, kesemua sampel dieram selama 14 hari pada suhu 30 °C tanpa goncangan (Mettler Incubator 126 Oven INB200, Germany).

Persampelan dilakukan setiap 2 hari untuk mendapat hari yang optimum bagi penghasilan selulosa bakteria. Ujian pencirian seperti pH, kandungan gula penurun, kandungan protein, berat basah dan berat kering selulosa bakteria turut dikaji.

BERAT BASAH SELULOSA BAKTERIA

Selulosa bakteria yang terbentuk pada permukaan media dari hari ke-0 hingga hari ke-12 dikeluarkan dan ditimbang untuk mendapatkan berat basahnya dengan menggunakan formula berikut (1):

$$\text{Berat basah (g)} = (\text{berat selulosa} + \text{ceper}) - (\text{berat ceper}) \quad (1)$$

pH

Dalam kajian ini, pH meter (LAQUAtwin-HORIBA, USA) telah digunakan untuk mengukur pH dalam sampel minuman manis yang tamat tempoh sepanjang tempoh fermentasi. Sebelum ukuran diambil, pH meter dikalibrasi menggunakan larutan penimbal pH 7 dan pH 4.

KANDUNGAN SUKROSA (KAEDAH FENOL ASID SULFURIK)

Kandungan sukrosa di dalam sampel minuman manis komersial yang telah tamat tempoh ditentukan dengan menggunakan kaedah fenol-asid sulfurik (Daud et al. 2019). Dalam kaedah ini, sebanyak 200 μL sampel (yang mengandungi sukrosa) dimasukkan ke dalam tabung uji. Kemudian, 0.2 mL larutan fenol 5%(v/v) dan 1.0 mL asid sulfurik 98% (v/v) ditambahkan. Tabung uji tersebut dibiarkan selama 10 minit dan kemudian digoncang untuk memastikan campuran sekata. Selepas itu, pemeriksaan penyerapan pada 490 nm dijalankan dengan menggunakan spektrofotometer (InnovaTM 4200 New Brunswick Scientific, USA). Lengkung penentukuran sukrosa diperoleh dengan memeriksa penyerapan beberapa kepekatan sukrosa (1, 5, 10, 20, 30 mg/mL) yang berbeza.

KANDUNGAN PROTEIN

Sebanyak 250 μL sampel ditambah pada 2.5 mL reagent Bradford dan dicampurkan dengan menggunakan vortex (XH-D Vorteks Pencampur, China). Sampel kemudiannya dieram pada suhu bilik (25 °C) untuk sekurang-kurangnya 15 minit. Akhirnya, penyerapan sampel diukur pada 595 nm dan bacaannya dicatatkan. Lengkung piawai protein diperoleh dengan menggunakan

beberapa kepekatan (1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL) Bovin albumin serum (BSA) yang berbeza.

ANALISIS CIRI FIZIKOKIMIA SELULOSA BAKTERIA

Selulosa bakteria yang terhasil dibilas dengan air suling dan direndam dalam 0.1M NaOH pada 80 °C selama 2 jam untuk mematikan dan melarutkan sel bakteria dan komponen media yang lain sebelum dijalankan analisis fizikokimia (Fabiana 2021). Kemudian, selulosa bakteria dibasuh dengan air suling beberapa kali untuk mendapat nilai pH neutral. Analisis pencirian selulosa bakteria dijalankan seperti berikut.

KAPASITI MEMEGANG AIR SELULOSA BAKTERIA

Berat basah dan berat kering bagi setiap selulosa bakteria yang terhasil telah direkod untuk menghitung kapasiti pegangan air. Berat kering dikenal pasti setelah selulosa bakteria dikeringkan selama 2 jam pada suhu 60 °C dalam relau (Mettler Incubator 126 Oven INB200, Germany) sehingga berat malar diperoleh. Kapasiti menampung air dihitung dengan menggunakan persamaan berikut (2):

$$\text{Kapasiti pegangan air } \left(\frac{g}{g}\right) = \frac{\text{Jisim air yang tersejat semasa pengeringan (g)}}{\text{Berat kering selulosa bakteria (g)}} \quad (2)$$

KADAR PENYERAPAN SELULOSA BAKTERIA

Kadar penyerapan selulosa bakteria diukur dengan merendam selulosa bakteria kering (diameter 3 cm) ke dalam 10 mL air suling and berat selulosa bakteria sebelum dan selepas rendaman direkodkan mengikut masa rendaman (0.5, 3, 6, 24 jam). Kandungan air 1 g adalah sama dengan 1 mL. Kandungan air yang diserap dihitung dengan formula berikut (3):

$$\begin{aligned} &\text{Kandungan air yang diserap oleh selulosa bakteria (mL)} \\ &= \text{berat selulosabakteria selepas rendaman} - \\ &\quad \text{berat selulosa bakteria sebelum rendaman} \end{aligned} \quad (3)$$

UJIAN BIODEGRADASI SELULOSA BAKTERIA

Ujian biodegradasi selulosa bakteria dijalankan dengan menggunakan kaedah tanaman di dalam bekas yang mengandungi tanah hitam (Afiqah & Aqilah 2020). Selulosa bakteria (diameter 3 cm) dalam keadaan basah dan kering ditanam di dalam 50 g tanah hitam dan dibiarkan pada suhu bilik (25 °C) selama 8 hari. Selulosa

bakteria yang telah ditanam dibersihkan terlebih dahulu dengan kertas tisu sebelum ditimbang pada setiap 48 jam. Kadar biodegradasi selulosa bakteria diukur dengan menghitung berat yang hilang oleh bakteria selulosa yang ditanam. Peratus bagi berat yang hilang menghitung dengan menggunakan formula (4).

Biodegradasi (%) =

$$\frac{\text{berat asal selulosa} - \text{berat selulosa selepas ditanam}}{\text{berat asal selulosa}} \times 100\% \quad (4)$$

KESAN PENAMBAHAN AGEN ANTIMIKROB KE ATAS SELULOSA BAKTERIA

Dalam fasa kedua kajian, selulosa bakteria yang terhasil dalam fasa pertama dibilas dengan air suling dan melalui rawatan kimia (direndam dalam larutan 0.1M NaOH selama 2 jam pada suhu 80 °C). Kemudiannya, selulosa bakteria dibilas dengan air suling beberapa kali. Penghasilan gel selulosa aktif dilakukan dengan merendam selulosa bakteria dalam larutan agen antimikrob komersial.

MEDIA UNTUK PERTUMBUHAN (*S. TYPHI*) AGAR *Salmonella Shigella* (SS)

Agar SS adalah medium selektif untuk pertumbuhan bakteria *S. Typhi*. Dalam kajian ini, *S. Typhi* telah dihidupkan dengan meletakkan gelung steril ke dalam stok gliserol dan dihidupkan ke dalam Agar SS (Himedia, HIMEDIA Laboratories Pvt.Ltd. India) steril dengan menggunakan kaedah plat coretan untuk mendapat koloni yang tulen bagi analisis aktiviti antimikrob seterusnya.

AGAR MUELLER HINTON (MH)

Agar Mueller Hinton (Himedia, HIMEDIA Laboratories PvtLtd. India) digunakan untuk ujian kerentanan antimikrob bagi bakteria patogen kerana komposisinya memudahkan agen antimikrob tersebar di atasnya. Ia merupakan ciri penting untuk ujian kerentanan melalui kaedah resapan cakera. Koloni tunggal *S. Typhi* daripada agar SS telah diambil dan disebar ke atas Agar MH menggunakan lidi kapas steril. Bakteria dihidupkan ke dalam Agar MH melalui teknik plat sebaran.

UJIAN KERENTANAN *S. TYPHI* MENGGUNAKAN KAEDAH RESAPAN CAKERA

Analisis kaedah resapan cakera dijalankan merujuk kepada Khalid et al. (2017). Selulosa bakteria kering digunting kepada kepingan kecil dengan diameter 0.5 cm × 0.5 cm. Kepingan kecil direndam dalam agen

antimikrob komersial natrium benzoat dan kalium sorbat pada kepekatan (25, 50, 100, 250, 500 dan 1000 mg/mL) dan masa rendaman (0.5, 3, 6 dan 24 jam) yang berbeza. Agen antimikrob diuji dalam dua keadaan seperti berikut:

- (1) selulosa bakteria + agen antimikrob (basah)
- (2) selulosa bakteria + agen antimikrob (dikeringkan 60 °C selama 2 jam)

Kepekatan agen antimikrob yang meresap ke dalam selulosa bakteria dihitung dengan menimbang berat kering dan berat selepas rendaman. Selulosa bakteria yang diresapkan dengan agen antimikrob ini kemudiannya diletakkan di atas agar MH yang mengandungi *S. Typhi*. Untuk kawalan positif, cakera antimikrob yang digunakan adalah Ciprofloxacin, 10 mg (agen antimikrob komersial yang merawat *S. Typhi*), manakala bagi kawalan negatif adalah selulosa bakteria tanpa agen antimikrob. Kemudian, piring agar dieramkan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Zon jelas dalam piring agar diukur dalam unit (mm) sebagai zon yang menghalang pertumbuhan bakteria.

PENYERAPAN AGEN ANTIMIKROB SELULOSA BAKTERIA

Penyerapan agen antimikrob oleh selulosa bakteria telah dihitung dengan formulasi berikut (5):

Berat agen antimikrob yang diserap (mg) = kepekatan rendaman (mg/mL) isi padu yang diserap (mL) (5)

CIRI MORFOLOGI SELULOSA SELEPAS PENAMBAHAN AGEN ANTIMIKROB

Ciri morfologi permukaan selulosa bakteria basah dan kering yang ditambah dengan natrium benzoat dan kalium sorbat serta kawalan negatif telah diperhatikan dengan menggunakan mikroskop imbasan elektron (FESEM) (Merlin Compact, Zeiss) di bawah magnifikasi 20K kali pembesaran. Selulosa basah dikeringkan terlebih dahulu menggunakan CPD (*critical drying point*) sebelum diperhatikan, manakala selulosa kering boleh terus diperhatikan.

ANALISIS STATISTIK

Semua data yang diperoleh dianalisis dengan kaedah analisis *one-way* ANOVA dengan menggunakan perisian SPSS. Nilai data direkodkan dalam dalam nilai purata ± sisihan piawai (SD). Ujian Tukey's digunakan untuk menentukan perbezaan signifikan bagi nilai min pada aras keyakinan 95% ($p < 0.05$).














HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA DARIPADA MINUMAN MANIS YANG TELAH TAMAT TEMPOH

Kajian ini dijalankan bagi mendapatkan hari optimum penghasilan selulosa bakteria dengan menggunakan minuman manis yang telah tamat tempoh dan ditambah dengan ekstrak yis sebagai punca nitrogen. Fermentasi dijalankan secara statik pada suhu 30 °C selama 12 hari. Berbanding dengan fermentasi secara penggoncangan, fermentasi statik lebih mudah dan tidak memerlukan teknologi tinggi. Kaedah ini juga dapat menghasilkan selulosa dalam bentuk pelikel seragam yang dapat diperhatikan dengan mata kasar. Perbandingan dari segi ketebalan selulosa bakteria yang terhasil sepanjang proses fermentasi dalam minuman manis tamat tempoh ditunjukkan dalam Jadual 1.

Pemerhatian menunjukkan bahawa pelikel selulosa bakteria terbentuk di antara permukaan cecair-udara media fermentasi. Ini adalah kerana *K. xylinus* adalah bakteria aerobik yang hanya mampu menghasilkan selulosa di sekitar permukaan yang mengandungi oksigen yang tinggi (Żywicka et al. 2021). Bermula dari hari ke-2, lapisan yang terhasil boleh dilihat dengan mata kasar. Ketebalan lapisan selulosa yang terhasil meningkat dengan ketara sehingga hari ke-10, dengan ketebalan lapisan selulosa yang paling tinggi dapat diperhatikan. Selulosa bakteria didapati bertumbuh dengan baik di dalam sampel media kerana menurut Aswini et al. (2020), penggunaan sukrosa sebagai punca karbon mempercepatkan proses fermentasi dan memaksimumkan penghasilan selulosa bakteria dalam masa yang singkat.

JADUAL 1. Selulosa bakteria yang terhasil pada permukaan minuman manis yang telah tamat tempoh

Parameter	Hari fermentasi						
	0	2	4	6	8	10	12
Pembentukan selulosa bakteria							
Ketebalan selulosa bakteria	-						
Berat basah selulosa bakteria (g/L)	0 ^c	49.1 ± 0.14 ^d	49.9 ± 0.42 ^d	59.3 ± 0.57 ^c	61.1 ± 1.70 ^c	122.1 ± 3.59 ^a	112.2 ± 0.71 ^b

*abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min

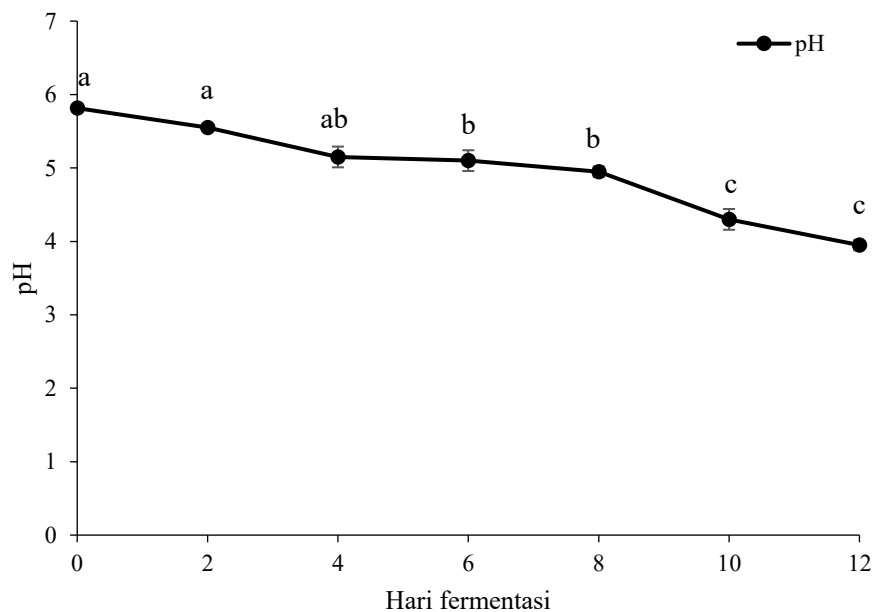
Keputusan berdasarkan pemerhatian visual menunjukkan ketebalan selulosa bakteria meningkat selari dengan peningkatan berat basahnya. Terdapat perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap berat basah selulosa bakteria yang terhasil dalam minuman manis tamat tempoh dari hari ke-0 hingga ke-12 fermentasi. Selulosa bakteria mula dihasilkan pada permukaan

medium minuman manis tamat tempoh pada hari ke-2 fermentasi. Penghasilan selulosa bakteria menunjukkan peningkatan dari hari ke-2 hingga ke-10 fermentasi dengan berat basah sebanyak 49.1 dan 122.06 g/L, masing-masing. Namun, penghasilan selulosa bakteria mula menurun pada hari ke-12 dengan berat basah sebanyak 112.2 g/L. Penghasilan selulosa bakteria

menurun apabila hari fermentasi meningkat mungkin disebabkan oleh bakteri dalam media fermentasi menjadi kurang aktif ataupun telah mati disebabkan kekurangan nutrien (Zahan et al. 2016) dan ini selari dengan kajiannya yang menunjukkan bilangan *K. xylinus* berkurang sebanyak 30% dari hari ke-2 hingga hari ke-6 fermentasi dan menyebabkan 25.5% penurunan dalam penghasilan selulosa bakteria. Selain itu, penurunan pH dalam media fermentasi yang menyebabkan media menjadi berasid juga boleh menjadi toksik kepada sel *K. xylinus* (Lestari et al. 2014).

PERUBAHAN pH, SUKROSA DAN PROTEIN SEMASA PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA

Perubahan nilai pH yang berlaku sepanjang tempoh fermentasi ditunjukkan dalam Rajah 1. Pada permulaan proses fermentasi, nilai pH pada media fermentasi minuman manis tamat tempoh adalah 5.82. Pada hari ke-0 hingga hari ke-4, nilai pH turun secara signifikan ($p < 0.05$) kepada 5.15. Manakala pada hari ke-12 pula, nilai pH yang terendah dicatatkan sepanjang tempoh fermentasi iaitu 3.95.



^{a-c} Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min

RAJAH 1. Nilai pH dalam media fermentasi minuman manis tamat tempoh sepanjang tempoh fermentasi

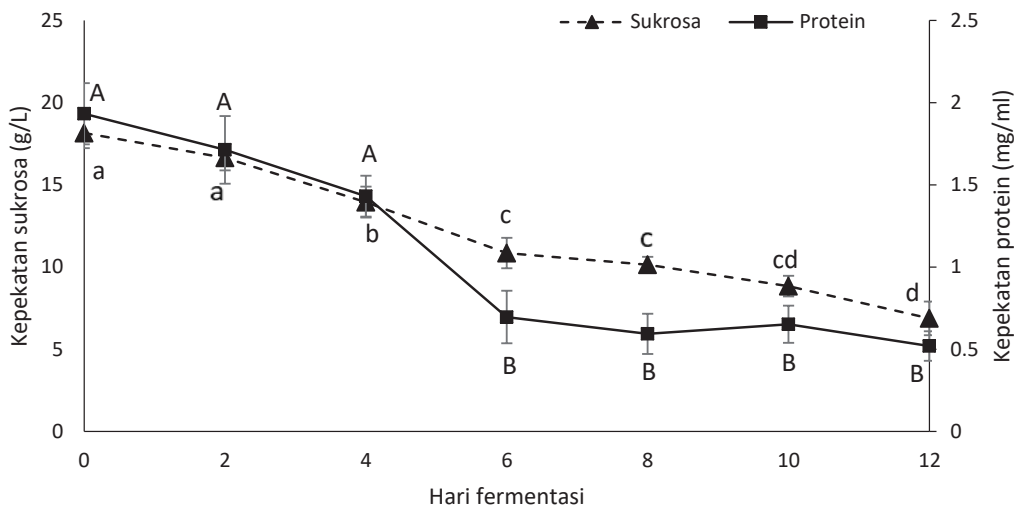
Menurut Zahan et al. (2016), pH dalam media fermentasi dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteria dengan mempengaruhi aktiviti enzim sel bakteria. Penurunan pH ini disebabkan oleh penghasilan asid organik sebagai produk sampingan oleh *K. xylinus* semasa fermentasi. *K. xylinus* menggunakan substrat glukosa daripada pecahan disakarida sukrosa dalam minuman manis tamat tempoh dan dimetabolismakan kepada produk sampingan, asid glukonik (Elfari et al. 2005). Glukosa berlebihan yang tidak digunakan untuk sintesis selulosa akan dimetabolismakan kepada bahan lain. Selain daripada asid glukonik, asid organik seperti asid asetik dan asid laktik juga terhasil semasa proses fermentasi (Lee et al. 2014). Berat basah selulosa

meningkat sehingga hari ke-10 dimana nilai pH pada ketika itu adalah 4.3. Namun, pada hari ke-12, berat basah selulosa mula menurun selari dengan penurunan nilai pH kepada 3.95. Ini menunjukkan *K. xylinus* tidak bertumbuh dengan baik dalam keadaan yang berasid (kurang daripada 3.9) dan secara langsung tidak aktif untuk menghasilkan selulosa bakteria. Penyataan ini disokong oleh Chawla et al. (2009) yang menyatakan optimum pH bagi *K. xylinus* ialah antara pH 4.5 hingga 6.0. Dalam kajian Zahan et al. (2016) juga menunjukkan *K. xylinus* berkurang sebanyak 30% apabila nilai pH menurun daripada 5.05 ke 3.5.

Pada permulaan proses fermentasi, kepekatan sukrosa adalah sebanyak 18.15 g/L (Rajah 2). Kepekatan

sukrosa berkurang secara ketara ($p < 0.05$) dari hari ke-0 hingga hari ke-4 iaitu dari 18.15 mg/mL hingga 13.94 g/L dan kemudiannya turun lagi hingga 10.86 g/L pada hari ke-6. Pada hari ke-12 fermentasi, kepekatan sukrosa yang terendah telah dicatatkan iaitu sebanyak 6.88 g/L. Menurut Pourramezan et al. (2009) berat optimum selulosa bakteria diperoleh pada kepekatan 15 g/L dan

menurun apabila kepekatan sukrosa melebihi 20 g/L. Jika kepekatan punca karbon meningkat, penghasilan asid glukonik akan meningkat dan peningkatan asid menurunkan pH dan menjadikan media dalam keadaan berasid. Keadaan berasid ini menyebabkan bakteria menjadi tidak aktif dan mengurangkan penghasilan selulosa bakteria (Lavasani et al. 2019).



a-d, A-B abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min

RAJAH 2. Kepekatan sukrosa dan protein dalam media fermentasi minuman manis tamat tempoh semasa proses fermentasi

Bagi kepekatan protein pula, pada permulaan fermentasi, kepekatan protein adalah sebanyak 1.93 mg/mL dan pada hari ke-6, kepekatan protein telah menurun secara signifikan ke 0.69 mg/mL ($p < 0.05$). Kemudiannya, hari ke-8 hingga ke-12, kepekatan protein menurun dari 0.69 mg/mL ke 0.52 mg/mL. Keputusan menunjukkan sebanyak 73% kandungan protein telah digunakan oleh *K. xylinus* semasa fermentasi bagi menghasilkan selulosa bakteria. Nitrogen adalah punca protein yang amat diperlukan dalam metabolisme sel. Dalam kajian ini, ekstrak yis ditambahkan ke dalam media fermentasi minuman manis tamat tempoh bagi membekalkan punca nitrogen untuk pertumbuhan *K. xylinus*. Ekstrak yis mengandungi nitrogen, amino nitrogen dan natrium. Chawla et al. (2009) yang mengkaji kesan penambahan punca protein berbeza terhadap penghasilan selulosa bakteria mendapati bahawa ekstrak yis dan kasein mendapat hasil selulosa bakteria yang tinggi. Kurosumi et al. (2009) juga melaporkan ekstrak yis dan bakteopepton amat diperlukan untuk pertumbuhan

sel dan pembinaan mikrofibril selulosa. Penyataan ini juga disokong oleh Dirpan et al. (2019) yang melaporkan *K. xylinus* memerlukan punca nitrogen sebagai komponen biosintesis selulosa.

CIRI FIZIKOKIMIA SELULOSA BAKTERIA DARIPADA MINUMAN MANIS TAMAT TEMPOH KAPASITI PEGANGAN AIR SELULOSA BAKTERIA

Kapasiti pegangan air merupakan salah satu ciri selulosa bakteria yang penting untuk menjadikannya sebagai pembungkusan makanan aktif. Dalam kajian ini, berat basah selulosa selepas rawatan kimia adalah 0.699 g manakala selepas dikeringkan, berat akhirnya adalah 0.030 g. Oleh itu, kapasiti pegangan air adalah 22.53 g air/g selulosa. Rajah 3 menunjukkan imej selulosa bakteria dalam keadaan basah dan kering. Selulosa bakteria basah mempunyai permukaan yang licin, tebal dan tanpa warna. Manakala, selulosa bakteria kering berwarna putih dan nipis. Ini adalah kerana air telah tersejat semasa proses pengeringan. Kesan warna keperangan selulosa

bakteria kemungkinan disebabkan oleh suhu tinggi yang digunakan semasa proses pengeringan (Afiqah 2020).

WHC berkait rapat dengan keporosan dan kawasan permukaan dalam matriks selulosa bakteria. Contohnya selulosa bakteria yang mempunyai keliangan yang tinggi membolehkannya menyerap lebih banyak molekul air. Molekul air ini masuk ke dalam pori dan terikat kepada fibril selulosa melalui ikatan hidrogen (Ul-Islam et al. 2012). Susunan fibril yang longgar dalam matriks selulosa menjadikannya mempunyai kawasan permukaan yang tinggi dan mengakibatkan selulosa bakteria bersifat hidrofilik yang tinggi. Biasanya selulosa

bakteria dapat menakung air 50-1000 kali daripada berat keringnya (Swingler et al. 2021). Menurut Campano et al. (2016), hanya 10% daripada 99% (w/w) air yang terkandung dalam hidrogel adalah air bebas (*free water*) manakala yang baki (89%) terikat kepada rangkaian nanofibril sebagai air dalam keadaan terikat kuat (*bound water*). WHC yang tinggi diperoleh dalam kajian ini membuktikan bakteria selulosa berpotensi dijadikan sebagai pembungkusan aktif yang boleh diresapkan dengan bahan aktif seperti agen antimikrob dan antioksidan.



A



B

RAJAH 3. Imej selulosa bakteria (A) selulosa bakteria basah dan (B) selulosa bakteria kering (60 °C, 2 jam) selepas rawatan kimia

PENYERAPAN SELULOSA BAKTERIA BERDASARKAN MASA RENDAMAN

Penyerapan selulosa bakteria dikaji untuk mengetahui kepekatan sebenar agen antimikrob yang diserap oleh

selulosa bakteria bagi analisis antimikrob seterusnya. Rajah 4 menunjukkan isi padu air yang diserap oleh selulosa bakteria dalam masa rendaman yang berbeza (0.5, 3, 6, 24 jam) (1g = 1 mL kandungan air) (Jadual 2).

JADUAL 2. Penyerapan air oleh selulosa bakteria pada masa rendaman yang berbeza

Masa rendaman (jam)	Isi padu yang diserap oleh selulosa bakteria (mL)
0	0 ^d
0.5	0.015 ± 0.005 ^e
3	0.041 ± 0.003 ^b
6	0.057 ± 0.004 ^a
24	0.061 ± 0.004 ^a

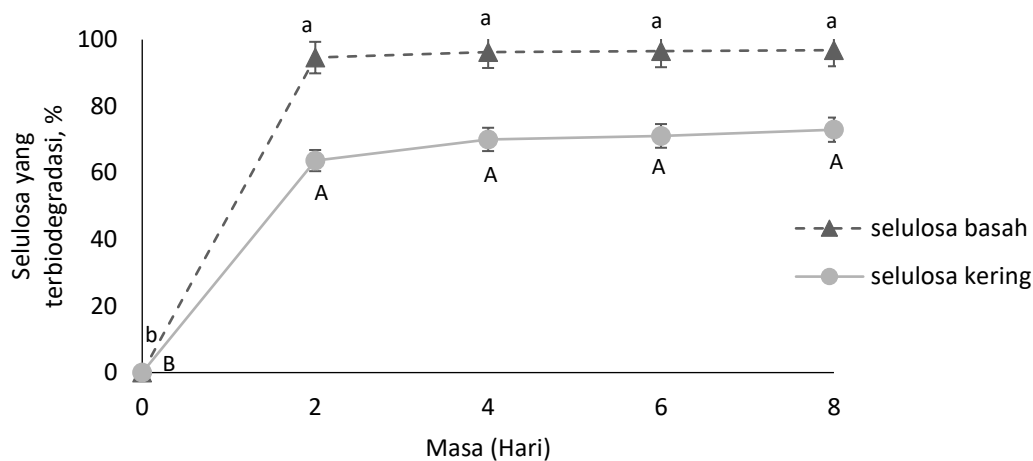
Keputusan ditunjukkan dalam min ± sisihan piawai. ^{a-d} Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan (p<0.05) antara nilai min

Keputusan menunjukkan kandungan air yang diserap meningkat daripada 0.01 g hingga 0.06 g oleh selulosa bakteria apabila masa rendaman meningkat. Penyerapan air ini meningkat pantas dalam 6 jam semasa rendaman adalah disebabkan oleh ikatan hidrogen molekul air kepada kumpulan hidroksil bebas mikrofibril pada dinding sel selulosa bakteria dan air molekul mengalir ke dalam mikrofibril melalui difusi. Selepas 6 jam rendaman, berat selulosa bakteria tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) pada masa rendaman 24 jam. Keputusan yang sama ditunjukkan dalam kajian Abdulkhani et al. (2013) yang melaporkan penyerapan air maksimum berlaku pada 0 hingga 6 jam dan seterusnya tiada perbezaan antara 6 hingga 24 jam. Beliau menjelaskan bahawa penyerapan kelembapan

berlaku pada permulaan rendaman menyebabkan fiber selulosa membengkak dan mengubah dimensi komposit selulosa bakteria terutamanya ketebalan selulosa bakteria.

KADAR BIODEGRADASI SELULOSA BAKTERIA DARIPADA MINUMAN MANIS TAMAT TEMPOH

Selulosa bakteria berpotensi sebagai polimer alternatif bagi menggantikan plastik konvensional berasaskan petroleum kerana ciri-cirinya yang mudah terbiodegradasi dan berpotensi mengurangkan jumlah sisa plastik. Rajah 4 menunjukkan perbandingan kadar biodegradasi antara selulosa basah dan kering yang terhasil daripada minuman manis tamat tempoh.



^{a,b,A-B} Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min

RAJAH 4. Kadar biodegradasi selulosa bakteria basah dan kering yang terhasil melalui fermentasi minuman manis tamat tempoh

Keputusan menunjukkan selulosa basah dan selulosa kering terbiodegradasi secara signifikan ($p < 0.05$) dalam hanya dua hari selepas penanaman. Selulosa basah terbiodegradasi lebih pantas berbanding dengan selulosa kering. Pada hari ke-2, selulosa basah telah terbiodegradasi sebanyak 92.6% dan tiada perbezaan signifikan ($p = 0.885$) pada hari seterusnya (hari ke-2 hingga hari ke-8). Pada hari ke-8, kadar biodegradasi selulosa basah telah mencapai sebanyak 95.85%. Bagi selulosa kering pula, kadar terbiodegradasi meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) dari 0 ke 58.4% pada hari ke-2 penanaman. Seterusnya, walaupun terdapat peningkatan kadar terbiodegradasi dari 58.4% ke 68.1% pada hari ke-2 hingga hari ke-8, tetapi peningkatan ini adalah

tidak signifikan ($p = 0.782$). Selulosa bakteria basah menunjukkan kadar terbiodegradasi yang lebih pantas kerana bakteria selulosa basah mengandungi kelembapan dan aktiviti air yang tinggi. Selulosa yang dihasilkan oleh *K. xylinus* adalah polimer berbentuk ribbon dan mempunyai beberapa kumpulan hidroksil yang mudah terbiodegradasi. Menurut Richards et al. (2012), kelembapan tinggi meningkatkan mortaliti bakteria dan juga meningkatkan aktiviti mikrob dalam tanah, justeru, dapat mengeluarkan enzim untuk menguraikan selulosa bakteria. Tahap kelembapan optimum untuk biodegradasi bahan organik adalah antara 50 hingga 70%. Hal ini menunjukkan selulosa bakteria mempunyai kadar penguraian yang tinggi.

AKTIVITI ANTIMIKROB SELULOSA BAKTERIA
MINUMAN MANIS TAMAT TEMPOH

Kadar penyerapan air yang tinggi menunjukkan selulosa bakteria daripada minuman manis tamat tempoh berpotensi sebagai bahan pembawa (*carrier*)

aktif. Justeru, pada fasa 2 kajian, agen anti-mikrob natrium benzoat dan kalium sorbat ditambahkan pada selulosa bakteria untuk menilai kesan penambahan agen antimikrob pada selulosa bakteria terhadap pertumbuhan *S. Typhi*. Zon perencatan menunjukkan pertumbuhan *S. Typhi* yang dihalang oleh selulosa bakteria aktif.

JADUAL 3. Perbandingan aktiviti antimikrob selulosa bakteria dalam keadaan basah dan kering yang direndam dalam larutan natrium benzoat terhadap *S. Typhi*

Masa rendaman (jam)	Keadaan selulosa bakteria	Zon perencatan (mm)						<i>Ciproflaxacin</i> . 10 mg (Kawalan positif)
		Kepekatan larutan natrium benzoat (mg/mL)						
		25	50	100	250	500	1000	
0 (Kawalan negatif)	Basah	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	40±0 ^a
0.5	Basah	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	40±0 ^a
3	Basah	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	6.5±0.71 ^f	8.5±0.71 ^f	14.0±1.41 ^{de}	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	6.5±2.12 ^f	40±0 ^a
6	Basah	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	7.5±2.12 ^f	17.5±3.54 ^d	26.0±2.83 ^{bc}	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	7.0±1.41 ^f	9.5±0.71 ^{ef}	40±0 ^a
24	Basah	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	8.5±0.71 ^f	24.0±1.41 ^c	29.0±0 ^b	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	0±0 ^g	7.5±0.71 ^f	12.0±4.24 ^{ef}	40±0 ^a

Keputusan ditunjukkan dalam min ± sisihan piawai. ^{a-f} Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min untuk selulosa bakteria

Jadual 3 menunjukkan zon perencatan terhadap *S. Typhi* oleh selulosa bakteria kering dan basah dalam larutan natrium benzoat dan keputusan telah berbanding dengan kawalan positif (*Ciproflaxacin*, 10 mg) dan kawalan negatif (tiada rendaman agen antimikrob). Kawalan positif menunjukkan zon perencatan yang terbesar iaitu sebanyak 40 mm manakala dalam kawalan negatif, tiada zon perencatan yang dijumpai. Secara keseluruhan, selulosa bakteria basah menunjukkan kesan aktiviti antimikrob yang lebih kuat berbanding dengan selulosa kering. Contohnya, selulosa basah mula menunjukkan kesan antimikrob pada kepekatan 250 mg/mL dengan masa rendaman 3 jam dengan 6.5 mm rencatan, manakala, selulosa kering hanya menunjukkan kesan antimikrobnya bermula dari 500 mg/mL dengan

masa rendaman 6 jam dengan 7.0 mm rencatan. Selain itu, selulosa bakteria basah telah mencatatkan zon perencatan yang tertinggi, iaitu sebanyak 29 mm pada kepekatan 1000 mg/mL dengan masa rendaman 24 jam manakala selulosa kering mencatatkan hanya 12 mm pada kepekatan dan masa rendaman yang sama.

Melihat pada aspek masa rendaman, terdapat perbezaan signifikan ($p < 0.05$) untuk zon perencatan dalam masa rendaman yang berbeza. Kedua-dua selulosa menunjukkan tiada zon perencatan pada 0.5 jam rendaman. Selepas 3 jam masa rendaman, selulosa basah mula menunjukkan zon perencatan sebanyak 14 mm dengan kepekatan 1000 mg/mL dan kesan aktiviti antimikrobnya meningkat dari 6 jam (26 mm) ke 24 jam (29 mm). Selulosa kering juga menunjukkan tren

peningkatan yang sama dari 3 jam (6.5 mm) hingga 24 jam (12 mm) masa rendaman. Dari segi kepekatan larutan natrium benzoat yang diserap oleh selulosa bakteria, terdapat perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kepekatan larutan natrium benzoat dan zon perencatan. Misalnya, selulosa basah menunjukkan zon perencatannya sebanyak 6.5 mm pada kepekatan 250 mg/mL larutan natrium benzoat dengan masa rendaman 3 jam. Pada masa rendaman yang sama, zon perencatannya

meningkat ke 8.5 mm pada kepekatan 500 mg/mL dan 14 mm pada kepekatan 1000 mg/mL. Untuk selulosa kering pula, zon perencatan mula kelihatan pada kepekatan 500 mg/mL dengan masa rendaman 6 jam (sebanyak 7 mm). Zon perencatan ini meningkat ke 9.5 mm pada kepekatan 100 mg/mL pada masa rendaman yang sama.

Bagi selulosa bakteria yang direndam dalam larutan kalium sorbat, zon perencatan terhadap *S. Typhi* oleh selulosa bakteria kering dan basah dalam larutan kalium sorbat telah ditunjukkan dalam Jadual 4.

JADUAL 4. Perbandingan aktiviti antimikrob selulosa bakteria dalam keadaan basah dan kering yang direndam dalam larutan kalium sorbat terhadap *S. Typhi*

Masa rendaman (jam)	Keadaan selulosa bakteria	Zon perencatan (mm)						<i>Ciproflaxacin</i> . 10 mg (Kawalan positif)
		Kepekatan larutan kalium sorbat (mg/mL)						
		25	50	100	250	500	1000	
0 (Kawalan negatif)	Basah	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	40±0 ^a
0.5	Basah	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	8.5±0.71 ^{def}	11.5±2.12 ^{cde}	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	40±0 ^a
3	Basah	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	10.0±0 ^{cde}	15.5±6.3 ^{bcd}	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	7.0±0 ^{def}	9.0±1.41 ^{dc}	40±0 ^a
6	Basah	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	5.0±0 ^{ef}	12.5±2.12 ^{cde}	18.0±7.07 ^b	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	8.0±1.41 ^{def}	12.5±0.71 ^{cde}	40±0 ^a
24	Basah	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	9.5±2.12 ^{de}	11.5±0.71 ^{cde}	17.5±3.53 ^{bc}	40±0 ^a
	Kering	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	11.0±0 ^{cde}	14.0±1.41 ^{bcd}	40±0 ^a

Keputusan ditunjukkan dalam min ± sisihan piawai. ^{a-f} Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara nilai min untuk selulosa bakteria

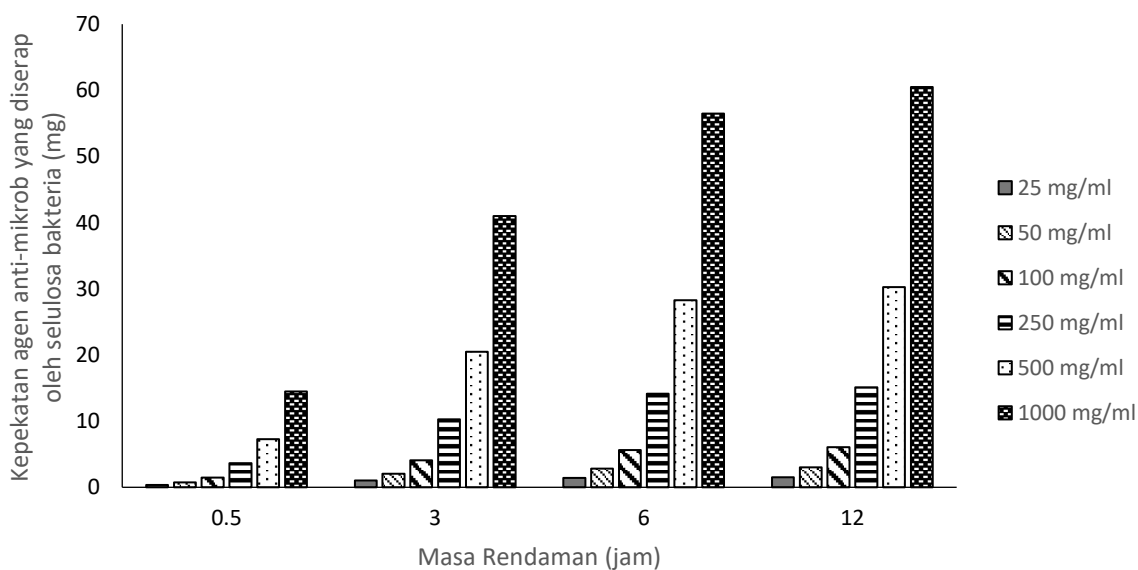
Keputusan menunjukkan selulosa bakteria basah yang direndam dalam larutan kalium sorbat memberi kesan antimikrob yang lebih baik berbanding dengan selulosa yang dikeringkan terhadap *S. Typhi*. Contohnya, selulosa basah telah mencatatkan zon perencatan (17.5 mm) yang terbesar pada kepekatan 1000 mg/mL larutan kalium sorbat dengan masa rendaman 24 jam manakala dalam kepekatan dan masa rendaman yang sama, selulosa yang dikeringkan mencatatkan zon perencatan sebanyak 14 mm. Dari segi kepekatan, selulosa basah mula menunjukkan zon perencatan (5 mm) pada 250 mg/mL larutan kalium sorbat dengan

masa rendaman 6 jam seterusnya pada masa rendaman yang sama, zon perencatannya meningkat ke 12.5 dan 18 mm pada kepekatan 500 dan 1000 mg/mL, masing-masing. Peningkatan ini adalah secara signifikan ($p < 0.05$). Bagi selulosa kering pula, zon perencatan bermula pada kepekatan 500 mg/mL. Untuk aspek masa rendaman, selulosa basah telah menunjukkan zon perencatan bermula pada masa rendaman 0.5 jam dengan kepekatan 1000 mg/mL. Dalam kepekatan yang sama (1000 mg/mL), zon perencatan meningkat dari 11.5 mm (0.5 jam) ke 15.55 mm (3 jam), 12.5 mm (6 jam) dan mencatatkan maksimum pada 14 mm (24 jam). Selulosa

yang dikeringkan mencatatkan tiada zon perencatan pada masa rendaman 0.5 jam tetapi terdapat sebanyak 9 mm zon perencatan pada 3 jam rendaman seterusnya meningkat ke 12.5 mm dan 14 mm pada 6 jam dan 24 jam, masing-masing.

Kajian ini mendapati selulosa bakteria basah dan kering yang telah direndam dalam larutan natrium benzoat dan kalium sorbat menunjukkan ciri aktiviti anti-mikrob. Hal ini kerana selulosa bakteria mempunyai ciri penyerapan dan penjerapan yang tinggi. Menurut Karol (2021), ciri penyerapan dan penjerapan adalah disebabkan

oleh strukturnya yang berkeliatan dan mempunyai kumpulan hidroksril pada permukaan selulosa bakteria yang dapat mengikat molekul agen anti-mikrob. Kepekatan anti-mikrob dalam zon perencatan berkait rapat dengan kandungan agen anti-mikrob yang diserap oleh selulosa bakteria. Rajah 5 menunjukkan berat sebenar agen anti-mikrob (natrium benzoat/kalium sorbat) yang diserap oleh selulosa bakteria dalam keadaan basah. Dengan mengetahui kadar penyerapannya, kepekatan sebenar agen anti-mikrob yang diserap boleh ditentukan.



RAJAH 5. Berat agen anti-mikrob yang diserap oleh selulosa bakteria pada masa rendaman dan kepekatan larutan anti-mikrob yang berbeza

Selulosa bakteria adalah biopolimer yang mempunyai struktur rangkaian yang baik, kawasan permukaannya yang besar dan keliangan yang tinggi. Molekul daripada agen antimikrob boleh dijerapkan dengan mudah oleh ikatan hidrogen. Selulosa bakteria yang basah mempunyai aktiviti anti-mikrob yang tinggi berbanding dengan selulosa bakteria kering kerana agen anti-mikrob dalam keadaan basah adalah dalam keadaan aktif. Semasa proses pengeringan, molekul air telah tersejat dan agen anti-mikrob berada dalam keadaan kristal dalam selulosa bakteria. Dalam keadaan cecair, molekul agen anti-mikrob boleh mengalir daripada bahagian kepekatan tinggi ke bahagian kepekatan rendah melalui difusi (Rawdkuen et al. 2016). Pengaliran ini menyumbang kepada keberkesanan dalam menghalang pertumbuhan *S. Typhi*. Sekiranya agen antimikrob larut

dalam air, ia mudah terikat pada ikatan hidrogen selulosa bakteria dan dilepaskan daripada selulosa bakteria kepada media agar melalui difusi. Menurut Mendonc (1992), kalium sorbat mempunyai keterlarutan sebanyak 58.2% (w/v) dalam air untuk mengeluarkan asid sorbik menjadikannya sebagai anti-mikrob yang aktif. Selain daripada itu, keputusan resapan cakera dalam kajian ini juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti ketebalan media agar, kepekatan bakteria yang disebarkan dan kadar difusi antimikrob ke media agar (Libretext 2021).

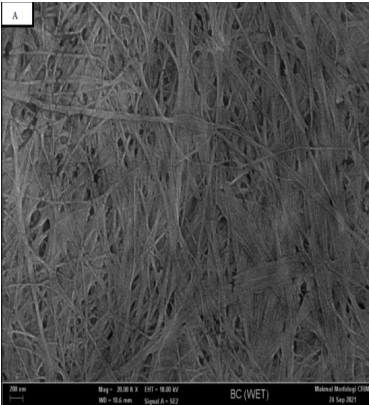
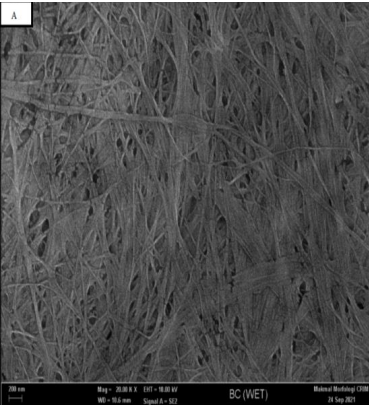
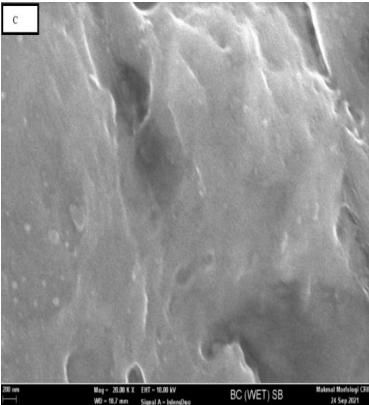
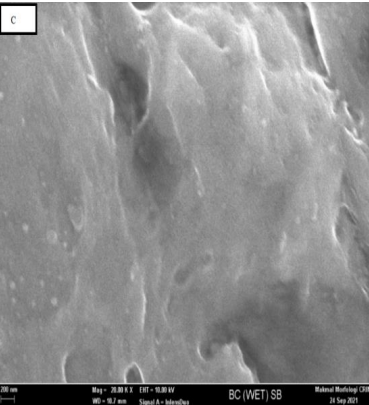
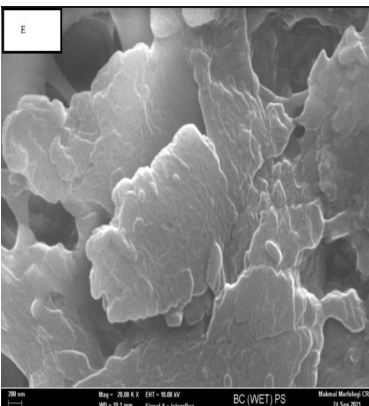
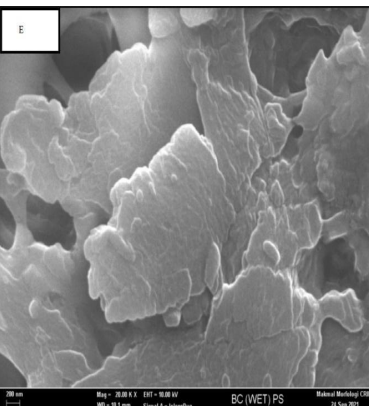
Menurut Stanjevic et al. (2009), kepekatan yang berkesan untuk natrium benzoat terhadap bakteria patogen adalah dalam julat 0.78 hingga 20 mg/mL manakala dalam julat 0.5-50 mg/mL terhadap kulat. Cabezas-Pizarro et al. (2017) mengatakan kepekatan minimum yang berkesan terhadap *S. Typhi* adalah 25

mg/mL. Bagi kalium sorbat pula, kepekatan optimumnya adalah dalam julat 0.2-20 mg/mL untuk bakteria; 0.5-50 mg/mL untuk kulat (Stanjevic et al. 2009). Kajiannya menunjukkan 10 mg/mL kepekatan kalium sorbat dapat menghalang bakteria seperti *Bacillus* sp. dan *Staphylococcus* tetapi kesan terhadap *S. Typhi* tidak dikaji. Berdasarkan Peraturan-Peraturan Makanan 1985 (2020), had maksimum bagi natrium benzoat dalam makanan adalah antara 350 mg/kg hingga 2000 mg/kg bergantung kepada jenis makanan manakala bagi kalium sorbat, had maksimum yang boleh digunakan dalam makanan adalah antara 350 mg/kg ke 1000 mg/

kg bergantung kepada jenis makanan. Hasil kajian ini menunjukkan selulosa bakteria berpotensi digunakan sebagai pembungkusan aktif dalam menghalang pencemaran dan kerosakan dalam produk makanan.

CIRI MORFOLOGI PERMUKAAN SELULOSA BAKTERIA
 Pencirian morfologi bagi permukaan selulosa bakteria kering dan basah selepas rendaman agen antimikrob (natrium benzoat dan kalium sorbat) telah dijalankan menggunakan FESEM. Jadual 5 menunjukkan mikrograf permukaan selulosa bakteria dengan penambahan agen antimikrob pada 20 kali pembesaran.

JADUAL 5. Mikrograf FESEM untuk permukaan selulosa bakteria kering dan basah pada pada pembesaran 20Kx

Agen antimikrob	Selulosa basah	Selulosa kering
Tiada		
Agen natrium benzoat		
Agent kalium sorbat		

Berdasarkan imej mikrogram FESEM, struktur selulosa bakteria kering boleh dilihat dengan jelas berbanding dengan selulosa bakteria basah. Dalam pemerhatian, selulosa bakteria berbentuk tiga dimensi dan mempunyai ribuan riben selulosa yang halus yang dipanggil fibril (Halib et al. 2012; Rahman et al. 2019). Fibril selulosa bersilang antara satu sama lain, membentuk banyak lapisan dan tersusun secara rawak. Selain itu, struktur berpori boleh dilihat lebih jelas dalam bakteria selulosa kering. Molekul air mempunyai ketegangan permukaan yang kuat, proses pengeringan mengakibatkan susunan mikrofibril menjadi padat. Ini adalah kerana apabila selulosa bakteria dalam keadaan basah, fibril selulosa terikat dengan molekul air melalui ikatan hidrogen. Apabila air molekul disingkirkan, ikatan hidrogen antara air molekul dan selulosa digantikan kepada ikatan hidrogen antara fibril selulosa (Khan et al. 2015). Dalam selulosa bakteria basah pula, strukturnya tidak jelas, berbentuk gel yang putih. Ini mungkin disebabkan oleh struktur fibril selulosa bakteria mengembang selepas menyerap agen antimikrob.

Menurut Gao et al. (2020) selulosa bakteria dihasilkan melalui fermentasi statik menunjukkan struktur kekristalan yang tinggi, menyebabkan kekuatan fibril selulosa yang lebih tinggi dan lebih sesuai sebagai pembungkusan makanan. Selain itu, struktur yang berpori membolehkannya menyerap bahan aktif yang ditambah padanya, justeru dapat meningkatkan fungsi selulosa bakteria sebagai pembungkusan aktif (Rahman et al. 2019).

Selain itu, selulosa bakteria yang direndam dalam larutan kalium sorbat menunjukkan struktur yang berbentuk lengkung. Imej yang diperoleh dalam kajian ini hampir sama dengan permukaan membran selulosa bakteria yang ditambahkan dengan nisin seperti yang dilaporkan oleh Gedarawatte et al. (2021). Beliau menjelaskan bahawa selulosa bakteria membengkak (*agglomeration*) disebabkan oleh tindak balas kimia antara cas negatif pada permukaan selulosa bakteria dan cas positif pada molekul nisin. Dalam kajian ini pula, molekul sorbat adalah cas positif yang boleh menyebabkan tindak balas kimia tersebut berlaku. Limjaroen et al. (2003) melaporkan bahawa selulosa bakteria yang ditambahkan dengan kalium sorbat mendapat keporosan besar (diedarkan secara meluas) pada permukaan selulosa bakteria.

KESIMPULAN

Kajian ini menunjukkan bahawa minuman manis komersial yang telah melepasi tarikh luput berpotensi

untuk digunakan sebagai substrat fermentasi bagi menghasilkan selulosa bakteria. Hari optimum untuk penghasilan selulosa bakteria adalah pada hari ke-10 dengan penghasilan selulosa sebanyak 122.06 g/L (berat basah). Selulosa bakteria juga terbukti mampu menyerap agen antimikrob natrium benzoat dan kalium sorbat dan dapat menghalang pertumbuhan *S. Typhi* dalam keadaan basah dan kering menunjukkan potensi selulosa bakteria sebagai pembungkus aktif. Walau bagaimanapun, faktor seperti masa rendaman dan kepekatan agen antimikrob mempengaruhi kadar resapan agen antimikrob di dalam selulosa bakteria. Justeru, kajian tentang mekanisme peresapan agen antimikrob dicadangkan untuk penghasilan pembungkus aktifa yang lebih baik pada masa akan datang.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini ditaja oleh geran FRGS/1/2020/WAB04/UKM/02/5. Penulis juga ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Jabatan Sains Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia yang menyediakan kemudahan penyelidikan.

RUJUKAN

- Abdulkhani, A., Hojati Marvast, E., Ashori, A., Hamzeh, Y. & Karimi, A.N. 2013. Preparation of cellulose/polyvinyl alcohol biocomposite films using 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 379-386.
- Afiqah, A. & Aqilah, N. 2020. Potensi selulosa bakteria sebagai pembungkusan makanan lestari. Ijazah Sarjana Sains Muda, Tesis, Fakulti Sains dan Teknologi Universiti Kebangsaan Malaysia (Tidak diterbitkan).
- Amin, M.C.I.M., Abadi, A.G., Ahmad, N., Katas, H. & Jamal, J.A. 2012. Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: Physicochemical, thermal and drug release properties. *Sains Malaysiana* 41(5): 561-568.
- Augusto, A.G. & Oliveira, M. 2017. Safety and quality of antimicrobial packaging applied to seafood. *MOJ Food Processing & Technology* 4(1): 00079.
- Aswini, K., Gopal, N.O. & Sivakumar, U. 2020. Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology* 20: 46. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00639-6>
- Azeredo, H.M.C., Barud, H., Farinas, C.S., Vasconcellos, V.M. & Claro, A.M. 2019. Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>
- Betlej, I., Zakaria, S., Krajewski, K.J. & Boruszewski, P. 2021. Bacterial cellulose - Properties and its potential application. *Sains Malaysiana* 50(2): 493-505.

- Cabezas-Pizarro, J., Redondo-Solano, M., Umaña-Gamboa, C. & Arias-Echandi, M.L. 2017. Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common food borne pathogens and spoilage-associated bacteria. *Revista Argentina de Microbiología* 50(1): 56-61.
- 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.
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. & Singhal, R.S. 2009. Microbial cellulose: Fermentative production and application. *Food Technology and Biotechnology* 47(2): 107-124.
- Daud, N., Sarbini, S.R., Babji, A.S., Mohamad Yusop, S. & Lim, S.J. 2019. Characterization of edible swiftlet's nest as a prebiotic ingredient using a simulated colon model. *Ann. Microbiol.* 69: 1235-1246.
- Dirpan, A., Kamaruddin, I., Syarifuddin, A., Zainal, Rahman, A.N.F., Hafidzah, Latief, R. & Prashti, K.I. 2019. Characteristics of bacterial cellulose derived from two nitrogen sources: Ammonium sulphate and yeast extract as an indicator of smart packaging on fresh meat. The 3rd International Symposium on Agricultural and Biosystem Engineering. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 355(1): 012040. DOI:10.1088/1755-1315/355/1/012040
- Elfari, M., Ha, S., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Hermann, U., Sahn, H. & Görisch, H. 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost qualitatively to 5 keto-d gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 668-674.
- Fabiana, F. 2021. Penghasilan selulosa bakteria daripada munuman cordial yang tamat tempoh dan potensi penggunaannya sebagai gel selulosa anti-pemerangan. Ijazah Sarjana Sains, Tesis, Fakulti Sains dan Teknologi Universiti Kebangsaan Malaysia (Tidak diterbitkan).
- Gao, H., Sun, Q., Han, Z., Li, J., Liao, B., Lulu, H. & Jin, M. 2020. Comparison of bacterial nanocellulose produced by different strains under static and agitated culture conditions. *Carbohydrate Polymers* 227: 115323.
- Gedarawatte, S., Ravensdale, J., Al-Salami, H., Dykes, G.A. & Coorey, R. 2021. Antimicrobial efficacy of nisin-loaded bacterial cellulose nanocrystals against selected meat spoilage lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 251: 117096.
- Halib, N., Cairul, M. & Ahmad, I. 2012. Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysia* 41(2): 205-211.
- Khalid, A., Ullah, H., Ul-Islam, M., Khan, R., Khan, S., Ahmad, F., Khan, T. & Wahid, F. 2017. Bacterial cellulose-TiO₂ nanocomposites promote healing and tissue regeneration in burn mice model. *Royal Society of Chemistry* 75: 47662-47668.
- Karol, K. 2021. *Water and Cellulose: Adsorption and Diffusion of Water in the Pores of Amorphous Cellulose*. <http://www.physicasolutions.com/projects/cellulose.html#:~:text=The%20adsorption%20of%20water%20in%20hydrophilic%20polymers%20such,adsorbed%20attracted%20by%20strong%20energy%20of%20hydrogen%20bonds>. Diakses pada 7 September 2021.
- Khan, S., Ul-Islam, M., Khattak, W., Ullah, M. & Park, J. 2015. Bacterial cellulose-poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) composites for optoelectronic applications. *Carbohydrate Polymers* 127: 86-93.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y. & Nakamura, Y. 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers* 76(2): 333-335.
- Kushairi, A. 2019. Food for thought. *New Straits Times*. <https://www.nst.com.my/opinion/columnists/2018/08/404704/food-thought>. Diakses pada 8 Desember 2020.
- Land Portal, 2018. *Waste Water Management - The Role of Industries*. Land Portal Foundation <https://landportal.org/news/2017/03/waste-water-management-%E2%80%93role-industries>. Diakses pada 22 November 2020.
- Lavasani, P.S., Motevaseli, E., Sanikhani, N.S. & Modarressi, M.H. 2019. *Komagataeibacter xylinus* as a novel probiotic candidate with high glucose conversion rate properties. *Heliyon* 5(4): e01571.
- Lee, K.Y., Buldum, G., Mantalaris, A. & Bismarck, A. 2014. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience* 14(1): 10-32.
- Lestari, P., Elfrida, N., Suryani, A. & Suryadi, Y. 2014. Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using agro-waste. *Journal of Biological Sciences* 7(1): 75-80.
- LibreText. 2021. Testing the effectiveness of antimicrobial chemicals and drugs. *Biology LibreTexts*. Diakses pada 2 September 2021.
- Limjaroen, P., Ryser, E., Lockhart, H. & Harte, B. 2003. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 19(2): 95-109.
- Mendonc, A.F. 1992. Mechanism of inhibitory action of potassium sorbate in *Escherichia coli*. Retrospective Theses and Dissertations. Iowa State University (Tidak diterbitkan).
- Peraturan-Peraturan Makanan 1985. 2020. *Food Act 1983 (Act 281) & Regulations*. Malaysia: International Law Book Services.
- Pourramezan, Z. & Ghezelbash, G.R. 2009. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. *Journal of Microbiology* 25(7): 126-132.
- Rahman, N.A., Kamarudin, N.S., Esaa, F., Kalila, M.S. & Kamarudin, S.K. 2019. Bacterial cellulose as a potential hard gelatin capsule. *Jurnal Kejuruteraan SI* 2(1): 151-156.

- Rawdkuen, S., Punbusayakul, N. & Lee, D.S. 2016. Antimicrobial packaging for meat products. In *Antimicrobial Food Packaging*, edited by Barros-Velázquez, J. Boca Raton: Academic Press. pp. 229-241.
- Richards, H., Priscilla, B. & Emmanuel, I. 2012. Metal nanoparticle modified polysulfone membranes for use in wastewater treatment: A critical review. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology* 2(3): 183-193.
- Shrapnel, W.S. & Butcher, B.E. 2020. Sales of sugar-sweetened beverages in Australia: A trend analysis from 1997 to 2018. *Nutrients* 12(4): 1016.
- Shyam, S., Misra, S., Zain, M.H., Chiong, H.Z. & Don, R. 2019. Developments in the implementation of sugar-sweetened beverage tax in Malaysia - A narrative review. *leJSME* 13(2): 12-22.
- Sofia, M., Amarra, R., Khor, G.L. & Pauline, C. 2016. Intake of added sugar in Malaysia: A review. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 25(2): 227-240.
- Stanjevic, D., Comic, L., Stefanovic, O. & Solujic, S. 2009. Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action *in vitro*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 15(4): 307-311.
- Swingler, S., Gibson, H., Gupta, A. & Kowalczyk, M. 2021. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. *Polymers* 13(3): 412.
- Ul-Islam, M., Khan, T. & Park, J.K. 2012. Nanoreinforced bacterial cellulose/montmorillonite composites for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 89: 1189-1197.
- Zahan, K.A., Azizul, N.M., Mustapha, M., Tong, W.Y., Abdul Rahman, M.S. & Sahuri, I.S. 2020. Application of bacterial cellulose film as a biodegradable and antimicrobial packaging material. *Materials Today: Proceedings* 31(1): 83-88.
- Zahan, K.A., Pa'e, N. & Muhamad, I.I. 2016. Monitoring the effect of pH on bacterial cellulose production and *Acetobacter xylinum* 0416 growth in a rotary discs reactor. *Arabian Journal for Science and Engineering* 40(7): 1881-1885.
- Żywicka, A., Ciecholewska-juško, D., Drozd, R., Rakoczy, R., Konopacki, M., Kordas, M., Junka, A., Migdał, P. & Fijałkowski, K. 2021. Preparation of *Komagataeibacter xylinus* inoculum for bacterial cellulose biosynthesis using magnetically assisted external-loop airlift bioreactor. *Polymers* 13(22): 1-17.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: nurulaqilah@ukm.edu.my