

## Kajian Teknik Kultivasi dan Pengaruh Luas Permukaan Media Tumbuh pada Produksi Selulosa Menggunakan Bakteri Isolat Lokal

### *Study on the Cultivation Technique and the Effect of Surface Area of Growth Media to the Production of Cellulose by Indigenous Isolates*

ANI SURYANI<sup>1</sup>\*, ANDES ISMAYANA<sup>1</sup>, YENITA SUATRINA<sup>1</sup> & YU-RYANG PYUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Kotak Pos 1, Bogor 16610

<sup>2</sup>Bioproduct Research Center, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

RBP-52 and PD5 isolates were isolated from Indonesian fruits samples that contains glucose. RBP-52 isolate was obtained from coconut water (waste), collected from nata factory, and PD5 isolate was obtained from rotten coconut sample, collected from Parung. They were identified as *Acetobacter liquefaciens*. RBP-52 and PD5 isolate produced cellulose in static and shaking cultivation. Production of cellulose by RBP 52 and PD5 were optimized in static cultivation. Cellulose was found to be produced at the liquid surface in static cultivation. The rate of cellulose production depended proportionally on the surface area of the culture medium. The maximum production rate of cellulose was 2.78 g/l per 7 days (surface area 77.60 cm<sup>2</sup>) in the static cultivation.

Key words : Bacterial cellulose, static culture, shaken culture, RBP-52 and PD5 isolates, surface area

Selulosa merupakan homopolisakarida linear yang tidak bercabang, terdiri atas 10000 atau lebih unit D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Selulosa ialah senyawa seperti serabut, liat, tidak larut dalam air, dan ditemukan di dalam dinding sel pelindung tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan (Thenawijaya 1990).

Sumber selulosa terpenting digunakan dalam industri ialah kayu. Walaupun demikian, selulosa juga dapat dihasilkan dari fermentasi beberapa mikroorganisme.

Mikroorganisme penghasil selulosa terutama dari golongan *Acetobacter*. Selulosa yang dihasilkan oleh *Acetobacter* disebut selulosa bakteri. Molekul selulosa ini berikatan melalui ikatan hidrogen dan menghasilkan selulosa yang mumi tanpa komponen lignin sebagai pelindungnya. Analisis difraksi sinar-x dari selulosa bakteri menunjukkan tingginya kemampuan membentuk kristal dari molekul selulosa yang disebut selulosa I (selulosa murni). Diameter umumnya sekitar 0.1 mm, 300 kali lebih kecil daripada serat selulosa kayu, jaringan serat memiliki area yang luas, kapasitas pengikat air tinggi, resistensi tinggi, dan memiliki kekuatan tarik yang besar (Yoshino *et al.* 1996).

Mikroorganisme pembentuk selulosa didapat dari jenis buah-buahan yang banyak mengandung glukosa seperti

nenas, apel, anggur, pisang, dan kelapa yang mulai membusuk. Sumber lainnya ialah produk minuman hasil fermentasi yang mengandung glukosa seperti minuman buah dan bir (Swings 1980).

Sintesis selulosa dari glukosa oleh *Acetobacter xylinum* di dalam medium cair merupakan fungsi dari suplai oksigen. Peningkatan jumlah selulosa yang relatif cepat diduga terjadi sebagai akibat konsentrasi sel kultur yang terus berkembang di daerah permukaan yang teraerasi. Pada kultur yang tumbuh, suplai oksigen yang lebih banyak di permukaan akan merangsang peningkatan massa sel dan enzim pembentuk selulosa, akibatnya akan meningkatkan produksi selulosa (Hestrin & Schramm 1954a).

Luas permukaan media tumbuh yang berbeda dengan volume media tetap, akan berpengaruh terhadap produksi selulosa (Masaoka *et al.* 1993). Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme harus dapat memenuhi kebutuhan senyawa karbon, nitrogen, serta beberapa zat pertumbuhan seperti asam amino dan garam-garam mineral (Casida 1968).

Jenis gula, konsentrasi gula, sumber nitrogen, dan nilai pH media memberikan pengaruh terhadap produktivitas selulosa. Jenis gula yang memberikan produk paling tinggi ialah fruktosa diikuti oleh kombinasi fruktosa, glukosa, laktosa, dan sukrosa pada media yang mengandung sukrosa. Sumber nitrogen yang dapat digunakan ialah sumber nitrogen anorganik (amonium sulfat, amonium fosfat, dan kalium nitrat) dan sumber nitrogen organik (pepton, tripton,

\* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-621257,  
Fax. 62-251-621724, E-mail: cdsapib@indo.net.id

ekstrak khamir, dan urea) serta kombinasi antara kedua sumber nitrogen tersebut (Embuscado *et al.* 1994).

Kondisi kultivasi akan mempengaruhi produksi selulosa. Pada kultivasi diam (*static culture*) sintesis selulosa terjadi di permukaan (Masaoka *et al.* 1993). Kondisi pengoyangan menghasilkan pertumbuhan yang cepat untuk tipe mikroorganisme mutan yang memiliki daya tahan yang spesifik dalam membentuk selulosa (Hestrin & Schramm 1954 b).

Tujuan penelitian ini ialah untuk mendapatkan teknik kultivasi dan luas permukaan media tumbuh yang terbaik pada produksi selulosa menggunakan bakteri isolat lokal (RBP-52 dan PD5).

## BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah buah yang mulai membusuk (kelapa, kedondong, jeruk, nenas, alpukat, dan tomat).

**Isolasi Mikroorganisme Penghasil Selulosa.** Bagian buah yang mulai membusuk diambil, dicacah pada cawan petri menggunakan pisau. Sebanyak satu gram bahan tersebut diencerkan pada larutan bufer natrium fosfat. Ekstrak sampel dalam bufer diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media cair Hestrin dan Schramm (HS) yang ditambahkan antibiotik dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 30°C (Hestrin & Schramm 1954a,b).

Setelah inkubasi selama tujuh hari, dipilih sampel yang memperlihatkan terbentuknya pelikel selulosa di permukaan media cair sebagai indikasi adanya mikroorganisme penghasil selulosa. Pelikel tersebut diambil untuk inokulasi dan inkubasi pada media agar-agar untuk diidentifikasi lebih lanjut dengan metode pengenceran bertingkat.

**Produksi Selulosa Bakteri.** Sebanyak dua ose koloni bakteri diinokulasi ke media HS 100 ml dalam erlenmeyer 500 ml dan dipropagasi selama empat hari. Biakan diinokulasi ke dalam media HS dengan luas permukaan 25.97 cm<sup>2</sup>, 36.53 cm<sup>2</sup> dan 77.60 cm<sup>2</sup>, konsentrasi inokulum 10%, pH awal 5.00, volume 100 ml. Biakan diinkubasi secara diam dan tergoyang selama tujuh hari pada suhu ± 30°C. Selanjutnya produk diambil untuk dianalisis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Penghasil Selulosa Bakteri.** Mikroorganisme yang dikenal sebagai penghasil selulosa ialah genus *Acetobacter*. Mikroorganisme ini biasanya diisolasi dari jenis buah-buahan yang banyak mengandung gula. Yang *et al.* (1998) telah berhasil mengisolasi *Acetobacter* dengan cara memasukkan buah-buahan yang telah mulai membusuk dan air kelapa yang mulai asam ke dalam tabung reaksi yang berisi medium HS. *Acetobacter* tersebut ditumbuhkan pada medium yang banyak mengandung gula dan akan memecah ikatan glikosidik membentuk suatu polisakarida yang dikenal dengan istilah selulosa ekstraseluler. Pecahnya ikatan glikosidik

membentuk pelikel selulosa ini terjadi pada permukaan medium.

Pada penelitian ini isolasi dilakukan pada buah-buahan yang mulai membusuk dan air kelapa yang mulai asam, yang berasal dari berbagai daerah di Jawa barat. Buah-buahan yang diisolasi ialah kelapa, kedondong, jeruk, nenas, alpukat, dan tomat. Beberapa isolat yang diperoleh dari isolasi yang dilakukan ialah PD5 berasal dari daging buah kelapa (diperoleh dari daerah Parung), RBP-52 yang berasal dari limbah cair pabrik nata, dan RBP-34 yang berasal dari buah jeruk (diperoleh dari daerah Cipanas).

Berdasarkan identifikasi secara morfologi, ketiga isolat memiliki koloni berbentuk bulat (*kokus*), elevasi cembung, motil, dan gram negatif (Hadioetomo 1989). Koloni yang diamati mudah diangkat dengan menggunakan jarum ose karena konsistensinya yang menyerupai karet.

Uji identifikasi yang dilakukan terhadap ketiga isolat tersebut meliputi uji katalase, pewarnaan gram, uji motilitas, uji dehidroksiaseton dari gliserol, dan uji pertumbuhan pada medium Hoyer's, serta uji pertumbuhan pada medium cair. Uji katalase digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang bersangkutan mampu memproduksi katalase (enzim yang mampu memecah hidrogen peroksida). Uji motilitas dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya flagela pada sel. Uji dehidroksiaseton dari gliserol dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang dihasilkan termasuk genus *Acetobacter* atau tidak. Uji pertumbuhan pada medium Hoyer's dilakukan untuk membuktikan bakteri penghasil selulosa tidak dapat tumbuh pada medium tanpa glukosa. Komposisi dari media Hoyer's ini tanpa sakarida (seperti glukosa, sukrosa, dan fruktosa). Semua uji yang dilakukan di atas menunjukkan genus dari bakteri *Acetobacter*, sedangkan spesiesnya belum diketahui (Tabel 1).

Uji identifikasi lebih lanjut terhadap ketiga isolat lokal tersebut dilakukan bekerja sama dengan tim *Bioproducts Research Center* (BRC) dari Yonsei University, Korea Selatan, yang dilakukan dengan teknik kromatografi gas. Hasil yang diperoleh tersebut dibandingkan dengan *A. xylinum* (BRC 5). Hasil identifikasi ke-3 isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil identifikasi isolat lokal (PD5, RBP-52, dan RBP-34)

Uji (Breed <i>et al.</i> 1957)	PD5	RBP-52	RBP-34
Pewarnaan	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif
Pertumbuhan pada medium cair	pada permukaan	pada permukaan	pada permukaan
Motilitas	motil	motil	motil
Uji Biokimiawi:			
Uji katalase <sup>1</sup>	++	+++	+
Dihidroksiaseton dari gliserol <sup>2</sup>	+	+	+
Pertumbuhan pada media Hoyer's <sup>3</sup>	-	-	-

<sup>1</sup>terbentuk gelembung gas, <sup>2</sup>koloni warna merah muda, <sup>3</sup>tidak terbentuk pelikel.

Tabel 2. Identifikasi isolat lokal dengan teknik gas kromatografi

Isolat	Jenis
BRC 5	<i>Acetobacter xylinum</i>
PD5	<i>Acetobacter liquefaciens</i>
RBP-34	<i>Ancyllobacter aquaticus</i>
RBP-52	<i>Acetobacter liquefaciens</i>

### Produksi Selulosa oleh Isolat RBP-52 dan PD5.

Selulosa yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh banyak faktor. Penggunaan media sintesis yang cocok untuk pertumbuhan *Acetobacter liquefaciens*, pH awal, konsentrasi inokulum, dan volume media yang tepat akan menghasilkan selulosa yang tinggi. Selain itu pemilihan wadah kultivasi yang sesuai dapat meningkatkan perolehan selulosa. Mengingat *A. liquefaciens* merupakan bakteri aerobik maka pasokan oksigen ke media harus diperhatikan.

Pada proses produksi selulosa oleh isolat RBP-52 dan PD5 digunakan medium yang sama dengan tahap isolasi yaitu medium. Medium ini cukup efektif bagi bakteri *A. liquefaciens* untuk memproduksi selulosa. Hal ini disebabkan karena medium ini mengandung glukosa sebagai sumber karbon. Glukosa yang terdapat dalam media ini sebagian akan digunakan oleh bakteri untuk aktivitas metabolismenya dan sebagian lagi diuraikan menjadi suatu polisakarida yang berbentuk gel. Polisakarida inilah yang disebut nata.

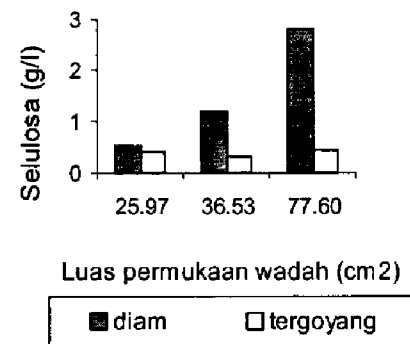
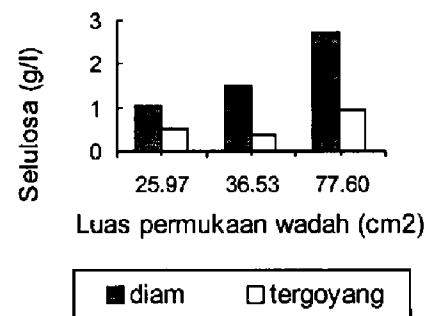
Pada penelitian ini volume media yang digunakan sama (100 ml), walaupun luas permukaan media tumbuh yang digunakan berbeda, sehingga ketinggian dari media tersebut juga berbeda. Hal ini didasarkan pada hasil penelitian Masaoka *et al.* (1993) yang menjelaskan bahwa volume media tidak mempengaruhi jumlah selulosa yang dihasilkan, demikian juga tingkat kedalaman wadah tidak mempengaruhi produksi selulosa. Luas permukaan media yang digunakan ialah 25.97 cm<sup>2</sup>, 36.53 cm<sup>2</sup> dan 77.60 cm<sup>2</sup>. Nilai pH awal yang digunakan ialah 5.00 dan konsentrasi inokulum ialah 10%. Menurut Riyanto (1997) dengan pH dan konsentrasi inokulum seperti di atas terbukti bahwa bakteri dapat memproduksi selulosa dengan baik.

Pembentukan pelikel pada permukaan medium cair dapat dilihat setelah tujuh hari waktu inkubasi. Pada saat ini akan terjadi penjernihan pada cairan yang terdapat di bawah pelikel. Jaringan halus dan transparan yang terbentuk di permukaan membawa sebagian bakteri yang terperangkap di dalamnya. Gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan oleh bakteri akan menyebabkan pengapungan sehingga pelikel terdorong ke permukaan.

Pemanenan dilakukan setelah tujuh hari waktu inkubasi sehingga telah terbentuk lapisan yang sangat kompak dan tebal (pelikel) yang langsung berhubungan dengan lapisan udara. Pelikel yang dihasilkan ini berupa selulosa kasar. Jika digoyang lapisan ini akan tenggelam, namun kemungkinan masih bisa membentuk lapisan baru selama persediaan nutrisi pada medium masih mencukupi.

Produk akhir selulosa yang dikehendaki berupa selulosa kering. Sebelum diperoleh selulosa kering, selulosa kasar harus dimurnikan terlebih dahulu karena selulosa kasar masih banyak mengandung massa sel dan sisa-sisa media. Pada pemurnian tahap awal selulosa basah direndam selama 24 jam dalam larutan NaOH 1% yang tujuannya untuk melarutkan massa sel dan sisa-sisa media yang masih terdapat dalam pelikel. Setelah perendaman selama 24 jam larutan NaOH berubah menjadi kuning yang menandakan telah terjadi difusi media dari lapisan selulosa ke dalam larutan alkali (Yoshino *et al.* 1996). Selulosa yang telah direndam dengan alkali selanjutnya dinetralkan dengan perendaman dalam larutan asam asetat 1% selama 24 jam. Kemudian selulosa direndam dengan air destilata selama 24 jam dan sebelum dilakukan pengeringan (suhu 70°C - 80°C) untuk mencapai berat konstan, pelikel dicuci lagi dengan air sehingga selulosa yang dihasilkan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi.

Berdasarkan hasil penelitian isolat RBP-52 dan PD5 mampu memproduksi selulosa pada kedua teknik kultivasi (kultivasi diam dan tergoyang). Produksi selulosa pada kultivasi diam dan tergoyang dengan tiga luas permukaan media tumbuh yang berbeda dapat dilihat dari histogram pada Gambar 1.



Gambar 1. Histogram hubungan teknik kultivasi dengan luas permukaan wadah terhadap perolehan selulosa: isolat RBP-52 (atas) dan isolat PD5 (bawah).

Histogram di atas memperlihatkan bahwa selulosa yang dihasilkan oleh kedua isolat (PD5 dan RBP-52) tidak jauh berbeda. Hal ini menandakan bahwa kemampuan kedua isolat untuk memproduksi selulosa hampir sama.

Berdasarkan analisis keragaman ( $\alpha$  0.01 dan  $\alpha$  0.05) yang dilakukan, diketahui bahwa teknik kultivasi berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa. Produksi selulosa tertinggi pada kultivasi diam dan tergoyang dihasilkan oleh luas permukaan 77.60 cm<sup>2</sup> yaitu sebanyak 2.73 g/l dan 0.94 g/l untuk isolat RBP-52 serta 2.78 g/l dan 0.45 g/l untuk isolat PD5. Pada semua ukuran luas permukaan wadah kultivasi diam menghasilkan selulosa yang lebih besar dibandingkan kultivasi tergoyang.

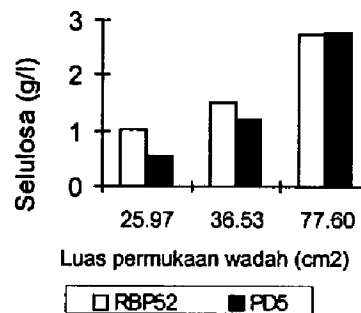
Berdasarkan analisis keragaman ( $\alpha$  0.01 dan  $\alpha$  0.05) yang dilakukan terhadap isolat PD5 diketahui bahwa faktor teknik kultivasi, luas permukaan wadah, dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa. Hal ini berarti antara kondisi kultivasi dengan luas permukaan wadah tidak saling bebas, satu sama lain berpengaruh.

Uji *Duncan's Multiple Range Test* terhadap isolat PD5 menunjukkan bahwa interaksi antara kondisi diam dengan luas permukaan 77.60 cm<sup>2</sup> berbeda nyata terhadap interaksi kultivasi diam dengan luas permukaan 36.53 cm<sup>2</sup> dan 25.97 cm<sup>2</sup>. Jika dibandingkan interaksi antara kondisi tergoyang dengan masing-masing luas permukaan (77.60 cm<sup>2</sup>, 36.53 cm<sup>2</sup>, 25.97 cm<sup>2</sup>), ketiga interaksi yang terjadi tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa. Pada kultivasi diam produksi selulosa ditentukan oleh tekanan oksigen pada permukaan. Pada luas permukaan yang lebih besar tekanan oksigennya juga besar sehingga sangat berpengaruh pada perolehan selulosa. Pada kultivasi tergoyang adanya pengadukan menyebabkan tekanan oksigen yang terdapat pada permukaan tidak tetap (berubah-ubah). Oleh karena itu luas permukaan media tumbuh tidak berpengaruh terhadap perolehan selulosa pada kultivasi tergoyang.

**Produksi Selulosa pada Kultivasi Diam.** Proses kultivasi ini terjadi pada permukaan media (*surface fermentation*). Sel-sel kultur *A. liquefaciens* akan menguraikan sebagian glukosa yang ada pada media sehingga pada permukaan media tumbuh akan terbentuk jaringan selulosa. Jaringan ini akan diangkat ke permukaan oleh karbondioksida yang dihasilkan oleh metabolisme sel.

Berdasarkan uji *Duncan's Multiple Range Test* luas permukaan media tumbuh (wadah) berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa pada kondisi kultivasi diam. Selulosa yang dihasilkan oleh isolat PD5 pada kultivasi diam ialah 0.54 g/l (luas permukaan 25.97 cm<sup>2</sup>), 1.19 g/l (luas permukaan 36.53 cm<sup>2</sup>), dan 2.78 g/l (luas permukaan 77.60 cm<sup>2</sup>). Sedangkan untuk isolat RBP-52 perolehan selulosa pada masing-masing luas permukaan ialah 1.02 g/l, 1.55 g/l, dan 2.73 g/l.

Gambar 2 memperlihatkan bahwa produksi selulosa meningkat dengan semakin luasnya permukaan media tumbuh. Dengan kata lain produksi selulosa berbanding secara proposional dengan luas permukaan media tumbuh.



Gambar 2. Produksi selulosa pada kultivasi diam.

Pada kondisi kultivasi diam selulosa yang dihasilkan terdapat pada permukaan. Produksi selulosa ini ditentukan oleh pasokan oksigen. Pasokan oksigen yang tinggi akan mendukung kehidupan *A. liquefaciens*, mengingat bakteri ini bersifat aerobik. Semakin luas permukaan media tumbuh yang digunakan maka pasokan oksigen pun semakin besar. Banyaknya pasokan oksigen ini akan meningkatkan aktivitas bakteri dalam sintesis selulosa dari glukosa sehingga selulosa yang dihasilkan meningkat. Banyaknya persediaan oksigen pada lapisan permukaan dalam kultur yang digunakan untuk pertumbuhan akan merangsang peningkatan massa sel dan enzim pembentuk selulosa dan sebagai akibatnya akan meningkatkan produksi selulosa. Pada penelitian ini pasokan oksigen lebih banyak pada wadah yang luasnya 77.60 cm<sup>2</sup> daripada luas permukaan 25.97 cm<sup>2</sup> dan 36.53 cm<sup>2</sup> sehingga selulosa yang dihasilkan oleh wadah yang luasnya 77.60 lebih besar dibandingkan dengan yang lain.

Nilai pH awal sangat mempengaruhi jumlah selulosa yang dihasilkan. Menurut Masaoka *et al.* (1993) pH optimum untuk produksi selulosa ialah 4.00 sampai 6.00 dan hasil penelitian Riyanto (1997) melaporkan nilai pH yang baik untuk produksi selulosa ialah 5.00. Selama proses kultivasi akan terjadi penurunan pH. Berdasarkan hasil pengamatan secara umum terlihat bahwa terjadi penurunan pH media untuk semua teknik kultivasi. Terjadinya penurunan pH selama kultivasi ini disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik selama kultivasi. Asam-asam organik yang terbentuk merupakan hasil metabolisme glukosa menjadi asam glukonat oleh bakteri *A. liquefaciens*. Asam glukonat akan menyebabkan keasaman media meningkat sehingga terjadi penurunan pH media akhir kultivasi. Dari hasil pengukuran pH akhir yang dilakukan diketahui bahwa nilai pH akhir media sisa kultivasi berkisar antara 3.41 sampai 4.09.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH akhir media lebih rendah dari pH awal media. Hal ini sesuai dengan penelitian Masaoka *et al.* (1993) yang menjelaskan bahwa bakteri akan mengoksidasi sebagian glukosa yang ditambahkan pada media menjadi asam glukonat, menurunkan pH media dan menghambat pembentukan produk.

Tetapi penelitian Masaoka *et al.* (1993) menyanggah pendapat Shcramm tersebut, yaitu asam glukonat yang terbentuk selama proses kultivasi tidak mempengaruhi produksi selulosa.

Berdasarkan analisis keragaman ( $\alpha$  0.05) untuk isolat PD5 diketahui bahwa interaksi antara teknik kultivasi dengan luas permukaan wadah berpengaruh nyata terhadap pH akhir media sisa kultivasi, sedangkan untuk isolat RBP-52 interaksi antara keduanya tidak berpengaruh nyata terhadap pH akhir media. Hal ini menandakan bahwa untuk isolat PD5 teknik kultivasi dan luas permukaan wadah tidak saling bebas, satu sama lain berpengaruh.

Uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* terhadap isolat PD5 menunjukkan bahwa interaksi antara teknik kultivasi diam dengan luas permukaan media tumbuh 77.60 cm<sup>2</sup> berpengaruh nyata terhadap pH akhir pada luas permukaan media tumbuh 25.97 cm<sup>2</sup> dan 36.53 cm<sup>2</sup>. Nilai pH akhir yang dihasilkan oleh luas permukaan 25.97 cm<sup>2</sup>, 36.53 cm<sup>2</sup> dan 77.60 cm<sup>2</sup>, masing-masing ialah 3.72, 3.68, dan 3.95. Pada isolat RBP-52 pH akhir untuk masing-masing luas permukaan ialah 3.41, 3.43, dan 4.09.

Glukosa yang terdapat pada media akan digunakan oleh bakteri *A. liquefaciens* sebagian untuk sintesis selulosa dan sebagian untuk aktivitas metabolismenya, seperti metabolisme glukosa menjadi asam glukonat. Dengan sendirinya hal ini akan mempengaruhi perolehan selulosa dan pH akhir media sisa kultivasi.

Nilai pH akhir ini sangat berkaitan dengan perolehan selulosa. Sehubungan dengan nilai pH akhir media sisa kultivasi pada kondisi diam terlihat bahwa semakin luas permukaan media tumbuh, pH akhir juga semakin meningkat, namun tetap lebih rendah dari nilai pH awal. Hal ini disebabkan karena pada luas permukaan media tumbuh yang lebih besar glukosa yang ada pada media lebih banyak digunakan untuk sintesis selulosa daripada untuk metabolisme glukosa menjadi asam glukonat sehingga keasaman media menurun (pH semakin naik). Sebaliknya pada luas permukaan yang lebih kecil selulosa yang dihasilkan juga lebih kecil yang berarti glukosa banyak digunakan untuk produksi asam (asam yang terbentuk kemungkinan ialah asam laktat) sehingga meningkatkan keasaman media.

Selain pengukuran nilai pH akhir, juga dilakukan pengukuran kadar gula sisa dengan menggunakan metode DNS pada panjang gelombang sebesar 550 nm. Adapun tujuan pengukuran kadar gula sisa ini ialah untuk mengetahui berapa banyak glukosa yang terakumulasi pada media sisa kultivasi.

Berdasarkan analisis keragaman ( $\alpha$  0.05) luas permukaan berpengaruh nyata terhadap kadar gula sisa yang dihasilkan oleh isolat PD5. Kadar gula sisa yang dihasilkan oleh isolat PD5 untuk luas permukaan 25.97 cm<sup>2</sup>, 36.53 cm<sup>2</sup>, dan 77.60 cm<sup>2</sup> ialah 3.66 mg/ml, 3.20 mg/ml, dan 1.82 mg/ml. Terjadinya penurunan nilai kadar gula sisa disebabkan karena pada luas permukaan yang lebih besar glukosa banyak digunakan untuk sintesis selulosa (perolehan selulosa besar) sehingga glukosa yang tertinggal dalam

media menjadi sedikit. Pada luas permukaan yang kecil hanya sedikit glukosa yang terurai menjadi selulosa sehingga glukosa yang tertinggal dalam media masih cukup banyak. Hubungan antara kadar gula sisa dan pH akhir media dapat dilihat pada Gambar 3.

Nilai kadar gula sisa pada media sangat tergantung pada selulosa yang dihasilkan dan pH akhir media sisa kultivasi. Dari Gambar 3 terlihat bahwa semakin luas permukaan media tumbuh kadar gula sisa semakin menurun dan nilai pH akhir lebih tinggi.

#### Produksi Selulosa pada Kultivasi Tergoyang.

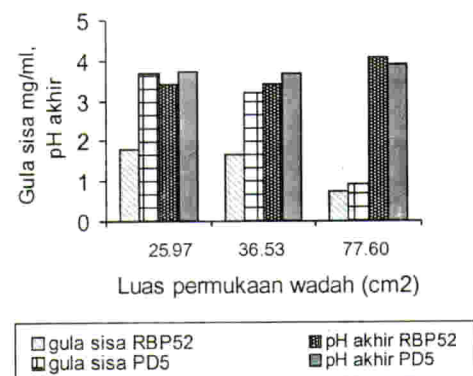
Kultivasi tergoyang merupakan kondisi kultivasi yang disertai dengan proses penggoyangan. Pada proses ini bakteri *Acetobacter* akan tumbuh dengan cepat, tidak membentuk pelikel, tetapi membentuk suatu bola selulosa. Pada penelitian ini proses penggoyangan dilakukan dengan kecepatan 150 rpm.

Selulosa yang dihasilkan pada kondisi tergoyang berbentuk bola-bola yang kemudian bergabung. Di samping itu selulosa yang terbentuk pada kondisi tergoyang tidak padat. Hal ini disebabkan karena adanya penggoyangan yang menghalangi pembentukan pelikel dari selulosa yang terbentuk.

Selulosa yang dihasilkan oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada kondisi tergoyang lebih kecil dibandingkan dengan kondisi diam. Hal ini berarti bahwa kondisi kultivasi tergoyang tidak cocok untuk isolat PD5 dan RBP-52 dalam memproduksi selulosa.

Pada penelitian ini umumnya cairan kultur akhir berwarna kuning keruh sehingga hanya sedikit perolehan selulosa yang teramati. Cairan kultur akhir kultivasi dapat digolongkan menjadi dua tipe. Tipe pertama ialah cairan kultur yang dihasilkan keruh oleh sel, sebenarnya hanya sedikit massa sel yang dapat diamati di dalam cairan ini. Tipe kedua ialah cairan kultur akhir jernih dan terdapat massa selulosa padat di dalamnya (Toyosaki *et al.* 1995).

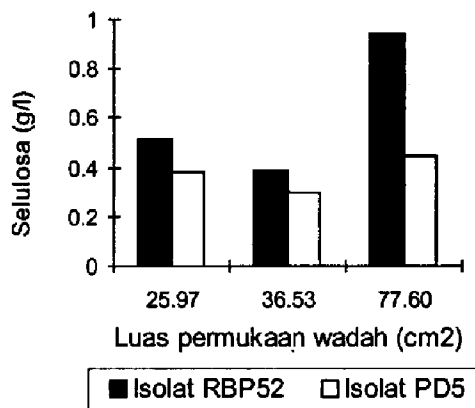
Analisis keragaman ( $\alpha$  0.01 dan  $\alpha$  0.05) menunjukkan bahwa ada interaksi antara luas permukaan wadah dengan kondisi kultivasi. Berdasarkan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* terlihat bahwa masing-masing interaksi antara



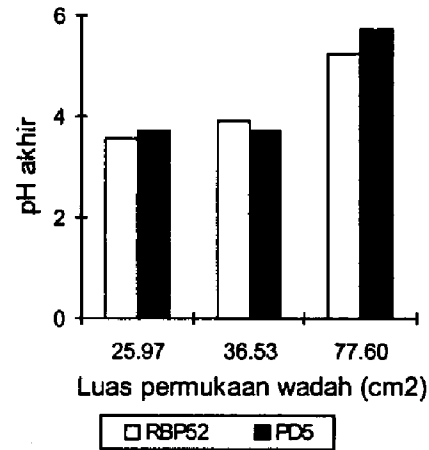
Gambar 3. Hubungan kadar gula sisa dan pH akhir pada kultivasi diam oleh isolat PD5 dan RBP-52.

kondisi tergoyang dengan ketiga luas permukaan, pengaruhnya tidak berbeda nyata terhadap perolehan selulosa. Hal ini menandakan bahwa pada kondisi tergoyang, luas permukaan tidak berpengaruh terhadap selulosa yang dihasilkan. Hal ini dapat dilihat dari histogram hubungan luas permukaan dengan perolehan selulosa (Gambar 4), berfluktuasi pada ketiga luas permukaan media tumbuh tersebut. Menurut Hestrin & Schramm (1954b) untuk kondisi tergoyang produksi selulosa dipengaruhi oleh volume media, tidak oleh luas permukaan.

Pada pengamatan nilai pH terlihat bahwa pH akhir lebih kecil dibandingkan dengan pH media awal kecuali untuk luas permukaan 77.60 cm<sup>2</sup>. Adanya penurunan pH ini menandakan bahwa selama proses kultivasi terjadi konversi glukosa menjadi asam glukonat sehingga keasaman media meningkat. Pada luas permukaan 77.60 cm<sup>2</sup> pH akhir lebih besar daripada nilai pH awal. Terjadinya kenaikan pH ini disebabkan karena adanya ion-ion yang terurai dari bahan yang terkandung dalam media yang bersifat basa, seperti K<sup>+</sup> dan NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Ekstrak khamir dan bakto pepton merupakan sumber nitrogen dari media HS yang mengandung ion yang bersifat basa (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), dan jika terurai akan menyebabkan kenaikan pH media sisa kultivasi.



Gambar 4. Histogram produksi selulosa pada kultivasi tergoyang.



Gambar 5. Nilai pH akhir pada kultivasi tergoyang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Breed, R.S., E.G.D. Murray & N.R. Smith. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Ke-7. London: Williams Wilkins.
- Casida, L.E. 1968. *Industries Microbiology*. New York: John Wiley.
- Embuscado, M.E., J.S. Marks & J.N. de Miller. 1994. Bacterial cellulose I: factor affecting the production of cellulose by *A. xylinum*. *Food Hydrocolloids* 10:407-418.
- Hadioetomo, R.S. 1989. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Hestrin, S. & M. Schramm. 1954a. Synthetic of cellulose by *Acetobacter xylinum* preparation of freeze dried cell capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* 58:345-352.
- Hestrin, S. & M. Schramm. 1954b. Factors affecting production of cellulose at the air liquid interface of culture of *A. xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 11:123-129.
- Masaoka, S., T. Ohe & N. Sakota. 1993. Production of cellulose by *A. xylinum*. *J. Ferment. Bioeng* 75:18-22.
- Riyanto. 1997. Kajian kultivasi diam, tergoyang dan kombinasinya untuk produksi selulosa dengan menggunakan isolat 85-I. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Swings, J. 1980. *The Genera Acetobacter and Gluconobacter*. New York: Mac Millan.
- Thenawijaya, M. 1990. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Airlangga.
- Toyosaki, H., T. Naratomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida & F. Yhosinaga. 1995. Screening of Bacterial Cellulose - Producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture. *Biopolymer Res.* 59:1498-1502.
- Yang, Y.K, J.W. Hwang & Y.R. Pyun. 1998. Screening of Cellulose - Producing Strains from Indonesia Fruit Sample. Seoul: Dept. of Biotechnology and BRC. Yonsei University.
- Yoshino, T., T. Ashakura & K. Yoda. 1996. Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *J. Ferment. Bioeng.* 81:32-36.