

**IDENTIFIKASI ISOLAT *Acetobacter* sp LOKAL DAN UJI
KEMAMPUANNYA DALAM MEMPRODUKSI SELULOSA PADA MEDIUM
HS (HESTRIN DAN SCHRAMM) DAN MODIFIKASINYA**

Oleh

RHANTY OCTARINA Z

F 31.1064



1999

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

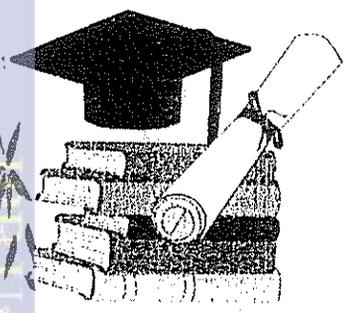
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dan sesungguhnya Kami telah menurunkan kepada kamu ayat-ayat yang memberi penurungan dan contoh-contoh dari orang-orang yang terdahulu sebelum kamu dan pelajaran bagi orang-orang yang bertakwa. Allah (Pemberi) cahaya (kepada) langit dan bumi. Perumpamaan cahaya Allah adalah seperti sebuah lubang yang tak tembus, yang di dalamnya ada pelita besar. Pelita itu di dalam kaca (dan) kaca itu seakan-akan bintang (yang bercahaya) seperti mutiara, yang dinyalakan dengan minyak dari pohon yang banyak buahnya, (yaitu) pohon zaitun yang tumbuh tidak di sebelah timur (sesuatu) dan tidak pula di sebelah baratnya), yang minyaknya (saja) hampir-hampir menerangi, walaupun tidak disentuh api. Cahaya di atas cahaya (berlapis-lapis), Allah membimbing kepada cahaya-Nya siapa yang Dia kehendaki, dan Allah memperbuat perumpamaan-perumpamaan bagi manusia, dan Allah Maha Mengetahui segala sesuatu (Q.S. Al-Nuur : 34-35)

Allah melapangkan rizki bagi siapa yang dikehendaki-Nya diantara hamba-hamba-Nya dan Dia (pula) yang menyempitkan baginya. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui segala sesuatu (Q.S. Al-Ankabut : 62)



Kupersembahkan karya kecil ini untuk:
 Mama, Papa, Teh Ratih, Ita dan Reza
 Serta orang-orang yang kucintai

RHANTY OCTARINA Z. F. 31.1064. Identifikasi Isolat *Acetobacter* sp Lokal dan Uji Kemampuannya Dalam Memproduksi Selulosa Pada Medium HS (Hestrin dan Schramm) dan Modifikasinya. Di bawah bimbingan Abdul Aziz Darwis dan Ani Suryani. 1999.

RINGKASAN

Selulosa yang dihasilkan dari tumbuhan dikenal dengan lignoselulosa, sedangkan selulosa yang dihasilkan oleh bakteri disebut selulosa bakteri (*Bacterial cellulose*). Dewasa ini telah mulai dilakukan pengembangan produksi selulosa dari bakteri yang dihasilkan oleh kelompok bakteri tertentu terutama dari genus *Acetobacter*. Selulosa bakteri terbebas dari kontaminasi polisakarida-polisakarida lainnya dan isolasi serta permurniannya relatif sederhana, tidak memerlukan energi atau proses kimiawi yang rumit. Selulosa bakteri mempunyai sifat-sifat fisik yang unik, diantaranya jaringan serat yang ultra halus, struktur jaringan yang kuat, kemurnian dan kristalinitas yang tinggi, serta bersifat *biodegradable*. Alternatif penggunaannya antara lain sebagai bahan baku produksi kertas bermutu tinggi, makanan rendah kalori dan membran ultrafiltrasi.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat *Acetobacter* lokal yang unggul dalam memproduksi selulosa dengan melakukan isolasi dan identifikasi, serta memperoleh komposisi media yang optimal untuk produksi selulosa menggunakan isolat lokal tersebut. Media yang digunakan pada tahap produksi adalah medium HS (Hestrin dan Schramm) dan medium HS yang dimodifikasi berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa. Penggunaan media sintetik ini dimaksudkan untuk menghindari ketergantungan terhadap persediaan media alami seperti air kelapa. Perolehan selulosa yang dihasilkan pada media HS termodifikasi diharapkan lebih tinggi daripada perolehan selulosa pada medium HS.

Pada penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor, yaitu faktor kombinasi sumber nitrogen dengan 3 taraf terdiri dari : A1(0,4% amonium sulfat + 0,2% ekstrak khamir + 0,2 % bacto-pepton), A2(0,4% amonium sulfat + 0,4% bacto-pepton) dan A3(0,4% amonium sulfat + 0,4% ekstrak khamir) serta faktor kombinasi sumber mineral dengan 3 taraf terdiri dari B1(0,52% KH_2PO_4 + 0,154% Na_2HPO_4 + 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,038% CaCO_3), B2(0,26% KH_2PO_4 + 0,077% Na_2HPO_4 + 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,019% CaCO_3) dan B3(1,04% KH_2PO_4 + 0,309% Na_2HPO_4 + 0,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,075% CaCO_3). Penelitian dilakukan secara duplo dengan dua kali ulangan untuk masing-masing isolat, menggunakan teknik kultivasi diam. Analisa dilakukan terhadap perolehan selulosa, kadar gula sisa dan pH akhir medium.

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dua isolat yang diperoleh, yaitu isolat PD5 dan RBP-52 merupakan spesies *Acetobacter liquefaciens*. Isolat PD5 diisolasi dari daging buah kelapa di daerah Parung, sedangkan isolat RBP-52 diisolasi dari limbah cair pabrik nata di daerah Ciampea. Dari hasil analisis komposisi air kelapa diperoleh kadar protein, kadar abu dan kadar gula total sebesar masing-masing 0,24%, 0,47% dan 1,77%.



Sedangkan dari hasil analisis kadar mineral air kelapa diperoleh 1460,00 ppm (0,15%) kalium, 528,00 ppm (0,05%) natrium, 152,05 ppm (0,015%) kalsium dan 95,40 ppm (0,01%) magnesium.

Kombinasi sumber nitrogen, mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa untuk kedua jenis isolat. Proses kultivasi oleh isolat PD5 menggunakan medium HS menghasilkan selulosa sebesar 1,343 g/l. Pada kultivasi menggunakan media HS termodifikasi, perolehan selulosa yang lebih tinggi dari hasil kultivasi menggunakan medium HS dihasilkan pada media modifikasi A1B2, A3B1, A1B3 dan A1B1, yaitu masing-masing 2,346 g/l, 2,252 g/l, 1,740 g/l dan 1,355 g/l. Pada kultivasi menggunakan isolat RBP-52 menggunakan medium HS diperoleh selulosa sebesar 1,562 g/l, sedangkan hasil yang lebih tinggi diperoleh pada media modifikasi A1B1 dengan perolehan selulosa sebesar 1,736 g/l.

Pada isolat PD5, kombinasi sumber nitrogen tidak berpengaruh nyata terhadap pH akhir, sedangkan kombinasi sumber mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata. Pada isolat RBP-52, kombinasi sumber nitrogen, mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap pH akhir medium. Kisaran pH akhir medium pada kultivasi menggunakan isolat PD5 adalah 3,33-3,77 dari nilai pH awal 5,00, sedangkan pada isolat RBP-52 berada pada kisaran 3,18-3,79.

Pada kultivasi menggunakan isolat PD5 dan RBP-52, kombinasi sumber nitrogen, mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap kadar gula sisa pada cairan kultivasi. Nilai kadar gula sisa pada isolat PD5 berada pada kisaran 0,486-4,296 g/l, sedangkan pada isolat RBP-52 berada pada kisaran 1,278-7,938 g/l.



**IDENTIFIKASI ISOLAT *Acetobacter* sp LOKAL DAN UJI
KEMAMPUANNYA DALAM MEMPRODUKSI SELULOSA PADA MEDIUM
HIS (HESTRIN DAN SCHRAMM) DAN MODIFIKASINYA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN**
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh

RHANTY OCTARINA Z.

F 31.1064

1999

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR

INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

**IDENTIFIKASI ISOLAT *Acetobacter* sp LOKAL DAN UJI
KEMAMPUANNYA DALAM MEMPRODUKSI SELULOSA PADA MEDIUM
HS (HESTRIN DAN SCHRAMM) DAN MODIFIKASINYA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN**
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh

RHANTY OCTARINA Z.

F 31.1064

Dilahirkan pada Tanggal 31 Oktober 1975
di Jakarta

Tanggal Lulus : 21 Mei 1999

Disetujui,
Bogor, Mei 1999


Dr. Ir. Ani Suryani, DEA
Dosen Pembimbing II




Dr. Ir. H. A. Aziz Darwis, MSc.
Dosen Pembimbing I

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses, PAU Bioteknologi IPB.

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada : (1) Dr. Ir. H. A. Aziz Darwis, MSc. dan Dr. Ir. Ani Suryani, DEA, selaku dosen pembimbing, atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan selama ini, (2) Drs. Purwoko, MSi. selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan untuk perbaikan skripsi ini, (3) Ir. Andes Ismayana, MT, atas masukan dan pengarahan yang diberikan selama penelitian, (4) Mama dan Papa tercinta serta kakak dan adik-adikku tersayang, Teh Ratih, Ita dan Reza yang senantiasa menyemangati penulis dengan segala dukungan, perhatian, kasih sayang dan doa restunya, (5) Pihak *Bioproduct Research Center*, Yonsei University, Seoul, Korea Selatan, atas bantuan dan kerjasama yang baik, (6) Depi, Vivi dan Iyein, atas persahabatan yang tulus dan kebersamaannya selama ini, (7) Wak Daong, Tante Meike, Tante Yatie, dan Tete Chiquita atas segala dukungan dan perhatiannya, (8) Warga Pondok Dewi : Teh Nur, Noey, Ni Yeni, Tanti, Yovi, Indri, Santi, Ai, Dewi, Diah, dan Mbak Nuniek, serta seluruh warga Paradise atas bantuan dan kebersamaannya selama ini, (9) Mbak Pepi, Mbak Emi, Mbak Ai, Mas Bazzi dan seluruh rekan-rekan di



Laboratorium Rekayasa Bioproses (Anto, Amin, Ago, Arfan, Pak Alfi, Mbak Dwi, Pak Jaksen, Jamal, Kris, Rifai, Teguh) atas bantuan dan kerjasama yang baik, dan (10) Rekan-rekan TIN 15 atas kekompakan dan kebersamaannya selama ini.

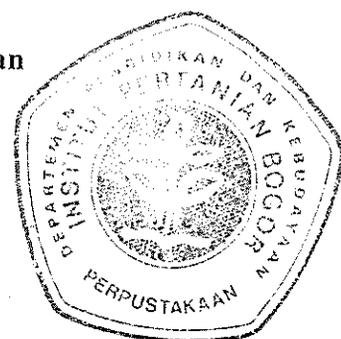
Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga mendapat ridha dari Allah SWT dan skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkannya. Amin.

Bogor, Mei 1999

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. TUJUAN.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. SELULOSA BAKTERI.....	4
B. BAKTERI PENGHASIL SELULOSA	7
C. MEDIA KULTIVASI	10
D. KONDISI KULTIVASI DAN PROSES HILIR PRODUKSI SELULOSA	12
BAB III. BAHAN DAN METODA.....	16
A. BAHAN DAN ALAT	16
B. METODA PENELITIAN.....	17
1. Isolasi dan Identifikasi Isolat <i>Acetobacter</i> lokal	17
2. Pembuatan Medium HS Termodifikasi Berdasarkan	



Hasil Analisis Komposisi Air Kelapa.....	21
3. Produksi Selulosa Bakteri Menggunakan Medium HS dan modifikasinya	22
C. RANCANGAN PERCOBAAN.....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
A. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ISOLAT <i>Acetobacter</i> LOKAL.....	25
B. MODIFIKASI MEDIUM HESTRIN DAN SCHRAMM.....	28
C. PRODUKSI SELULOSA BAKTERI PADA MEDIUM HS. (HESTRIN DAN SCHRAMM) DAN MODIFIKASINYA...	33
D. PENGARUH JENIS MEDIA TERHADAP pH AKHIR MEDIUM KULTIVASI	40
E. PENGARUH JENIS MEDIA TERHADAP KADAR GULA SISA PADA MEDIUM KULTIVASI	43
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
A. KESIMPULAN.....	46
B. SARAN.....	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Rumus bangun selulosa.....	5
Gambar 2. Pathway metabolisme pembentukan selulosa oleh <i>Acetobacter xylinum</i>	6
Gambar 3. Histogram perolehan selulosa oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media.....	37
Gambar 4. Histogram pH akhir oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media	42
Gambar 5. Histogram kadar gula sisa oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media	45



I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Dewasa ini telah mulai dilakukan pengembangan produksi selulosa oleh bakteri yang disebut selulosa mikrobial atau selulosa bakteri. Tidak sebagaimana selulosa yang dihasilkan dari tanaman, selulosa bakteri terbebas dari kontaminasi polisakarida-polisakarida lainnya, dan isolasi serta pemurniannya tidak memerlukan energi atau proses kimiawi yang rumit. Matsuoka *et al.* (1996) mengemukakan bahwa bakteri *Acetobacter xylinum* mampu menghasilkan selulosa bakteri yang mempunyai sifat-sifat fisik yang unik, termasuk jaringan seratnya yang ultra halus, kemurnian dan kristalinitas yang tinggi, sehingga selulosa bakteri ini memiliki prospek untuk dikembangkan sebagai bahan baku berbagai industri di masa datang.

Acetobacter xylinum diisolasi dari buah-buahan bergula yang mulai membusuk, sayuran dan air kelapa yang sudah mengalami fermentasi (Embuscado *et al.*, 1994). Menurut Lapuz *et al.* (1967), metoda untuk mengisolasi *Acetobacter* tidak sulit, yaitu dengan menumbuhkannya pada media yang ditambah gula dan diperkaya dengan sari buah dan ekstrak khamir. Sampai saat ini, di Indonesia masih sangat terbatas penelitian yang menggunakan *Acetobacter* lokal untuk memproduksi selulosa, sedangkan *Acetobacter* ini

diperkirakan sangat potensial di Indonesia mengingat habitatnya sangat mungkin untuk berkembang biak dengan baik.

Produksi selulosa oleh *Acetobacter xylinum* dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi gula, sumber nitrogen dan pH (Embuscado *et al.*, 1994). Saat ini, yang banyak digunakan sebagai medium untuk kultivasi *Acetobacter* adalah air kelapa. Disamping itu dikembangkan pula penggunaan medium sintetis untuk menghindari ketergantungan terhadap persediaan media alami seperti air kelapa. Hernawati (1998) telah melakukan penelitian untuk produksi selulosa menggunakan media air kelapa dan medium sintetis HS (Hestrin dan Schramm). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa perolehan selulosa yang dapat dibentuk oleh *Acetobacter xylinum* 85-I pada medium HS hanya mencapai 1,2265 g/l, sedangkan pada media air kelapa dengan kondisi kultivasi yang sama menghasilkan selulosa sebesar 8,5530 g/l. Hal ini menunjukkan bahwa medium HS belum memberikan hasil yang optimal untuk produksi selulosa dibandingkan dengan air kelapa, karena dalam air kelapa terdapat vitamin-vitamin, mineral dan protein yang secara alami telah terkandung dalam media tersebut. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan medium HS yang dimodifikasi berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa, yaitu dengan menambahkan komponen-komponen sebagaimana terdapat di air kelapa, sehingga diharapkan dapat meningkatkan produksi selulosa.

B. TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk : (1) memperoleh isolat *Acetobacter* lokal untuk memproduksi selulosa bakteri dengan melakukan isolasi dan identifikasi dan (2) mendapatkan komposisi media yang optimal dengan melakukan kultivasi menggunakan medium HS yang dimodifikasi sebagai medium pertumbuhan *Acetobacter* lokal tersebut.



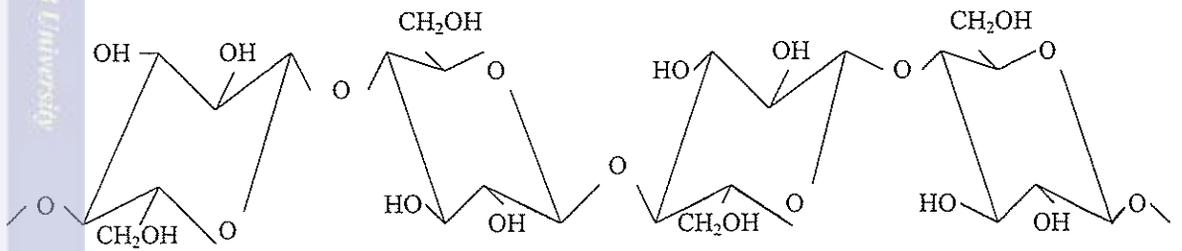
II. TINJAUAN PUSTAKA

A. SELULOSA BAKTERI

Yoshino *et al.*(1996) mengemukakan bahwa kelompok bakteri tertentu dapat menghasilkan selulosa bakteri, terutama dari genus *Acetobacter*. Selulosa yang dihasilkan memiliki kemampuan membentuk kristal lebih tinggi, struktur jaringannya kuat, jaringan serat memiliki area yang luas, kapasitas pengikat air tinggi, resistensi tinggi, dan memiliki kekuatan tarik yang besar. Ditambahkan oleh Tonouchi *et al.* (1994) bahwa selulosa bakteri memiliki karakteristik yang unik, diantaranya kekuatan mekanik, tingkat kemurnian yang tinggi dan dapat diuraikan (*biodegradable*) sehingga tidak berbahaya bagi lingkungan. Dengan berbagai sifat unggul yang dimilikinya, selulosa bakteri ini dapat digunakan pada berbagai bidang, diantaranya sebagai bahan baku untuk produksi kertas bermutu tinggi, pembuatan membran *loud speaker*, makanan rendah kalori (untuk diet) dan pencuci mulut (*dessert*), untuk produksi kulit tiruan, membran ultrafiltrasi, membran penutup untuk biosensor glukosa, sebagai cairan substrat untuk sel-sel mamalia, pengikat untuk bahan-bahan berbentuk bubuk, pengeras cat, tinta dan *adhesive* (Yoshino *et al.*, 1996).

Selulosa dibentuk dari glukosa melalui glukosa-6-pospat (G6P), glukosa-1-pospat (G1P) dan uridin-5'-dipospat glukosa (Masaoka *et al.*, 1993). Mekanisme pembentukan selulosa pada tumbuhan berbeda dengan mekanisme

pembentukan selulosa menggunakan mikroorganisme. Pada tumbuhan, prekursor sintesis selulosanya adalah GDP-D-Glukosa, sedangkan *Acetobacter xylinum* mensintesis selulosa dari UDP-D-glukosa (Hassid, 1967). Rumus bangun selulosa dapat dilihat pada Gambar 1.

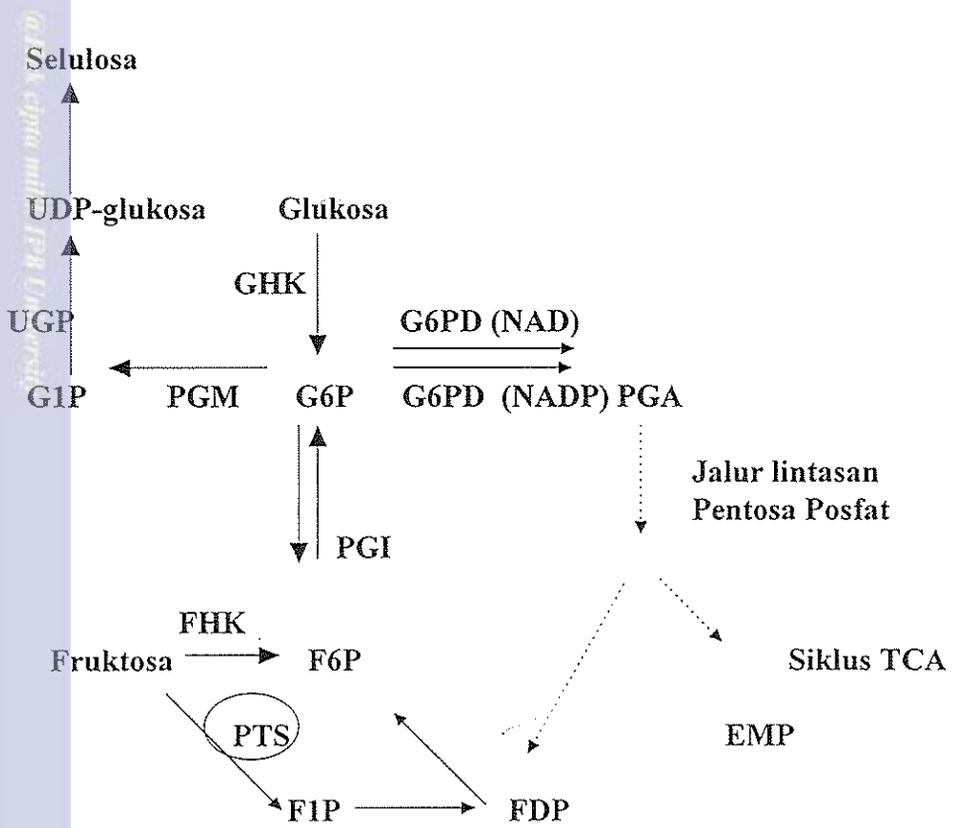


Gambar 1. Rumus bangun selulosa (Sjostrom, 1995)

Tipe dari serat-serat selulosa dapat digambarkan sebagai sebuah kabel di mana benang-benang yang membujur adalah rantai-rantai polimer yang panjang yang hanya terdiri dari D-glukosa. Pada masing-masing rantai, monomer-monomer gula berikatan secara seragam di dalam ikatan β -1,4 glukosidik. Laju produksi selulosa oleh *Acetobacter xylinum* sebanding dengan laju pertumbuhan sel dan tidak tergantung pada sumber karbon. Terdapat 4 langkah (reaksi) enzimatis di dalam pembentukan selulosa oleh *Acetobacter xylinum* yang menunjukkan lintasan yang lengkap dari glukosa menjadi selulosa, yaitu :

- (1) fosforilasi dari glukosa oleh glukokinase,
- (2) isomerisasi dari glukosa-6-posfat (G6P) menjadi glukosa-1-posfat (G1P) oleh pospoglukomutase,
- (3) sintesis UDP-glukosa oleh UDPG-pirofosforilase dan
- (4) reaksi pembentukan selulosa.

Jalur lintasan (pathway) biosintesis selulosa oleh *Acetobacter xylinum* secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 2. (Ross *et al.*, 1991).



Gambar 2. Pathway metabolisme pembentukan selulosa oleh *A. xylinum* (Ross, Raphael dan Moshe, 1991).

Keterangan : UDP = Uridine Dehidrogenase piroposforilase

- G6P = Glukosa-6-posfat
- G1P = Glukosa-1-posfat
- PGA = Asam Posfoglukonik
- F1P =Fruktosa-1-posfat
- FDP = Fruktosa-1,6-diposfat
- F6P = Fruktosa-6-posfat
- GHK = Glukosa heksokinase
- PGM = Posfoglukomutase
- UGP = UDP-glukosa piroposforilase
- G6PD = Glukosa-6-posfat dehidrogenase
- PGI = Posfoglukosa isomerase
- FHK = Fruktosa heksokinase
- PTS = Sistem Posfotransferase
- EMP = Jalur lintasan Embden Myerhoff

B. BAKTERI PENGHASIL SELULOSA

Fardiaz (1989)^{a)} mengemukakan bahwa bakteri dari genus *Acetobacter* bersifat motil (polar) atau non motil. *Acetobacter xylinum* termasuk dalam kelompok bakteri basili, gram negatif dan aerobik. *Acetobacter xylinum* memproduksi kapsul secara berlebihan dan digunakan dalam pembuatan nata de coco. Menurut Williams dan Cannon (1989), *Acetobacter xylinum* termasuk kelompok bakteri gram negatif dan obligat aerob yang memisahkan serat-serat selulosa sebagai bagian dari aktivitas normal metabolismenya. Mikroorganisme dari genus *Acetobacter* biasanya ditemukan dalam buah-buahan, sayur-sayuran, cuka, sari buah dan minuman beralkohol.

Acetobacter xylinum diisolasi dari buah-buahan bergula yang membusuk, sayuran dan fermentasi air kelapa. Telah ditemukan 33 mikroorganisme pembentuk nata. Mikroorganisme ini menghasilkan nata dengan tekstur berbeda, berkisar dari lembut ke keras saat dimasak di sirup (Embuscado *et al.*, 1994).

Masaoka *et al.* (1993) telah mengisolasi bakteri penghasil selulosa dari genus *Acetobacter* dan *Agrobacterium*. Diperoleh 41 strain dan diuji kemampuannya memproduksi selulosa pada medium cair HS (Hestrin dan Schramm) pada kondisi kultivasi diam selama 7 hari pada suhu 30°C. Empat strain dari *Acetobacter xylinum* mampu memproduksi selulosa, yaitu IFO 12667 (IFO = Institute for Fermentation Osaka), IFO 13263, IFO 13264 dan IFO 13265. Setelah 3 hari kultivasi dengan luas permukaan wadah 54 cm² dan volume media

60 ml, dilakukan pengukuran terhadap jumlah produksi selulosa dan ternyata IFO 13693 memproduksi selulosa tertinggi dibandingkan 3 isolat lainnya, yaitu 0,312 gram atau $\pm 5,2$ gram/liter.

Seto *et al.* (1997) menemukan 1500 strain penghasil selulosa di mana produksi selulosa yang tinggi dihasilkan oleh isolat yang berasal dari buah melon, cherry dan anggur. Beberapa isolat juga diperoleh dari sampel yang berasal dari pabrik cuka.

Menurut Lapuz *et al.* (1967), metoda untuk mengisolasi *Acetobacter* tidak sulit, yaitu dengan menumbuhkannya pada media yang ditambah gula dan diperkaya dengan sari buah dan ekstrak khamir. Tanda awal pertumbuhan bakteri ini pada medium cair yang mengandung gula berupa timbulnya kekeruhan setelah inkubasi 24 jam pada suhu kamar. Setelah 36-48 jam, suatu lapisan tembus cahaya terbentuk di permukaan medium, dan secara bertahap akan menebal membentuk lapisan yang lebih kompak. Jika diganggu, lapisan itu akan tenggelam dan lapisan baru akan terbentuk di permukaan selama kondisinya masih memungkinkan. Di bawah kondisi yang mendukung, nata yang terbentuk dapat mencapai tebal lebih dari lima centimeter dalam waktu satu bulan.

Sebelum melakukan berbagai pencirian untuk identifikasi, pertama-tama yang harus dilakukan adalah memperoleh biakan murni dari mikroorganisme yang diinginkan. Untuk mengidentifikasi bakteri, meskipun tidak ada skema klasifikasi yang diakui secara “resmi” atau secara internasional, skema klasifikasi yang paling terkenal dan paling umum digunakan ialah sebagaimana dipaparkan

dalam Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Dalam Bergey's Manual, bakteri dikelompokkan berdasarkan grup menurut bentuk, sifat pewarnaan gram dan kebutuhannya akan oksigen. Identifikasi isolat strain bakteri pembentuk selulosa dengan menggunakan metoda Bergey's sebagaimana diterangkan dalam Breed *et al.* (1957) adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Identifikasi isolat strain bakteri pembentuk selulosa

Karakteristik	<i>Acetobacter aceti sub sp. xylinum</i>	Isolat dari pelikel selulosa
Ukuran	0,6-0,8 x 1,0 - 3,0 μm	0,6-0,8 - 1,0 μm
Susunan Sel	Tunggal, berpasangan, berikatan	Tunggal, berpasangan, berikatan
Reaksi Gram	Negatif/Variabel	Negatif
Pertumbuhan Medium Cair	Tumbuh di permukaan	Membentuk pelikel tanpa endapan
Analisis biokimiawi :		
-Produksi katalase	Terbentuk gelembung gas	Terbentuk gelembung gas
-Pertumbuhan pada Medium Hoyer's	Tidak terbentuk pelikel	Tidak terbentuk pelikel
-Asam dari glukosa	Terbentuk <i>Clear Zone</i>	Terbentuk <i>Clear Zone</i>
-Dihidroksiacetone dari gliserol	Koloni warna merah muda	Koloni warna merah muda
-Produksi selulosa	Ada pelikel selulosa	Ada pelikel selulosa
Identifikasi	<i>A. aceti sub sp. xylinum</i>	<i>A. xylinum</i>

Sumber : Breed *et al.* (1957)

Menurut Hadioetomo (1990), ciri fisiologis atau biokimiawi merupakan kriteria yang amat penting di dalam identifikasi spesimen yang tak dikenal. Tanpa hasil pengamatan fisiologis yang memadai mengenai organisme yang diperiksa, maka penentuan spesiesnya tidaklah mungkin dilakukan. Beberapa uji yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil selulosa adalah pewarnaan gram (gram staining), uji katalase, uji motilitas, uji dihidroksiacetone

dari gliserol, pertumbuhan pada medium cair, dan pertumbuhan pada medium Hoyer's. Selanjutnya berdasarkan hasil uji tersebut, dilakukan identifikasi spesies mikroorganismenya dengan menggunakan metode Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

C. MEDIA KULTIVASI

Bahan air kelapa merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba karena mengandung gula, senyawa nitrogen, mineral, vitamin, dan asam amino. Saturnino-Dimaguila (1967) menyebutkan bahwa air kelapa merupakan medium yang sangat baik untuk sintesis selulosa karena air kelapa kaya akan zat-zat gizi yang penting bagi pertumbuhan bakteri. Analisa proksimat air kelapa menurut Mashudi (1993) adalah sebagai berikut : kadar air 97,35 %, kadar abu 0,58 %, kadar protein 0,06 %, kadar lemak 0,09 % dan kadar karbohidrat 1,92 %. Ketaren dan Djatmiko (1985) menyebutkan bahwa air kelapa mengandung empat macam mineral utama, yaitu kalium (K), natrium (Na), kalsium (Ca) dan magnesium (Mg) dengan konsentrasi masing-masing 3120 ppm (0,312 %), 1050 ppm (0,105 %), 290 ppm (0,029%) dan 300 ppm (0,030 %).

Masaoka *et al.* (1993) menyebutkan bahwa secara umum glukosa telah digunakan sebagai sumber karbon untuk memproduksi selulosa oleh *Acetobacter xylinum*. Sedangkan menurut Embuscado *et al.* (1994), gel selulosa atau nata disintesis oleh strain *Acetobacter xylinum* yang ditumbuhkan di air kelapa atau jus buah (nanas, tomat, dan lain-lain) yang ditambah dengan sukrosa.

Menurut Mashudi (1993), sumber nitrogen yang dapat digunakan dalam media adalah sumber nitrogen anorganik (amonium sulfat, amonium fosfat, dan kalium nitrat) dan sumber nitrogen organik (urea, pepton, tripton dan ekstrak khamir) serta kombinasi antara kedua sumber nitrogen tersebut. Penggunaan 0,4 % amonium sulfat dari total media air kelapa dapat meningkatkan hasil.

Medium lain yang terbukti baik untuk mengisolasi mikroorganisme penghasil selulosa adalah medium HS (Hestrin dan Schramm medium).

Komposisi medium HS dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi medium HS

Komponen	Jumlah (% b/v)
Glukosa	2,0
Bacto-pepton	0,5
Ekstrak khamir	0,5
Na ₂ HPO ₄	0,27
Asam sitrat	0,115

Sumber : Hestrin dan Schramm (1954)

Hasil penelitian Hernawati (1998) menunjukkan bahwa perolehan selulosa yang dapat dibentuk oleh *Acetobacter xylinum* 85-I pada medium HS hanya mencapai 1,2265 g/l, sedangkan pada media air kelapa dengan kondisi kultivasi yang sama menghasilkan perolehan selulosa sebesar 8,5530 g/l.

Komposisi media air kelapa yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi media air kelapa

Komponen	Jumlah
(NH ₄) ₂ SO ₄ (% b/v)	1,0
Asam asetat glasial (% v/v)	1,0
K ₂ HPO ₄ (% b/v)	0,25
Air kelapa	1 liter

Sumber : Hernawati (1998)

D. KONDISI KULTIVASI DAN PROSES HILIR PRODUKSI SELULOSA

Kondisi kultivasi untuk produksi selulosa dapat dilakukan dengan kultivasi diam (*Static Culture*) dan kultivasi tergoyang (*Shaken Culture*). Williams dan Cannon (1989) menerangkan bahwa ketika *Acetobacter xylinum* dikultivasi secara diam pada medium cair, pelikel selulosa akan terbentuk dan sel-sel bakteri terperangkap di dalamnya. Pelikel yang terbentuk memiliki ketebalan dan kekuatan tarik yang berbeda-beda. Pada kultur yang digoyang, *Acetobacter xylinum* tumbuh dengan cepat namun selulosa yang diproduksi sedikit dan tidak berbentuk lembaran, tapi berbentuk bola-bola bundar di dalam cairan kultur.

Pelikel selulosa mulai terbentuk pada permukaan medium cair setelah 24 jam pada kultivasi diam menggunakan *Acetobacter xylinum* dengan suhu 30°C (Ross *et al.*, 1991). Menurut Hestrin dan Schramm (1954), satu hari setelah inokulasi dan sebelum pembentukan pelikel di permukaan medium, akan timbul kekeruhan pada cairan kultivasi. Terbentuknya lapisan selulosik di permukaan yang disebut pelikel mulai dapat dilihat di permukaan medium setelah dua hari pada kondisi kultivasi diam, bersamaan dengan terjadinya proses penjernihan cairan di bawahnya. Jaringan halus dan transparan yang terbentuk di permukaan membawa sebagian bakteri yang terperangkap di dalamnya. Gas CO₂ yang dihasilkan secara lambat oleh *Acetobacter xylinum* mungkin menyebabkan pengapungan nata sehingga nata terdorong ke permukaan. Sifat-sifat fisik dari

pelikel selulosa seperti opasitas, kekakuan, kekuatan tarik dan spesifik grafitasi merupakan fungsi dari kondisi dan perbandingan relatif jumlah bakteri di dalam pelikel, tidak hanya dipengaruhi oleh sumber alam, konsentrasi dan ikatan selulosanya (Hestrin dan Schramm, 1954).

Pada medium agar *tomato-pepton-yeast-sucrose* dan kondisi asam, di mana pertumbuhan normal bakteri nata selalu diamati, koloni akan terbentuk setelah 72 jam. Koloni yang tumbuh berbentuk bundar, *opaque*, muncul di permukaan, mengkilat, kokoh, permukaan licin mengkilap, pinggirannya tidak terpecah dan berukuran antara 1 - 2 milimeter atau lebih. Karena kekokohnya, koloni sulit untuk dipecah, dan koloni tersebut dapat dengan mudah diangkat dari permukaan medium agar dengan menggunakan jarum ose dan dipindahkan ke medium cair (Lapuz *et al.*, 1967).

Sintesis selulosa dari glukosa merupakan fungsi dari suplai oksigen. Peningkatan jumlah selulosa yang relatif cepat diduga terjadi akibat konsentrasi sel yang terus berkembang di daerah permukaan yang langsung kontak dengan udara di dalam wadah fermentasi. Pada kultur yang tumbuh, suplai oksigen di permukaan akan merangsang peningkatan massa sel dan enzim pembentuk selulosa, akibatnya akan meningkatkan produksi selulosa (Hestrin dan Schramm, 1954).

Hasil penelitian Embuscado *et al.* (1994) menunjukkan bahwa sintesis selulosa dipengaruhi oleh jenis gula yang ada dalam medium. Laju produksi selulosa menurun setelah 8 hari inkubasi, kecuali jika digunakan 1% fruktosa

atau 1% fruktosa + sukrosa. Sekitar 70 % selulosa diproduksi pada 8 hari pertama dalam semua media kecuali di media yang mengandung hanya 1% total karbohidrat. Jadi, laju produksi selulosa pada fase pertama cepat kemudian diikuti oleh laju produksi yang jauh lebih lambat, meskipun terlihat adanya peningkatan produksi total yang sedikit sampai hari ke-46 inkubasi.

Menurut Masaoka *et al.* (1993), persiapan starter atau inokulum untuk produksi selulosa adalah dengan menginokulasikan sel-sel bakteri dari medium agar miring ke dalam 70 ml medium standard dalam labu Sakaguchi 500 ml, kemudian diikuti dengan inkubasi pada suhu 30°C, kecepatan shaker 140 rpm selama 2 hari. Produksi selulosa dilakukan dengan kultivasi diam pada suhu 30°C selama 7 hari. Sedangkan Seto *et al.* (1997) melakukan propagasi selama 4 hari pada suhu 30°C dengan kecepatan shaker 180 rpm. Kemudian 60 ml cairan kultur diinokulasikan ke dalam 600 ml media kultivasi dalam jar fermentor dengan pH awal 5 dan suhu 30°C.

Penentuan pH merupakan faktor yang khas untuk mencapai efektifitas pertumbuhan. Menurut Lapuz *et al.* (1967), pH optimum untuk pembentukan nata adalah 5,0 dan 5,5 dalam media air kelapa dan pada suhu kamar (28-31°C).

Sampel nata yang diuji di bawah mikroskop terdiri dari sel-sel bakteri yang terperangkap di dalam serat-serat yang membentuk pelikel. Oleh karena itu, nata yang terbentuk harus dimurnikan terlebih dahulu dari sel-sel, media, asam-asam organik, gula atau substansi organik lain yang berasal dari media, atau kontaminan-kontaminan yang terbentuk dari aktivitas metabolisme. Gel selulosa

dikeringkan di dalam oven selama 3 jam pada suhu 80°C setelah dimurnikan terlebih dahulu dengan cara direndam dalam larutan NaOH 1% selama 24 jam, direndam dalam larutan asam asetat 1% untuk netralisasi, kemudian dicuci dengan air destilata hingga benar-benar netral (Saturnino-Dimaguila, 1967).

III. BAHAN DAN METODA

A. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan sebagai sample adalah buah-buahan yang mulai busuk (jeruk, nenas, tomat, alpukat, kedondong dan kelapa) dan air kelapa yang terinfeksi ataupun yang terfermentasi; air kelapa yang dianalisis; larutan buffer sodium fosfat; medium cair HS (Hestrin dan Schramm) yang ditambahkan antibiotik (0,5% DMF solution (dimetilformamid), 0,5% asam asetat, 0,01% griseofulvin, dan 0,05% nystatine), dan medium HS agar; media untuk pengujian meliputi medium katalase (ekstrak khamir 3%, glukosa 10%, CaCO_3 3 %, dan agar 2%), medium Hoyer's ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%, K_2HPO_4 0,01%, KH_2PO_4 0,09%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 %), medium uji motilitas (5 ml L-agar), medium uji dehidroksiaseton dari gliserol (YE 3 %, gliserol 3 %, agar 2 %), larutan Fehling A ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19,2 g) dan Fehling B (K, Na-tartarat, NaOH, Air 346 g) dan bahan-bahan untuk pewarnaan Gram (pewarna ungu kristal, larutan yodium Gram (Lugol), etanol 95 % dan larutan safranin); media sintetik HS termodifikasi; larutan HCl 1%, larutan NaOH 1% dan pereaksi DNS untuk mengukur kadar gula sisa (gula pereduksi).

Bahan pelengkap yang digunakan terdiri dari etanol, aquades, air kran, kapas, kertas, tissue, kertas label, aluminium foil, plastik anti panas dan karet. Sedangkan alat-alat yang digunakan adalah pisau cutter, tabung reaksi, rak tabung

reaksi, timbangan, pipet, pembakar bunsen, jarum ose, pengaduk magnetis, gelas piala, gelas ukur, labu Erlenmeyer, cawan petri, otoklaf, lemari pendingin, inkubator, mikroskop, pH-meter, termometer dan spektrofotometer.

B. METODA PENELITIAN

1. Isolasi dan Identifikasi isolat *Acetobacter* lokal

Beberapa sampel buah yang diperoleh masing-masing dicacah dan sebanyak kira-kira 1 gram bahan tersebut disuspensikan pada larutan buffer sodium fosfat. Sebanyak 1 mililiter ekstrak sampel dari masing-masing suspensi ditumbuhkan pada media HS cair yang ditambahkan antibiotik dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu 30°C. Untuk sampel cair seperti air kelapa langsung diinokulasikan pada media HS cair tanpa pengenceran dengan suhu dan lama inkubasi yang sama (Masaoka *et al.*, 1993).

Sebagai indikasi adanya mikroorganisme pembentuk selulosa, di permukaan media cair akan terlihat adanya pelikel selulosa. Pelikel tersebut dicacah dengan pisau kemudian disuspensikan sampai pengenceran 10^{-4} dengan menggunakan larutan buffer sodium phosphat. Kemudian, sebanyak 1 mililiter suspensi pelikel dari masing-masing pengenceran dibiakkan pada media HS agar dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30 °C. Koloni mikroorganisme yang memperlihatkan ciri-ciri bundar, buram, muncul di permukaan, coklat cerah, mempunyai permukaan licin, mengkilat, keras, serta

pinggiran yang tidak pecah diinokulasikan ulang pada media HS agar selama tiga hari. Inokulasi dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh koloni tunggal yang tetap stabil, yaitu bundar dan bening/coklat cerah berlendir (Saturnino-Dimaguila, 1967).

Identifikasi mikroorganisme penghasil selulosa hanya dilakukan pada masing-masing agar cawan yang ditumbuhi koloni yang stabil, bulat dan bening diliputi lendir. Identifikasi yang dilakukan adalah sebagai berikut.

a. Pewarnaan Gram

Menurut Fardiaz (1989)^{b)}, pewarnaan Gram merupakan cara pewarnaan diferensial, dimana dengan cara ini bakteri dapat dibedakan menjadi dua grup, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Sel-sel yang tidak dapat melepaskan zat warna setelah pencucian akan tetap berwarna seperti zat warna pertama yaitu ungu kristal atau biru-ungu, dan termasuk kelompok bakteri gram positif. Sedangkan sel yang dapat melepaskan ungu kristal dan mengikat safranin sehingga berwarna merah-merah muda, termasuk kelompok bakteri gram negatif. Pewarnaan gram diawali dengan meneteskan satu tetes kultur di atas gelas obyek dan difiksasi panas. Olesan bakteri digenangi pewarna ungu kristal selama 1 menit kemudian dibilas dengan air kran dengan cara memegang gelas obyek pada posisi miring. Sisa air yang tertinggal dibuang, setelah itu olesan digenangi larutan yodium Gram (Lugol) selama 1 menit lalu dicuci kembali dengan air. Selanjutnya olesan tadi

ditetesi lagi dengan etanol 95 % selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi, dan preparat dicuci lagi dengan akuades. Terakhir, olesan digenangi dengan “counterstain” atau pewarna tandingan/kontras yaitu larutan safranin selama 10-20 detik. Preparat dicuci dan dikeringkan dengan kertas serap, lalu diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali (Fardiaz, 1989)^{b)}.

b. Uji Katalase

Menurut Fardiaz (1989)^{b)}, kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Enzim katalase diduga penting untuk pertumbuhan aerobik karena H_2O_2 yang dibentuk dengan pertolongan beberapa enzim pernapasan bersifat racun terhadap sel mikroba. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase. Pada uji katalase, koloni ditumbuhkan pada medium untuk uji katalase. Apabila ditetaskan H_2O_2 3 % pada koloni yang tumbuh di medium tersebut, maka terbentuknya gelembung-gelembung oksigen (seperti busa sabun) menunjukkan uji katalase positif (Fardiaz, 1989)^{b)}.

c. Uji pertumbuhan pada Medium Hoyer's

Uji pertumbuhan pada medium Hoyer's bertujuan untuk membuktikan bakteri penghasil selulosa tidak dapat tumbuh pada medium tanpa glukosa.

Pada uji medium Hoyer's, mikroorganisme yang akan diidentifikasi diinokulasikan pada medium Hoyer's dengan kultivasi diam selama 2 minggu. Pertumbuhan yang lambat (-) menunjukkan *Acetobacter* (Swings, 1980).

d. Uji Motilitas

Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya flagela pada sel. Uji motilitas dilakukan dengan cara memasukkan lima mililiter L-agar pada tabung reaksi kemudian dibekukan. Sebanyak satu ose koloni ditusukkan pada media agar semi solid dan diinkubasikan selama 24 jam pada 37°C. Uji positif jika koloni menyebar (Fardiaz, 1989)^{b)}.

e. Uji dehidroksiaseton dari gliserol

Uji dehidroksiaseton dari gliserol bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut termasuk genus *Acetobacter* atau tidak. Uji dehidroksiaseton dari gliserol dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose kultur pada medium dehidroksiaseton. Setelah itu diinkubasikan selama 7 hari. Kemudian koloni ditetesi dengan larutan fehling. Warna merah menunjukkan genus *Acetobacter*, sedangkan warna biru menunjukkan bahwa koloni tersebut bukan genus *Acetobacter* (Swings, 1980).

Setelah dilakukan tahap-tahap pengujian seperti di atas, selanjutnya dilakukan identifikasi spesies mikroorganismenya dengan menggunakan metode Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

2. Pembuatan Medium HS Termodifikasi Berdasarkan Hasil Analisis Komposisi Air Kelapa

Bahan air kelapa kaya akan zat-zat gizi yang penting bagi pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan pembuatan media modifikasi HS berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa, sehingga diperoleh media modifikasi HS dengan kandungan nutrisi yang mirip dengan air kelapa. Analisis komposisi air kelapa dilakukan terhadap kadar abu, kadar protein, kadar gula dan kadar mineral. Lokasi pengambilan sampel air kelapa terdiri dari beberapa pasar di Bogor, yaitu Pasar Gunung Batu, Pasar Ciampea, Pasar Anyar, Pasar Bogor dan Pasar Ramayana. Pada penentuan kadar abu menurut AOAC (1980), sampel sebanyak 2-5 gram ditimbang ke dalam cawan porselen yang telah dikeringkan dan diketahui beratnya, kemudian diabukan dalam tanur pengabuan pada suhu 450-500 °C selama 2 jam atau sampai semua sampel telah menjadi abu, kemudian didinginkan dan ditimbang. Perhitungan kadar abu adalah sebagai berikut.

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{(A-B)}{W} \times 100 \%$$

Dimana :

A = Berat cawan + berat sampel setelah diabukan

B = Berat cawan

W= Berat sampel awal

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan Metoda Lowry dan penentuan kadar gula total dilakukan dengan Metoda Phenol.

Kedua metoda ini dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2. Sedangkan analisis kadar mineral air kelapa dilakukan di Laboratorium Terpadu, IPB, meliputi kadar kalium, natrium, kalsium dan magnesium dengan menggunakan metoda SSA (Spektroskopi Serapan Atom). Media HS termodifikasi dibuat dengan mengkombinasikan tiga taraf faktor kombinasi sumber nitrogen dan tiga taraf faktor kombinasi sumber mineral sehingga diperoleh 9 (sembilan) macam media modifikasi HS untuk produksi selulosa.

3. Produksi Selulosa Bakteri Menggunakan Medium HS dan Modifikasinya

Kultivasi dilakukan dengan cara diam (static culture). Sebanyak satu ose penuh koloni sel bakteri diinokulasikan pada 100 ml media HS termodifikasi pada labu Erlenmeyer 500 ml kemudian dipropagasi selama 4 hari. Selanjutnya diinokulasikan ke dalam 100 ml media HS termodifikasi pada jar gelas 300 ml dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu 30°C dengan cara diam. Akhirnya produk selulosa yang terbentuk diambil untuk dianalisis (Masaoka *et. al.*, 1993). Analisis dilakukan terhadap pH akhir medium menggunakan pH-meter, perolehan selulosa kering (Lampiran 4) dan kadar gula sisa dengan metoda DNS (Lampiran 5).

C. RANCANGAN PERCOBAAN

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu kombinasi sumber nitrogen dalam medium

dengan 3 (tiga) taraf faktor. Dalam penyusunan ketiga taraf faktor ini, 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ digunakan sebagai faktor tetap, sedangkan hasil analisis kadar mineral air kelapa digunakan untuk penyusunan tiga taraf kombinasi sumber nitrogen sebagai pengganti sumber nitrogen air kelapa yang terdiri dari ekstrak khamir dan bacto-pepton dengan perbandingan 1 : 1, bacto-pepton saja, dan ekstrak khamir saja. Ketiga taraf faktor tersebut adalah sebagai berikut :

taraf ke-1 : 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b/v) + (Ekstrak khamir + Bacto-pepton, 1 : 1)

taraf ke-2 : 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b/v) + Bacto-pepton

taraf ke-3 : 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b/v) + Ekstrak khamir

Faktor kedua adalah kombinasi sumber mineral dengan tiga taraf faktor, dimana taraf pertama adalah kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi mineral hasil analisis kadar mineral air kelapa, taraf kedua dengan konsentrasi mineral setengah dari hasil analisis dan taraf ketiga dengan konsentrasi mineral dua kali hasil analisis. Ketiga taraf faktor tersebut adalah sebagai berikut :

taraf ke 1 : $a \% \text{KH}_2\text{PO}_4 + b \% \text{Na}_2\text{HPO}_4 + c \% \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + d \% \text{CaCO}_3$

taraf ke 2 : $1/2a \% \text{KH}_2\text{PO}_4 + 1/2b \% \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1/2c \% \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 1/2d \% \text{CaCO}_3$

taraf ke 3 : $2a \% \text{KH}_2\text{PO}_4 + 2b \% \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2c \% \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 2d \% \text{CaCO}_3$

Keterangan : a, b, c, d \approx hasil analisis kadar mineral air kelapa

Percobaan dilakukan secara duplo dan dua kali ulangan untuk masing-masing isolat yang digunakan. Persamaan umum yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + M_j + NM_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

- Y_{ijk} = hasil percobaan ke-k akibat faktor kombinasi sumber nitrogen dalam medium ke-i dan faktor kombinasi sumber mineral ke-j
- μ = rata-rata sebenarnya
- N_i = pengaruh faktor kombinasi sumber nitrogen dalam medium ke-i (dengan tiga taraf faktor)
- M_j = pengaruh faktor kombinasi sumber mineral dalam medium ke-j (dengan tiga taraf faktor)
- NM_{ij} = pengaruh interaksi faktor kombinasi sumber nitrogen ke-i dan faktor kombinasi sumber mineral ke-j
- $\epsilon_{k(ij)}$ = faktor kesalahan percobaan ke-k dalam kombinasi perlakuan.

pertumbuhan pada medium cair bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mensintesa produk pada permukaan medium. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase. Uji pertumbuhan pada medium Hoyer's bertujuan untuk membuktikan bakteri penghasil selulosa tidak dapat tumbuh pada medium tanpa glukosa. Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya flagela pada sel. Sedangkan uji dehidroksiaseton dari gliserol bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut termasuk genus *Acetobacter* atau tidak. Pada tahap identifikasi ini juga dilakukan uji pewarnaan Gram yang merupakan cara pewarnaan diferensial, dimana dengan cara ini bakteri dapat dibedakan menjadi dua grup, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Data keseluruhan dari hasil identifikasi terhadap ketiga isolat yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil identifikasi isolat lokal

Uji*	PD5	RBP-34	RBP-52
Pewarnaan Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Pertumbuhan Pada Medium Cair	pada permukaan medium	pada permukaan medium	pada permukaan medium
Motilitas	motil	motil	motil
Analisis Biokimiawi			
1. Uji Katalase	++	+	+++
2. Dihidroksiaseton dari gliserol	+	+	+
3. Pertumbuhan pada medium Hoyer's	-	-	-

*Breed *et al.* (1957)

Keterangan : 1. (+) terbentuk gelembung gas
2. (+) koloni warna merah muda
3. (-) tidak terbentuk pelikel

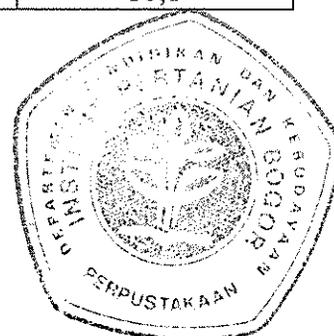
Berdasarkan identifikasi yang dilakukan, terlihat bahwa ketiga isolat yang diamati termasuk kelompok bakteri gram negatif, bersifat motil dan mensintesis produk pada permukaan medium cair. Hasil analisis biokimiawi memperlihatkan uji katalase positif untuk ketiga isolat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase untuk memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat racun bagi sel bakteri, menjadi H_2O dan O_2 . Ketiga isolat yang diperoleh tidak dapat tumbuh pada medium Hoyer's (medium tanpa glukosa), dan koloni yang tumbuh pada medium dehidroksiaseton berwarna merah ketika ditetesi larutan Fehling yang berarti bahwa bakteri tersebut merupakan genus *Acetobacter*.

Setelah pengujian di atas, ketiga isolat tersebut dikirim ke Korea Selatan untuk dilakukan identifikasi lanjut oleh tim BRC (*Bioproducts Research Center*) dari Yonsei University, Korea Selatan. Identifikasi dilakukan dengan mengukur persentase *accordance* yang menunjukkan komposisi relatif asam lemak dari masing-masing strain dengan menggunakan teknik gas kromatografi. Sebagai pembandingan, digunakan isolat standar, yaitu BRC-5 yang merupakan spesies *Acetobacter xylinum*. Hasil uji gas kromatografi dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Identifikasi isolat lokal menggunakan teknik gas kromatografi

Isolat	Jenis	Accordance %
BRC-5	<i>Acetobacter xylinum</i>	24,1
PD5	<i>Acetobacter liquefaciens</i>	6,7
RBP-34	<i>Ancyclobacter aquaticus</i>	8,5
RBP-52	<i>Acetobacter liquefaciens</i>	16,1

Sumber : Hwang dan Pyun (1998).



Berdasarkan identifikasi menggunakan teknik gas kromatografi terlihat bahwa salah satu isolat, yaitu isolat RBP-34 ternyata bukan genus *Acetobacter*, tapi merupakan spesies *Ancyclobacter aquaticus*. Sedangkan dua isolat lainnya yaitu isolat RBP-52 dan PD5 merupakan spesies yang sama, yaitu *Acetobacter liquefaciens*. Berdasarkan hal ini, maka pada tahap produksi selulosa menggunakan media modifikasi HS (Hestrin dan Schramm), digunakan dua isolat yang termasuk genus *Acetobacter*, yaitu isolat RBP-52 dan PD5.

B. MODIFIKASI MEDIUM HESTRIN DAN SCHRAMM (HS)

Pemilihan medium untuk pertumbuhan dan pembentukan produk adalah suatu langkah kunci untuk menjamin berhasilnya suatu produksi. Komponen-komponen kimiawi medium harus dapat mensuplai kebutuhan elemen untuk pembentukan massa sel dan produk, serta harus dapat mensuplai energi yang tepat untuk sintesis dan pemeliharaan. Medium juga harus mengandung kebutuhan nutrisi spesifik, misalnya vitamin-vitamin dan mineral-mineral. Pembuatan medium HS termodifikasi dilakukan berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa, meliputi kadar protein, kadar gula total, kadar abu dan kadar mineral. Air kelapa yang digunakan untuk analisis adalah air kelapa segar yang belum mengalami penundaan cukup lama, yaitu paling lama tiga hari setelah dikeluarkan dari buah kelapa, sehingga belum mengalami perubahan komposisi. Hasil analisis komposisi air kelapa dapat dilihat pada Tabel 6. Data tersebut merupakan hasil rata-rata dari lima sampel air kelapa yang diperoleh dari

lima pasar di Bogor, yaitu Pasar Gunung Batu, Pasar Ciampea, Pasar Anyar, Pasar Bogor dan Pasar Ramayana.

Tabel 6. Hasil analisis komposisi air kelapa

Komponen	Jumlah (b/v)
Kadar gula total	1,77%
Kadar protein nitrogen	0,24% 0,04%
Kadar Abu	0,47%
kalium (K)	1460,00 ppm (0,15%)
natrium (Na)	528,00 ppm (0,05%)
kalsium (Ca)	152,05 ppm (0,015%)
magnesium (Mg)	95,40 ppm (0,01%)

Dalam penelitian ini digunakan dua macam sumber nitrogen, yaitu sumber nitrogen organik terdiri dari bacto-pepton dan ekstrak khamir, serta amonium sulfat sebagai sumber nitrogen anorganik. Menurut Embuscado *et al.* (1994), kombinasi sumber nitrogen organik dan anorganik menunjukkan peningkatan yang jelas dari segi hasil jika dibandingkan dengan penggunaan sumber nitrogen anorganik saja. Sedangkan Mashudi (1993) menyebutkan bahwa penggunaan 0,4 % amonium sulfat dari total medium dapat meningkatkan hasil. Dalam pembuatan medium HS termodifikasi digunakan 0,4 % amonium sulfat sebagai faktor tetap dalam mengkombinasikan sumber nitrogen. Sedangkan bacto-pepton dan ekstrak khamir digunakan sebagai pengganti sumber nitrogen yang terdapat pada air kelapa.

Berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa, diperoleh kadar protein air kelapa sebesar 0,24 % atau kadar nitrogen sebesar $0,24\%/6,25 = 0,04\%$. Dalam penelitian ini digunakan tiga taraf faktor kombinasi sumber nitrogen,

yaitu : (1) 0,4 % amonium sulfat (b/v) + (ekstrak khamir : bacto-pepton, 1 : 1), (2) 0,4 % amonium sulfat (b/v) + bacto-pepton, dan (3) 0,4 % amonium sulfat (b/v) + ekstrak khamir. Kadar protein ekstrak khamir adalah 61,25 % atau $61,25\%/6,25 = 9,8\%$ kadar nitrogen (E. Marck Darmstadt Bereich Labour, 1995 di dalam Cahyati, 1998), maka dengan perhitungan matematis diperoleh hasil bahwa untuk memperoleh 0,02 % nitrogen dari ekstrak khamir, maka ke dalam media harus ditambahkan $0,02\% \times 100/9,8 = 0,2\%$ ekstrak khamir, dan untuk mendapatkan 0,04 % nitrogen dari ekstrak khamir maka ke dalam media harus ditambahkan $0,04\% \times 100/9,8 = 0,4\%$ ekstrak khamir. Demikian pula perhitungan persentase bacto-pepton yang harus ditambahkan ke dalam media, dengan asumsi bahwa kandungan protein bacto-pepton sama dengan kandungan protein ekstrak khamir. Maka dengan demikian diperoleh tiga kombinasi sumber nitrogen dalam media modifikasi HS (Hestrin dan Schramm), yaitu : (A1) 0,4 % amonium sulfat + 0,2 % ekstrak khamir + 0,2 % bacto-pepton (b/v), (A2) 0,4 % amonium sulfat + 0,4 % bacto-pepton (b/v), dan (A3) 0,4 % amonium sulfat + 0,4 % ekstrak khamir (b/v).

Berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa, diperoleh kadar gula total sebesar 1,77 %, sedangkan menurut Mashudi (1993), kadar karbohidrat air kelapa adalah 1,92 %. Konsentrasi glukosa yang digunakan dalam medium HS adalah sebesar 2 %. Karena jenis dan konsentrasi sumber karbon tidak berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa (Hernawati, 1998), maka dalam media modifikasi ini tetap digunakan 2 % glukosa sebagai sumber karbon, dan nilai ini

digunakan sebagai faktor tetap. Konsentrasi asam sitrat sebesar 0,115 % yang digunakan dalam medium HS juga digunakan dalam media modifikasi sebagai faktor tetap.

Hasil analisis dari kandungan mineral air kelapa menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada kandungan mineral air kelapa menurut Ketaren dan Djatmiko (1985), yaitu rata-rata sekitar setengah kali. Menurut Ketaren dan Djatmiko (1985), kadar Kalium (K) dalam air kelapa sebesar 3120 ppm (0,312 %), Natrium (Na) sebesar 1050 ppm (0,105 %), Kalsium (Ca) sebesar 290 ppm (0,029 %) dan Magnesium (Mg) sebesar 300 ppm (0,030 %). Dalam penelitian ini digunakan tiga macam kombinasi sumber mineral, yaitu kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi berdasarkan hasil analisis kadar mineral air kelapa, kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi setengah dari hasil analisis, dan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi dua kali dari hasil analisis.

Pada penelitian ini digunakan KH_2PO_4 sebagai sumber kalium (K), Na_2HPO_4 sebagai sumber natrium (Na), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber magnesium (Mg), dan CaCO_3 sebagai sumber kalsium (Ca). Persentase penggunaan senyawa-senyawa tersebut dihitung dengan cara mengkonversi persentase unsur ke dalam persentase senyawa menggunakan metoda stoikiometri. Contoh perhitungannya adalah sebagai berikut : berat molekul (Mr) $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,1$ g/mol, sedangkan berat atom (Ar) K (kalium) = 39,1 g/mol. Kadar K dari hasil analisis mineral air kelapa = 0,15 %. Maka untuk mendapatkan 0,15 % K, ke dalam medium harus ditambahkan 0,52 % KH_2PO_4 ,

dimana $0,15 \% K = 0,15 \% \times (136,1/39,1) = 0,52 \%$. Dengan menggunakan perhitungan seperti di atas, maka untuk mendapatkan kadar mineral dengan konsentrasi yang sama dengan kadar mineral air kelapa, ke dalam media harus ditambahkan KH_2PO_4 $0,52 \%$, Na_2HPO_4 $0,154 \%$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,1 \%$ dan $CaCO_3$ $0,038 \%$. Jadi tiga taraf kombinasi sumber mineral yang digunakan dalam penelitian ini adalah : (B1) $0,52 \% KH_2PO_4 + 0,154 \% Na_2HPO_4 + 0,1 \% MgSO_4 \cdot 7H_2O + 0,038 \% CaCO_3$ untuk penggunaan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi yang sama dengan hasil analisis kadar mineral air kelapa , (B2) $0,26 \% KH_2PO_4 + 0,077 \% Na_2HPO_4 + 0,05 \% MgSO_4 \cdot 7H_2O + 0,019 \% CaCO_3$ untuk penggunaan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi setengah dari hasil analisis kadar mineral air kelapa, dan (B3) $1,04 \% KH_2PO_4 + 0,309 \% Na_2HPO_4 + 0,2 \% MgSO_4 \cdot 7H_2O + 0,075 \% CaCO_3$ untuk penggunaan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi dua kali dari hasil analisis kadar mineral air kelapa.

Dengan mengkombinasikan tiga taraf faktor kombinasi sumber nitrogen dan tiga taraf faktor kombinasi sumber mineral berdasarkan perhitungan di atas, maka diperoleh 9 (sembilan) macam media modifikasi HS. Komposisi media modifikasi HS dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Komposisi Media Modifikasi HS (Hestrin dan Schramm)

Komponen	Media 1 (A1B1)	Media 2 (A1B2)	Media 3 (A1B3)	Media 4 (A2B1)	Media 5 (A2B2)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %
Glukosa	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %
Asam sitrat	0,115 %	0,115 %	0,115 %	0,115 %	0,115 %
Bacto-pepton	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,4 %	0,4 %
Ekstrakkhamir	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0%	0%
KH ₂ PO ₄	0,52 %	0,26 %	1,04 %	0,52 %	0,26 %
Na ₂ HPO ₄	0,154 %	0,077 %	0,309 %	0,154 %	0,077 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 %	0,05 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %
CaCO ₃	0,038 %	0,019 %	0,075 %	0,038 %	0,019 %
Komponen	Media 6 (A2B3)	Media 7 (A3B1)	Media 8 (A3B2)	Media 9 (A3B3)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	
Glukosa	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %	
Asam sitrat	0,115 %	0,115 %	0,115 %	0,115 %	
Bacto-pepton	0,4 %	0%	0%	0%	
Ekstrakkhamir	0%	0,4 %	0,4 %	0,4 %	
KH ₂ PO ₄	1,04 %	0,52 %	0,26 %	1,04 %	
Na ₂ HPO ₄	0,309 %	0,154 %	0,077 %	0,309 %	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,2 %	
CaCO ₃	0,075 %	0,038 %	0,019 %	0,075 %	

Keterangan : A : Kombinasi Sumber Nitrogen

A1 : 0,4 % (NH₄)₂SO₄ + 0,2 % bacto-pepton + 0,2 % ekstrak khamir (b/v)

A2 : 0,4 % (NH₄)₂SO₄ + 0,4 % bacto-pepton (b/v)

A3 : 0,4 % (NH₄)₂SO₄ + 0,4 % ekstrak khamir (b/v)

B : Kombinasi Sumber Mineral

B1 : 0,52 % KH₂PO₄ + 0,154 % Na₂HPO₄ + 0,1 % MgSO₄.7H₂O + 0,038 % CaCO₃ (b/v)

B2 : 0,26 % KH₂PO₄ + 0,077 % Na₂HPO₄ + 0,05 % MgSO₄.7H₂O + 0,019% CaCO₃ (b/v)

B3 : 1,04 % KH₂PO₄ + 0,309 % Na₂HPO₄ + 0,2 % MgSO₄.7H₂O + 0,075 % CaCO₃ (b/v)

C. PRODUKSI SELULOSA BAKTERI PADA MEDIUM HS (HESTRIN DAN SCHRAMM) DAN MODIFIKASINYA

Pada tahap produksi digunakan medium HS (Hestrin dan Schramm) dan 9 (sembilan) macam media modifikasi yang diperoleh dengan cara memodifikasi

medium HS berdasarkan hasil analisis komposisi air kelapa. Pengamatan dilakukan terhadap perolehan selulosa, kadar gula sisa dan pH akhir medium. Data keseluruhan untuk perolehan selulosa, kadar gula sisa dan pH akhir medium oleh isolat PD5 dan RBP-52 dapat dilihat pada Tabel 8 dan 9.

Tabel 8. Nilai perolehan selulosa, kadar gula sisa dan pH akhir medium oleh isolat PD5

Media	kadar gula sisa (g/l)	Yield (g/l)	pH akhir
HS	3,296	1,343	3,722
A1B1	2,068	1,355	3,418
A1B2	2,636	2,346	3,238
A1B3	4,296	1,740	3,710
A2B1	2,482	0,171	3,480
A2B2	1,494	0,308	3,650
A2B3	3,849	0,104	3,692
A3B1	3,124	2,252	3,772
A3B2	0,486	0,642	3,460
A3B3	1,945	0,864	3,605

Tabel 9. Nilai perolehan selulosa, kadar gula sisa dan pH akhir medium oleh isolat RBP-52

Media	kadar gula sisa (g/l)	Yield (g/l)	pH akhir
HS	4,142	1,562	3,422
A1B1	4,466	1,736	3,202
A1B2	4,907	0,486	3,218
A1B3	5,063	0,990	3,450
A2B1	7,938	0,244	3,212
A2B2	1,958	0,204	3,788
A2B3	1,278	0,234	3,722
A3B1	4,032	1,000	3,240
A3B2	5,017	0,599	3,175
A3B3	1,878	1,170	3,508

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa selulosa yang dapat dibentuk oleh isolat PD5 dan RBP-52 berbeda-beda pada masing-masing media yang

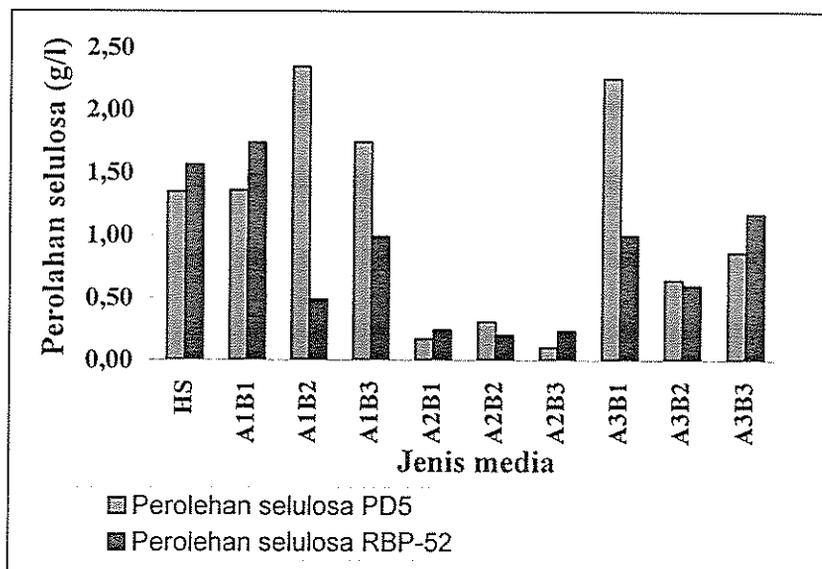
digunakan. Hal ini menunjukkan adanya korelasi antara jenis media yang digunakan dengan selulosa yang dihasilkan. Pada jenis media yang sama, selulosa yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan aktivitas masing-masing strain baik dalam produksi selulosa maupun aktivitas metabolismenya, meskipun masih merupakan satu spesies, yaitu *Acetobacter liquefaciens*. Dari data tersebut, yang paling mencolok adalah perolehan selulosa yang relatif sangat rendah pada media yang menggunakan bacto-pepton sebagai sumber nitrogen organik bila dibandingkan dengan jenis media lainnya, yaitu pada media A2B1, A2B2 dan A2B3. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan bacto-pepton saja sebagai sumber nitrogen organik meskipun dikombinasikan dengan penggunaan amonium sulfat sebagai sumber nitrogen anorganik, kurang disukai oleh kedua isolat tersebut. Ekstrak khamir lebih disukai kemungkinan karena selain sebagai sumber nitrogen organik juga merupakan sumber vitamin B yang kaya.

Proses kultivasi menggunakan isolat PD5 pada medium HS, menghasilkan selulosa sebesar 1,343 g/l. Pada kultivasi menggunakan isolat PD5 pada media HS termodifikasi, peningkatan yang cukup berarti diperoleh pada kultivasi menggunakan media modifikasi A1B2, A1B3, dan A3B1, yaitu terjadi peningkatan perolehan selulosa masing-masing sebesar 74,6 %, 29,85 % dan 68 % jika dibandingkan dengan selulosa yang diperoleh dari kultivasi menggunakan medium HS. Peningkatan perolehan selulosa tertinggi, yaitu sebesar 74,6 % atau perolehan selulosa tertinggi sebesar 2,346 g/l diperoleh pada

kultivasi menggunakan media modifikasi A1B2 (media dengan 0,4 % amonium sulfat, 0,2 % bacto-pepton, 0,2 % ekstrak khamir sebagai sumber nitrogen serta sumber mineral dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ x konsentrasi mineral air kelapa), kemudian diikuti oleh media modifikasi A3B1 (0,4 % amonium sulfat + 0,4 % ekstrak khamir; konsentrasi mineral sama dengan konsentrasi mineral air kelapa) dengan perolehan selulosa sebesar 2,252 g/l. Sedangkan peningkatan sebesar 29,85 % atau perolehan selulosa sebesar 1,740 g/l diperoleh dari media modifikasi A1B3 (0,4 % amonium sulfat + 0,2 % bacto-pepton + 0,2 % ekstrak khamir; konsentrasi mineral 2x konsentrasi mineral air kelapa). Media modifikasi A1B1 memberikan hasil yang relatif sama dengan hasil kultivasi menggunakan medium HS, yaitu sebesar 1,355 g/l. Pada kultivasi menggunakan isolat RBP-52 dan medium HS, diperoleh selulosa sebesar 1,562 g/l. Pada kultivasi menggunakan media modifikasi HS, peningkatan perolehan selulosa hanya sebesar 11,5 %, yaitu pada media modifikasi A1B1 dengan perolehan selulosa sebesar 1,736 g/l. Media modifikasi A1B1 adalah media dengan 0,4 % amonium sulfat, 0,2 % bacto-pepton dan 0,2 % ekstrak khamir sebagai sumber nitrogen serta konsentrasi sumber mineral sama dengan konsentrasi mineral air kelapa. Histogram perolehan selulosa yang dihasilkan oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada masing-masing media dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan analisa keragaman ($\alpha=0,5$) diketahui bahwa pada kultivasi menggunakan isolat PD5, faktor kombinasi sumber nitrogen dan mineral serta interaksi antara keduanya berbeda nyata terhadap perolehan selulosa yang

dihasilkan. Pada kultivasi menggunakan isolat RBP-52, hasil analisa keragaman ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa kombinasi sumber nitrogen dan mineral serta perbedaan efek bersama antara keduanya terhadap perolehan selulosa yang dihasilkan juga mempunyai efek yang berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa antara faktor kombinasi sumber mineral dan kombinasi sumber nitrogen, satu sama lain saling mempengaruhi terhadap perolehan selulosa yang dihasilkan untuk kedua jenis isolat yang digunakan.



Gambar 3. Histogram perolehan selulosa oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media

Secara keseluruhan, penggunaan sumber mineral memberikan pengaruh yang nyata terhadap perolehan selulosa oleh kedua isolat. Pengaruh yang ditimbulkan oleh logam-logam yang digunakan saling terkait sedemikian hingga konsentrasi yang tepat dari suatu logam bergantung kepada konsentrasi logam-logam lain yang juga terdapat dalam media. Menurut Gumbira-Sa'id (1987), K dan Mg secara erat berkaitan dengan kandungan asam nukleat sel. Maka

penggunaan K dan Mg dalam jumlah yang cukup akan mampu menyokong pertumbuhan jumlah sel yang semakin meningkat. Ion Mg^{2+} yang terakumulasi dalam media dapat berfungsi sebagai kofaktor pada reaksi fosforilasi yang dikatalisasikan oleh enzim suksinil tiokinase. Perubahan energi disimpan dengan cara menggabungkan reaksi fosforilasi tersebut dengan pembentukan suksinat. Satu molekul ATP per pembentukan suksinat merupakan satu-satunya tempat di dalam daur TCA Krebs dimana ATP secara langsung dihasilkan. Proses ini disebut *fosforilasi tingkat substrat* (Page, 1989). ATP merupakan suatu zat yang kaya energi untuk digunakan dalam reaksi biosintesis selulosa yang memerlukan energi. Penggunaan logam-logam K, Na, Ca dan Mg dalam bentuk senyawa-senyawanya memberikan keuntungan lain, contohnya dengan menyesuaikan kebutuhan magnesium, maka kebutuhan sulfur dapat pula dipenuhi dalam penggunaan $MgSO_4$ sebagai sumber magnesium. Natrium bersama dengan kalsium, magnesium dan kalium mempunyai reaksi alkalis, sedangkan fosfat, karbonat, sulfat, bersama-sama dengan asam-asam organik dan protein mempunyai reaksi asam (Winarno, 1995). Ion K^+ yang terakumulasi dalam media juga dapat berperan sebagai kofaktor dalam aktivitas enzim.

Pengujian lebih lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa pada kultivasi menggunakan isolat PD5, media modifikasi A1B2 memberikan perolehan selulosa yang secara signifikan lebih baik dibandingkan media modifikasi lainnya, yaitu sebesar 2,346 g/l. Namun antara media modifikasi A1B2 dan A3B1 memberikan hasil yang tidak berbeda

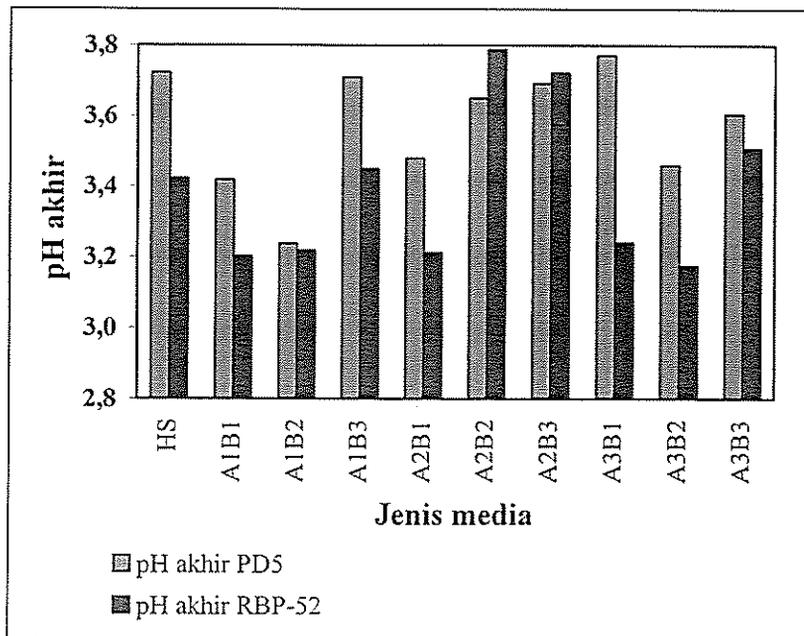
nyata. Jadi media modifikasi dengan kombinasi sumber nitrogen terdiri dari 0,4 % amonium sulfat, 0,2 % bacto-pepton, dan 0,2 % ekstrak khamir serta kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi setengah dari konsentrasi mineral air kelapa memberikan hasil yang tidak berbeda nyata dengan media modifikasi yang menggunakan kombinasi sumber nitrogen terdiri dari 0,4 % amonium sulfat dan 0,4 % ekstrak khamir serta kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi mineral air kelapa. Media modifikasi A1B3 dan A1B1 memberikan hasil yang tidak berbeda secara signifikan. Jadi penggunaan kombinasi sumber nitrogen yang sama pada kedua media tersebut, yaitu 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,2 % ekstrak khamir + 0,2 % bacto-pepton serta kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi mineral air kelapa untuk media modifikasi A1B1 dan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi dua kali konsentrasi mineral air kelapa untuk media modifikasi A1B3 memberikan hasil yang tidak berbeda. Namun penggunaan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi dua kali konsentrasi mineral air kelapa pada media modifikasi A1B3 masih memberikan perolehan selulosa yang lebih tinggi, yaitu 1,740 g/l sedangkan perolehan selulosa pada media modifikasi A1B1 sebesar 1,355 g/l. Hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$) pada kultivasi menggunakan isolat RBP-52 menunjukkan perolehan selulosa tertinggi yaitu sebesar 1,737 g/l dihasilkan pada media modifikasi A1B1, yaitu media dengan kombinasi sumber nitrogen terdiri dari 0,4% amonium sulfat, 0,2 % bacto-pepton, 0,2 % ekstrak khamir dan kombinasi sumber mineral dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi

mineral air kelapa. Nilai ini memberikan hasil yang secara signifikan lebih baik dibandingkan media lainnya. Namun peningkatannya hanya sekitar 11,5 % jika dibandingkan dengan kultivasi isolat RBP-52 menggunakan medium HS pada kondisi kultivasi yang sama.

D. PENGARUH JENIS MEDIA TERHADAP pH AKHIR MEDIUM KULTIVASI

Pengukuran pH merupakan parameter yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk. Karena sangat pentingnya pH maka sebagian besar proses kultivasi dikendalikan dengan cara buffer atau suatu sistem pengendali pH. Sistem pengendali pH sulit dilakukan dalam wadah kultivasi yang berbentuk jar gelas, maka dalam kultivasi ini digunakan asam sitrat dan buffer fosfat untuk mencegah terjadinya perubahan pH secara drastis. Selama berlangsungnya kultivasi, pH bertendensi untuk berubah oleh berbagai sebab. Berdasarkan hasil pengukuran pH akhir medium, diketahui bahwa nilai pH akhir medium pada kultivasi menggunakan isolat PD5 dan RBP-52 menurun untuk semua jenis media yang digunakan. Penurunan pH ini dapat disebabkan oleh penggunaan amonia sebagai sumber nitrogen. Amonia dalam larutan berwujud sebagai NH_4^+ . Mikroorganisme menggabungkannya ke dalam sel sebagai R-NH_3^+ , dengan R sebagai kerangka karbon. Dalam proses, H^+ ditinggalkan dalam medium. Keadaan lain yang menyebabkan perubahan pH adalah terbentuknya asam-asam organik seperti asam glukonat, asam laktat, asam asetat atau piruvat.

Analisa keragaman ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa pada isolat PD5, kombinasi sumber nitrogen tidak berpengaruh terhadap pH akhir. Sedangkan kombinasi sumber mineral dan interaksi antara kombinasi sumber nitrogen dan kombinasi sumber mineral berpengaruh nyata terhadap pH akhir medium. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan sumber nitrogen secara tersendiri tidak berpengaruh terhadap pH akhir cairan kultivasi, dan antara masing-masing taraf dalam kombinasi sumber nitrogen yang digunakan tidak berbeda nyata. Namun, jika penggunaannya bersama-sama dengan sumber mineral akan memberikan pengaruh yang nyata terhadap pH akhir cairan kultivasi. Pada isolat RBP-52, kombinasi sumber nitrogen, kombinasi sumber mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap penurunan pH. Hal ini dapat disebabkan oleh terbentuknya ion-ion dalam cairan selama kultivasi berlangsung sehingga menyebabkan penurunan pH yang bervariasi, antara lain terbentuknya ion SO_4^{2-} yang bersifat asam dari penggunaan amonium sulfat dan magnesium sulfat yang berlebihan. Namun penggunaan sumber mineral yang dikombinasikan pada konsentrasi tinggi menyebabkan pH cairan relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan penggunaan pada konsentrasi rendah. Hal ini dapat disebabkan oleh terbentuknya ion-ion yang bersifat basa sehingga penurunan pH cairan kultivasi tidak terlalu drastis. Penurunan pH medium secara drastis menyebabkan kondisi fermentasi akan terlalu asam dan mengganggu aktivitas bakteri *A. liquefaciens*. Nilai pH akhir oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Histogram pH akhir medium oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media

Hasil pengukuran pH akhir medium pada kultivasi oleh isolat PD5 berada pada kisaran 3,33-3,77, dari nilai pH awal 5,00. Sedangkan pada isolat RBP-52 nilai pH akhir berada pada kisaran 3,18-3,79. Jadi pH akhir medium pada kedua isolat tersebut berada di bawah 4. Penurunan pH ini dapat disebabkan oleh terbentuknya ion-ion yang bersifat asam dalam medium lebih dominan dibandingkan dengan ion-ion yang bersifat basa. Pembentukan asam glukonat dari glukosa juga menurunkan pH medium. Menurut Geyer *et al.* (1994), setelah 5-6 hari kultivasi, glukosa sebagai sumber karbon menjadi berkurang dan mulai terjadi asimilasi pembentukan asam-asam oleh bakteri. Fenomena ini dan akumulasi ion-ion amonia yang berlebih dalam media menyebabkan penurunan nilai pH pada akhir kultivasi. Hasil penelitian

Embuscado *et al.* (1994) menyebutkan bahwa media dengan glukosa sebagai sumber karbon akan mengalami penurunan pH dari 5,0 menjadi 3,0. Pada kisaran pH medium seperti di atas, sintesa selulosa menjadi terhambat karena suasana yang terlalu asam akan mengurangi aktifitas bakteri *A. liquefaciens*. Menurut Masaoka *et al.*(1993), kisaran pH optimum untuk produksi selulosa adalah 4.0 - 6.0. Dan menurut Embuscado *et al.* (1994), selulosa tidak diproduksi pada pH 3,5.

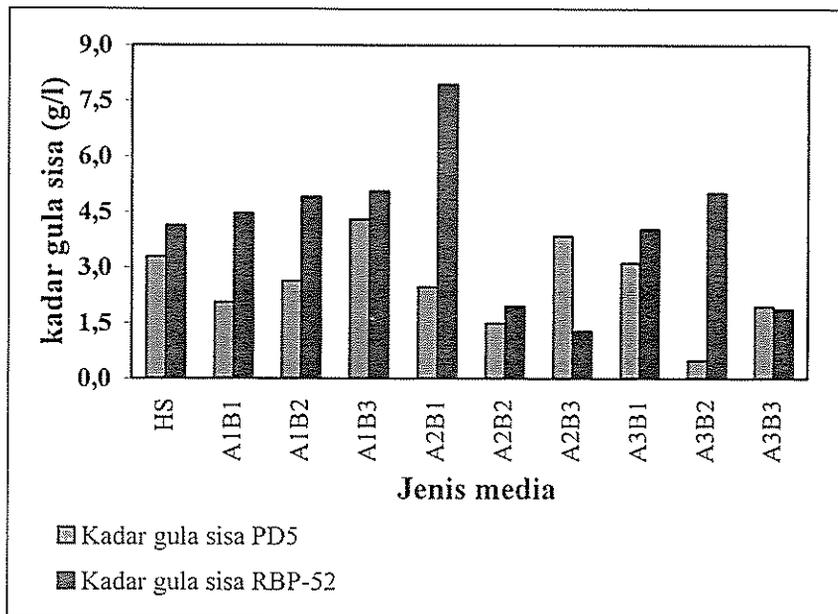
E. PENGARUH JENIS MEDIA TERHADAP KADAR GULA SISA PADA MEDIUM KULTIVASI

Pada pengukuran kadar gula sisa menggunakan metoda DNS, kadar gula yang terukur adalah gula pereduksi. Pada medium kultivasi, gula yang digunakan adalah glukosa sehingga hasil pengukuran kadar gula sisa menunjukkan jumlah glukosa yang masih terakumulasi dalam medium karena tidak digunakan oleh bakteri untuk sintesis selulosa maupun untuk aktivitas metabolismenya. Berdasarkan hasil pengukuran kadar gula sisa, diketahui bahwa kisaran nilai kadar gula sisa pada kultivasi menggunakan isolat RBP-52 relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kultivasi menggunakan isolat PD5. Hal ini menunjukkan bahwa glukosa yang dikonversi menjadi selulosa relatif lebih tinggi pada kultivasi menggunakan isolat PD5 atau dengan kata lain nilai perolehan selulosanya relatif lebih tinggi. Kadar gula sisa yang berbeda-beda dapat disebabkan oleh kemampuan masing-masing isolat untuk menkonversi glukosa

menjadi selulosa yang berbeda-beda pada masing-masing media. Nilai kadar gula sisa yang relatif tinggi dapat disebabkan oleh adanya keterbatasan jumlah konsumsi glukosa sebagai sumber karbon oleh bakteri sehingga dapat dicoba penggunaan persentase glukosa yang lebih rendah dari 2 %. Waktu kultivasi yang dibatasi selama 7 hari dapat pula menyebabkan bakteri tersebut belum menggunakan seluruh glukosa yang tersedia dalam medium sehingga glukosa yang tidak digunakan untuk sintesis selulosa dibiarkan terakumulasi pada media atau terurai menjadi produk metabolit lainnya.

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa kombinasi sumber nitrogen dan kombinasi sumber mineral serta interaksi antara keduanya berbeda nyata terhadap kadar gula sisa pada cairan fermentasi. Hal ini berlaku baik pada kultivasi menggunakan isolat PD5 maupun isolat RBP-52. Nilai kadar gula sisa oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media dapat dilihat pada Gambar 5.

Nilai kadar gula sisa sangat tergantung pada perolehan selulosa yang dihasilkan. Pada penggunaan glukosa dengan konsentrasi yang sama, maka nilai perolehan selulosa yang lebih tinggi umumnya akan menghasilkan kadar gula sisa yang lebih rendah karena jumlah glukosa yang terkonversi menjadi selulosa lebih banyak dibandingkan dengan nilai perolehan selulosa yang lebih rendah. Namun hal ini hanya berlaku untuk jenis media yang sama dan tidak dapat dibandingkan untuk jenis media yang berbeda.



Gambar 5. Histogram kadar gula sisa oleh isolat PD5 dan RBP-52 pada berbagai jenis media

Nilai kadar gula sisa juga berkorelasi dengan pH medium. Pada kultivasi yang menghasilkan perolehan selulosa yang tinggi, berarti bahwa glukosa yang ada pada media lebih banyak digunakan untuk sintesis selulosa daripada untuk pembentukan asam glukonat, sehingga nilai pH akhir pada cairan kultivasi lebih tinggi dibandingkan dengan kultivasi yang menghasilkan perolehan selulosa yang lebih rendah pada medium kultivasi yang sama. Hal ini berarti bahwa untuk jenis media yang sama, semakin tinggi perolehan selulosa, kadar gula sisa semakin rendah, dan pH akhir semakin tinggi. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah perolehan selulosa, kadar gula sisa semakin tinggi dan pH akhir semakin rendah karena glukosa yang ada pada media lebih banyak digunakan untuk metabolisme glukosa menjadi asam glukonat.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Isolat RBP-52 dan PD5 merupakan spesies *Acetobacter liquefaciens*, sedangkan RBP-34 bukan dari genus *Acetobacter*. RBP-52 diisolasi dari limbah cair pabrik nata di daerah Ciampea sedangkan PD5 diisolasi dari daging buah kelapa di daerah Parung.

Dari hasil analisis komposisi air kelapa, diperoleh kadar protein sebesar 0,24 %, kadar abu sebesar 0,47 % dan kadar gula total sebesar 1,77 %, sedangkan kandungan mineral air kelapa terdiri dari kalium (K) sebesar 1460,00 ppm (0,15 %), natrium (Na) sebesar 528,00 ppm (0,05 %), kalsium (Ca) sebesar 152,05 ppm (0,015 %) dan magnesium (Mg) sebesar 95,4 ppm (0,01 %).

Proses kultivasi pada isolat PD5 menggunakan medium HS memberikan perolehan selulosa sebesar 1,343 g/l. Pada kultivasi menggunakan media modifikasi HS, perolehan selulosa yang lebih tinggi dari hasil kultivasi pada medium HS diperoleh pada media modifikasi A1B2, A3B1, A1B3 dan A1B1, yaitu masing-masing 2,346 g/l, 2,252 g/l, 1,740 g/l dan 1,355 g/l. Proses kultivasi pada isolat RBP-52 menggunakan medium HS memberikan perolehan selulosa sebesar 1,562 g/l, sedangkan perolehan selulosa yang lebih besar pada media modifikasi diperoleh pada media modifikasi A1B1 dengan perolehan selulosa sebesar 1,736 g/l.

Kombinasi sumber nitrogen, mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap perolehan selulosa untuk kedua jenis isolat. Pada isolat PD5, kombinasi sumber nitrogen tidak berpengaruh nyata terhadap pH akhir, sedangkan kombinasi sumber mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata. Pada isolat RBP-52, kombinasi sumber nitrogen, mineral, dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap pH akhir medium. pH akhir medium oleh isolat PD5 berada pada kisaran 3,33-3,77 dari nilai pH awal 5,00, sedangkan pada isolat RBP-52 berada pada kisaran 3,18-3,79. Pada isolat PD5 dan RBP-52, kombinasi sumber nitrogen, mineral dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap kadar gula sisa pada cairan kultivasi. Nilai kadar gula sisa berada pada kisaran 0,486-4,296 g/l pada produksi selulosa oleh isolat PD5, sedangkan pada isolat RBP-52 berada pada kisaran 1,278-7,938 g/l.

B. SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan :

- (1) penelitian lebih lanjut mengenai mutu selulosa serta alternatif penggunaannya berdasarkan tingkatan mutu selulosa yang dihasilkan, (2) kajian tekno-ekonomis dari penggunaan bahan-bahan kimia pada media modifikasi, dihubungkan dengan peningkatan perolehan selulosa yang dihasilkannya, dan (3) perlu dilakukan pengukuran laju pembentukan produk dan nisbah C/N ratio pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budiyanto. 1989. Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Breed, R.S., E.G.D. Murray dan N.R. Smith. 1957. Bergey's Manual Determinative of Bacteriology, 8 th ed. The Williams Co., London.
- Cahyati, A. 1998. Optimasi Media Sumber Karbon dan Nitrogen Pada Produksi Bahan Aktif. Skripsi. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fateta, Institut Pertanian Bogor.
- Embuscado, M.E., J.S. Marks dan J.N. Miller. 1994. Bacterial Cellulose I. Factor Affecting The Production of Cellulose by *A. xylinum*. Food Hydrocolloids Vol 8., USA.
- Fardiaz, S. 1989^a). Mikrobiologi Pangan I. Bahan Kuliah. Jurusan TPG, Fateta, IPB, Bogor.
- Fardiaz, S. 1989^b). Mikrobiologi Pangan I. Penuntun Praktek. Jurusan TPG, Fateta, IPB, Bogor.
- Geyer, U., D. Klemm and Schmauder. 1994. Kinetic of The Utilization of Different Carbon Source and The Cellulose Formation by *A. xylinum*. Acta Biotechnology.
- Gumbira-Sa'id, E. 1987. Bioindustri. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Hadioetomo, R.S. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Gramedia, Jakarta.
- Hartoto, L. 1992. Petunjuk Laboratorium, Teknologi Fermentasi. Depdikbud Dirjen Dikti PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Hassid, W.Z. 1967. Metabolic Pathways : Biosynthesis of Complex Saccharides. 3rd (ed) Vol. 1. Academic Press, NewYork & London.
- Hernawati, A. 1998. Kajian Pengaruh pH, Jenis dan Konsentrasi Sumber Karbon Pada Produksi Selulosa Oleh *A. Xylinum* 85-I. Skripsi Jurusan TIN, Fateta, IPB, Bogor.

- Hestrin, S. dan M. Schramm. 1954. Syntetic of Cellulose by *A. xylinum* Preparation of Freeze Dried Cell Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose Biochem. J. 58 : 345-352.
- Hwang, J.W. and Pyun, Y.R. 1998. Charaterization of Cellulose Producing Strains. Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul, Korea.
- Ketaren, S. dan B. Djatmiko. 1985. Daya Guna Hasil Kelapa. Jurusan TIN, Fateta, IPB.
- Lapuz, M.M., E.G. Gallardo dan M.A. Palo. 1967. The Nata Organism Culture Requirements, Characteristics and Identity. Philippine J of Sci : 96 (2) : 91-107.
- Masaoka, S., T. Ohe, N. Sakaota. 1993. Production of Cellulose from Glucose by *A. xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering vol 75.
- Mashudi. 1993. Mempelajari Pengaruh Penambahan Amonium Sulfat dan Waktu Penundaan Bahan Baku Air Kelapa Terhadap Pertumbuhan dan Struktur Gel Nata de coco. Skripsi. Jurusan TPG, Fateta, IPB.
- Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi, dan F. Yoshinaga. 1996. A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *A. xylinum* Subsp. *Sucrofermentans*. Bioscience Biotechnology Biochemistry Journal.
- Page, D.S. 1989. Prinsip-prinsip Biokimia. *Terjemahan* R. Soendoro. Erlangga, Jakarta.
- Riyanto. 1997. Kajian Kultivasi Mikrobial Secara Diam, Tergoyang dan Kombinasinya Untuk Produksi Selulosa Menggunakan Isolat 85-I. Skripsi. Jurusan TIN, Fateta IPB, Bogor.
- Ross, P., R. Mayer and M. Benziman. 1991. Microbial Review, 35-58.
- Satumino-Dimaguila, L.A. 1967. Studies on the "nata de coco" 2. Chemical and properties of "nata". Philippine Agric. 51 :475-485.
- Seto, A., Y. Kojima, N. Tonouchi, T. Tsuchida dan F. Yoshinaga. 1997. Screening of Bacterial Cellulose-producing *Acetobacter* Strains Suitable for Source as a Carbon Source. Biosci.Biotech.Biochem. J, 61(4), 735-736, Japan.
- Sjostrom, E. 1995. Kimia Kayu : Dasar-dasar dan Penggunaan. *Terjemahan* H. Sastrohamidjojo. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

- Swings, J. 1980. The Genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, New York.
- Tonouchi, N., T. Tsuchida, F. Yoshinaga, S. Horinouchi dan T. Beppu. 1994. A Host-Vector System for a Cellulose-producing *Acetobacter* Strain. *Biochem.* : 58 (10) : 1899-1901.
- Williams, W.S. dan R.E. Cannon. 1989. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produce by *A. xylinum* Applied and Environmental Microbiology. P.2448-2452. American Society for Microbiology, North Carolina.
- Winarno, F.G. 1995. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Yang, Y.K., J.W. Hwang, dan Y.R. Pyun. 1998. Screening of Cellulose of Indonesia Producing Strains from Indonesia Fruit Sample. BRC, Yonsei University, Seoul, Korea.
- Yoshino, T., T. Ashakura and K. Yoda. 1995. Cellulose Production by *Acetobacter Pasteurianus* on Silicone Membrane. Institute of Moleculer and Celluler Biosciences, The University of Tokyo, Japan.



Hak Cipta Hibridator/ Unsurpungsi

1. Diizinkan sebagai sebagian atau seluruh karya yang dapat dimanfaatkan dan diproses dengan syarat :
- a. Pengutipan harus untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penerbitan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan buku atau tulisan untuk masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengkomersialkan dan memperbanyak salinan atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

LAMPIRAN



Lampiran 1. Prosedur Perhitungan Kadar Protein Metoda Lowry (Lowry *et al.*, di dalam Hartoto, 1992)

a. Pembuatan Pereaksi

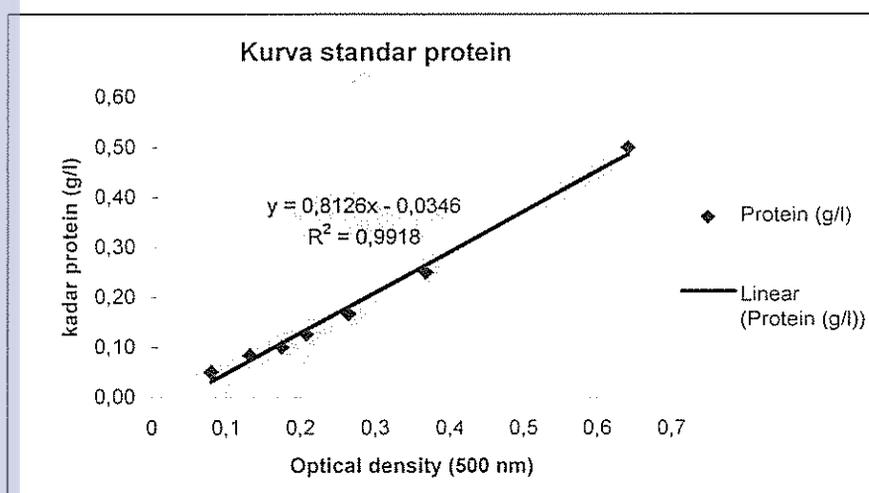
Analisa protein metoda Lowry menggunakan empat macam pereaksi yang terdiri dari : Pereaksi A : 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 0,1 N NaOH; Pereaksi B : 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 1 % Na-K-Tartarat; Pereaksi C : Campuran 50 ml pereaksi A dan 1 ml pereaksi B; Pereaksi D : folin ciocolateau dan air dengan perbandingan 1 : 1

b. Penetapan Kadar protein

Ke dalam 1 ml sampel ditambahkan 5 ml pereaksi C, diforteks, lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambah 0,5 ml pereaksi D, diforteks dan dibiarkan selama 30 menit. Kemudian diukur pada $\lambda = 500 \text{ nm}$ menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi protein dihitung berdasarkan kurva standar menggunakan protein BSA (bovin serum albumin). Prosedur penentuan protein standar sama dengan sampel.

Lampiran 1. Kurva standar protein

OD ₅₀₀	Protein (g/l)
0,641	0,500
0,367	0,250
0,264	0,167
0,208	0,125
0,175	0,100
0,132	0,083
0,080	0,050

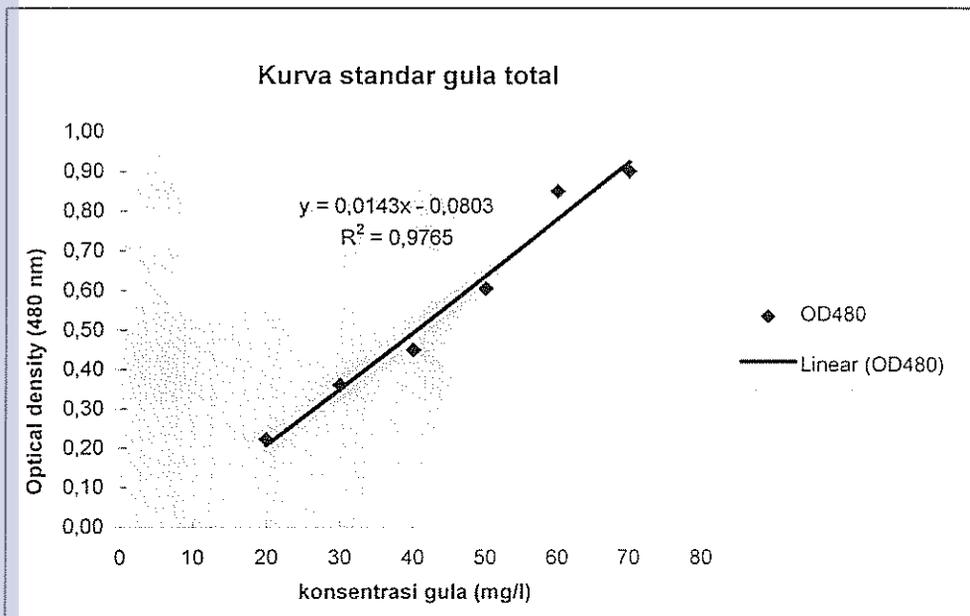


Lampiran 2. Prosedur Perhitungan Kadar Gula Total Metoda Phenol (Apriyantono *et al.*, 1989)

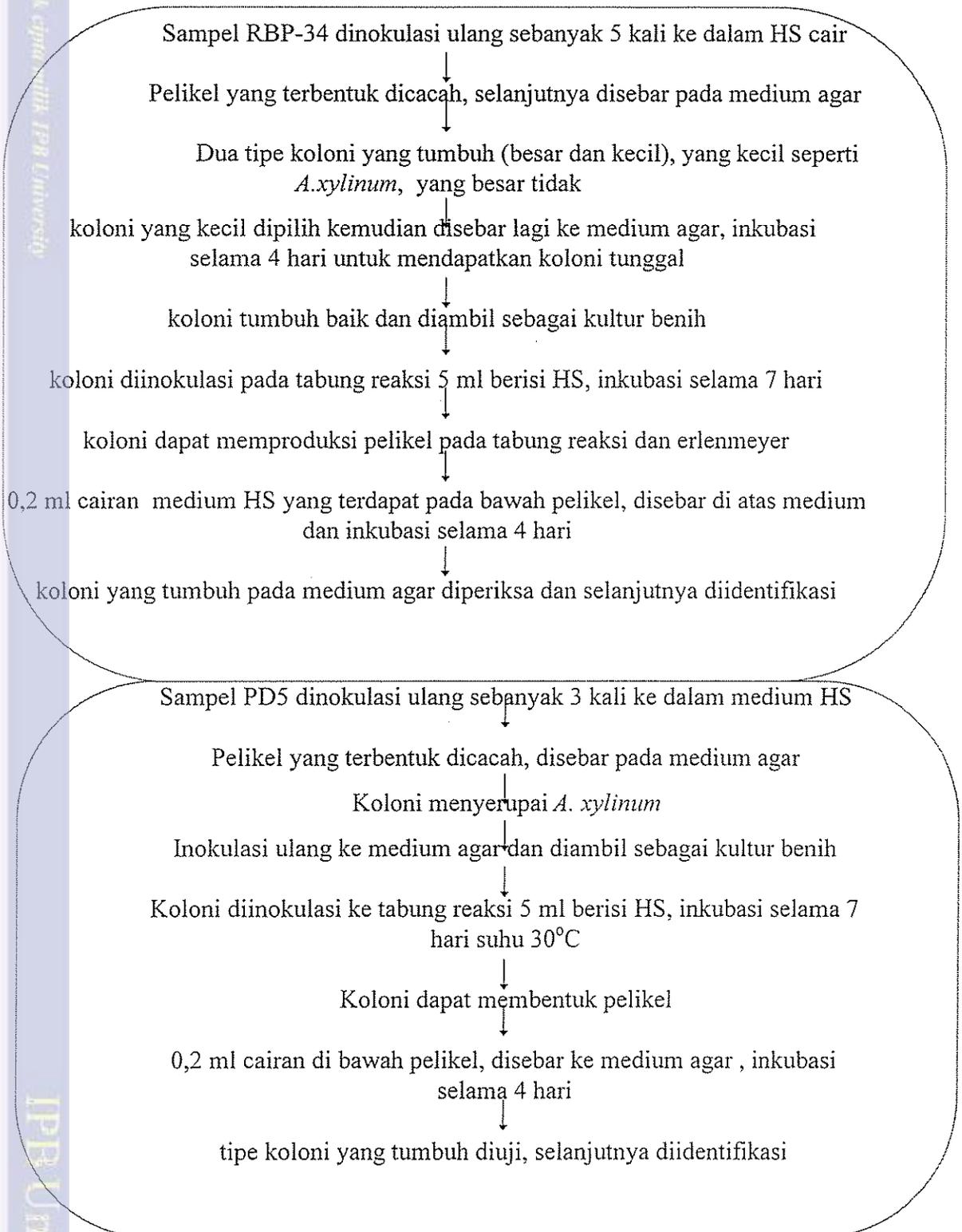
2 gram sampel ditimbang, dimasukkan ke dalam labu kocok 100 ml
↓
+ 10 ml Pb-acetat $\frac{1}{2}$ basa (2,5 % PbO + 2,5 % Pb-acetat, dipanaskan)
↓
+ NaHPO₄ 10 % (\pm 10 ml, sampai tidak ada endapan)
↓
dikocok, lalu dibiarkan mengendap sampai diperoleh cairan jernih
↓
2 ml sampel dipipet ke dalam tabung reaksi (dibuat blanko)
↓
+ 1 ml phenol 5 %
↓
+ 5 ml H₂SO₄ pekat
↓
diaduk, lalu dibiarkan dingin hingga suhu 25°C (set 10 menit)
↓
diukur pada $\lambda = 480$ nm dengan menggunakan spektrofotometer

Lampiran 2. Kurva standar gula total

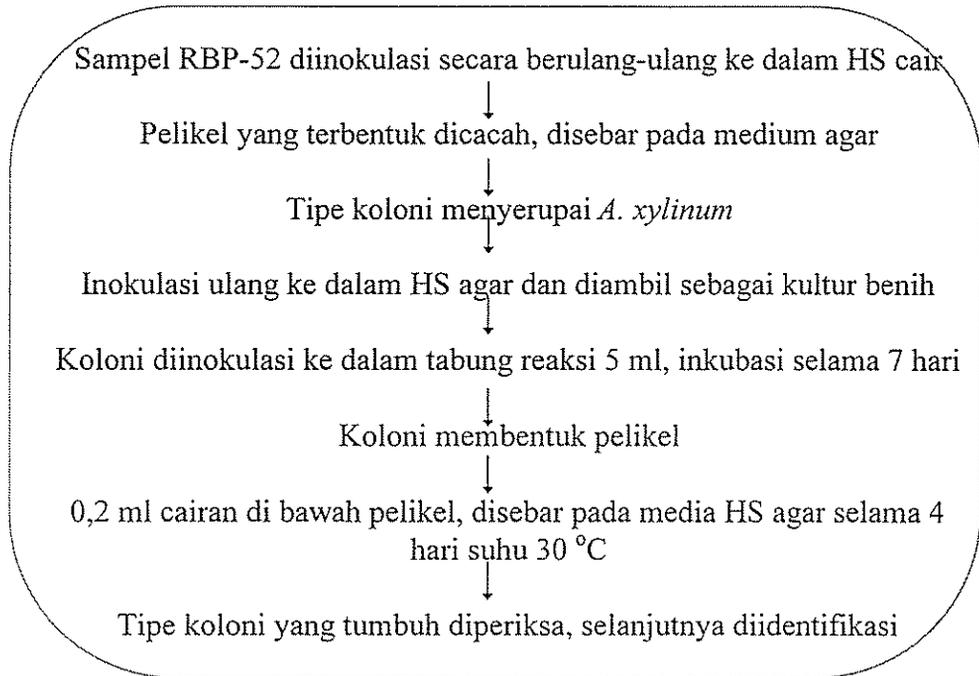
Konsentrasi Gula (mg/l)	OD ₄₈₀
20	0,222
30	0,360
40	0,450
50	0,605
60	0,850
70	0,900



Lampiran 3. Bagan alir isolasi isolat RBP-34, PD5 dan RBP-52



Lampiran 3. (lanjutan)



Lampiran 4. Perhitungan perolehan selulosa kering (Yang *et al.*, 1998)

Lempengan selulosa (pelikel) yang terbentuk pada media cair diambil dan dipindahkan ke dalam gelas piala, direndam dengan larutan NaOH 1 % selama 24 jam atau direbus sekitar 10 menit dalam larutan yang sama. Setelah 24 jam rendaman dinetralkan dengan asam asetat 1% sebanyak volume yang sama dengan NaOH. Dinetralkan selama 24 jam. Jika menggunakan cara perebusan, netralisasi dilakukan dengan cara menambahkan asam asetat dalam jumlah yang sama dan direbus selama 10 menit. Setelah netralisasi pelikel dicuci dengan air bersih kemudian dikemas dengan alumunium foil yang telah ditimbang terlebih dahulu. Selanjutnya dikeringkan dengan oven sampai kering. Pelikel kering ditimbang dengan alumunium foilnya dan dihitung perolehan selulosanya dengan perhitungan sebagai berikut :

$$Y = (Wt - W0)/V, \text{ dimana}$$

Y : *Yield* selulosa (gram/liter)

Wt : Bobot alumunium foil+ selulosa kering (gram)

W0 : Bobot alumunium foil awal (gram)

V : Volume media (liter)

Lampiran 5. Penentuan Kadar Gula Pereduksi DNS (Miller, 1959 *di dalam* Riyanto 1997)

a. **Penyiapan pereaksi DNS**

Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 10,6 gram asam 3,5 dinitrosalisilat dan 19,8 gram NaOH ke dalam 1416 ml aquades setelah ditambahkan 300 gram Na-K tartarat, 7,6 gram fenol yang dicairkan pada suhu 50 °C dan 8,3 gram Na—metabisulfit. Larutan ini diaduk rata, kemudian 3,0 ml larutan ini dititiasi dengan HCl 0,1 N. Titrasi ini seharusnya membutuhkan 5 – 6 ml HCl 0,1 N. Jika kurang dari nilai tersebut harus ditambahkan 2,0 gram NaOH untuk setiap kekurangan 0,1 HCl 0.1 N

b. **Penyiapan Contoh**

Untuk menentukan kadar gula dengan metode DNS, contoh yang diuji harus berupa cairan jernih. Oleh karena itu harus dilakukan pengendapan dan penghilangan warna terhadap contoh yang akan diuji. Sampel yang mengandung gula pereduksi ditambah dengan larutan Pb-asetat ½ basa tetes demi tetes untuk menghilangkan bahan-bahan seperti pigmen dan senyawa koloid. Kelebihan Pb diendapkan dengan penambahan natrium karbonat 8 persen. Setelah itu larutan contoh yang jernih ditambah dengan aquades sampai dengan tanda tera untuk menentukan tingkat pengenceran.

c. **Penetapan Kadar Gula**

Contoh yang telah jernih sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 ml pereaksi DNS dan dipanaskan dalam penangas air 100 °C selama 5 menit. Selanjutnya didinginkan sampai mencapai suhu ruang . Bila diperlukan, contoh diencerkan agar terukur pada kisaran 20 – 80 % transmitan pada panjang gelombang 550 nm.

Kurva standar dibuat dengan melarutkan glukosa dengan konsentrasi pada selang 0,2 – 0,5 mg/ml. Blanko dibuat dengan prosedur yang sama, tetapi menggunakan air aquades.

Lampiran 6. Analisis Keragaman Nilai Perolehan Selulosa Oleh Isolat PD5

Lampiran 6a. ANOVA untuk Nilai Perolehan Selulosa Oleh Isolat PD5

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	12,199	1,525	50,512	3,23	5,47
A	2	8,111	4,056	134,351	4,26	8,02
B	2	0,382	0,191	6,330	4,26	8,02
AB	4	3,705	0,926	30,684	3,63	6,42
Galat	9	0,272	0,030			
Total	17	12,470	0,734			

Lampiran 6b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1	1,813833	A	A
A3	1,252333	B	B
A2	0,1946667	C	C

Lampiran 6c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B1	1,259167	A	A
B2	1,098833	AB	AB
B3	0,9028333	B	B

Lampiran 6d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1B2	2,3465	A	A
A3B1	2,2515	AB	A
A1B3	1,74	BC	B
A1B1	1,355	CD	B
A3B3	0,864	DE	C
A3B2	0,6415	EF	CD
A2B2	0,3085	EF	DE
A2B1	0,171	F	E
A2B3	0,1045	F	E

Lampiran 7. Analisis Keragaman Nilai Perolehan Selulosa Oleh Isolat RBP-52

Lampiran 7a. ANOVA untuk Nilai Perolehan Selulosa Oleh Isolat RBP-52

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	4,274	0,534	9,772	3,23	5,47
A	2	1,929	0,964	17,643	4,26	8,02
B	2	0,970	0,485	8,870	4,26	8,02
AB	4	1,375	0,344	6,288	3,63	6,42
Galat	9	0,492	0,055			
Total	17	4,766	0,280			

Lampiran 7b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	Homogeneous groups	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A3	0,9228334	A	A
A1	0,9206667	A	A
A2	0,2273333	B	B

Lampiran 7c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	Homogeneous groups	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B1	0,9933333	A	A
B3	0,648	AB	B
B2	0,4295	B	B

Lampiran 7d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	Homogeneous groups	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1B1	1,7365	A	AB
A3B3	1,1695	AB	B
A3B1	1	ABC	BC
A3B2	0,599	BC	CD
A1B3	0,54	BC	CD
A1B2	0,4855	BC	CD
A2B1	0,2435	C	D
A2B3	0,2345	C	D
A2B2	0,204	C	D

Hal-hal tersebut di atas menunjukkan bahwa...
 1. Dilihat dari...
 2. Diperoleh...

Lampiran 8. Analisis Keragaman Nilai pH Akhir Medium Oleh Isolat PD5

Lampiran 8a. ANOVA untuk Nilai pH Akhir Medium Oleh Isolat PD5

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	0,472	0,059	4,196	3,23	5,47
A	2	0,096	0,048	3,419	4,26	8,02
B	2	0,145	0,073	5,162	4,26	8,02
AB	4	0,231	0,058	4,102	3,63	6,42
Galat	9	0,127	0,014			
Total	17	0,599	0,035			

Lampiran 8b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A3	3,6125	A	A
A2	3,6075	A	A
A1	3,455	A	A

Lampiran 8c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B3	3,669167	A	A
B1	3,556667	A	AB
B2	3,449167	A	B

Lampiran 8d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A3B1	3,7725	A	A
A1B3	3,71	A	AB
A2B3	3,6925	A	AB
A2B2	3,65	AB	AB
A3B3	3,605	AB	AB
A2B1	3,48	AB	ABC
A3B2	3,46	AB	BC
A1B1	3,4175	AB	BC
A1B2	3,2375	B	C

Lampiran 9. Analisis Keragaman Nilai pH Akhir Medium Oleh Isolat RBP-52

Lampiran 9a. ANOVA untuk Nilai pH Akhir Medium Oleh Isolat RBP-52

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	0,902	0,113	175,512	3,23	5,47
A	2	0,304	0,152	236,826	4,26	8,02
B	2	0,350	0,175	272,565	4,26	8,02
AB	4	0,248	0,062	96,328	3,63	6,42
Galat	9	0,006	0,001			
Total	17	0,908	0,053			

Lampiran 9b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A2	3,574167	A	A
A3	3,3075	B	B
A1	3,29	B	B

Lampiran 9c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B3	3,56	A	A
B2	3,393333	B	B
B1	3,218333	C	C

Lampiran 9d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A2B2	3,7875	A	A
A2B3	3,7225	A	B
A3B3	3,5075	B	C
A1B3	3,45	B	D
A3B1	3,24	C	E
A1B2	3,2175	C	EF
A2B1	3,2125	C	EF
A1B1	3,2025	C	EF
A3B2	3,175	C	F

Lampiran 10. Analisis Keragaman Nilai Kadar Gula Sisa Oleh Isolat PD5

Lampiran 10a. ANOVA untuk Nilai Kadar Gula Sisa Oleh Isolat PD5

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	22,027	2,753	7,953	3,23	5,47
A	2	4,090	2,045	5,907	4,26	8,02
B	2	10,032	5,016	14,489	4,26	8,02
AB	4	7,906	1,976	5,709	3,63	6,42
Galat	9	3,116	0,346			
Total	17	25,143	1,479			

Lampiran 10b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1	2,999833	A	A
A2	2,6085	AB	AB
A3	1,8515	B	B

Lampiran 10c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B3	3,363334	A	A
B1	2,557667	AB	B
B2	1,538834	B	C

Lampiran 10d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1B3	4,296	A	A
A2B3	3,849	AB	AB
A3B1	3,1235	ABC	ABC
A1B2	2,636	ABCD	BCD
A2B1	2,482	ABCD	BCD
A1B1	2,0675	BCD	CD
A3B3	1,945	BCD	CD
A2B2	1,4945	CD	DE
A3B2	0,486	D	E

Lampiran 11. Analisis Keragaman Nilai Kadar Gula Sisa Oleh Isolat RBP-52

Lampiran 11a. ANOVA untuk Nilai Kadar Gula Sisa Oleh Isolat RBP-52

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F-hitung	F Tabel (α 0,05)	F Tabel (α 0,01)
Perlakuan	8	69,535	8,692	52,780	3,23	5,47
A	2	5,113	2,556	15,524	4,26	8,02
B	2	22,603	11,302	68,628	4,26	8,02
AB	4	41,819	10,455	63,485	3,63	6,42
Galat	9	1,482	0,165			
Total	17	71,017	4,177			

Lampiran 11b. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Nitrogen

Kombinasi Sumber Nitrogen	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A1	4,811833	A	A
A2	3,724667	B	B
A3	3,642333	B	B

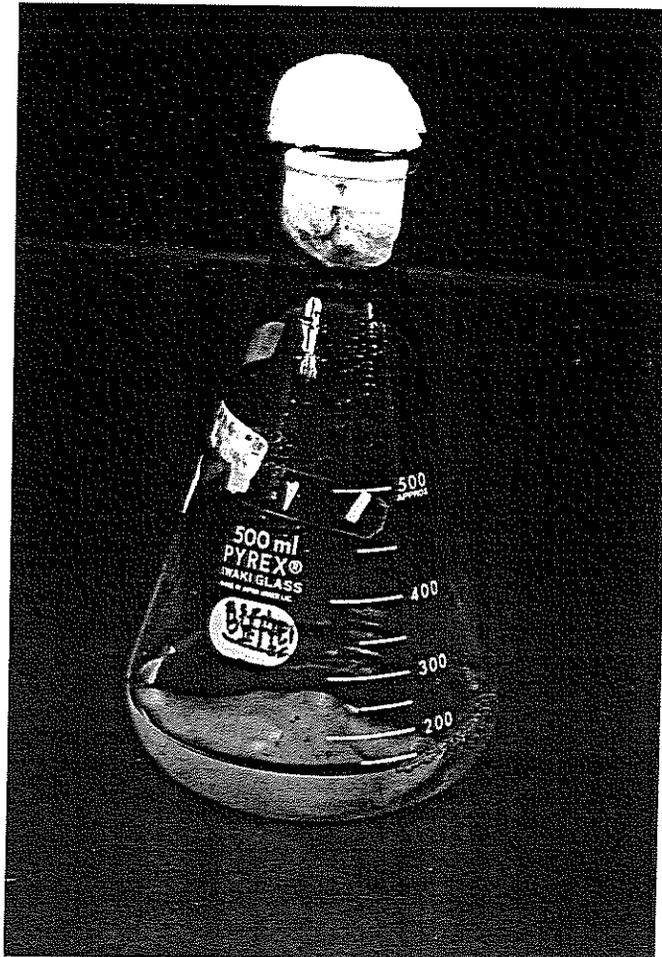
Lampiran 11c. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Kombinasi Sumber Mineral

Kombinasi Sumber Mineral	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
B1	5,479	A	A
B2	3,960333	B	B
B3	2,7395	C	C

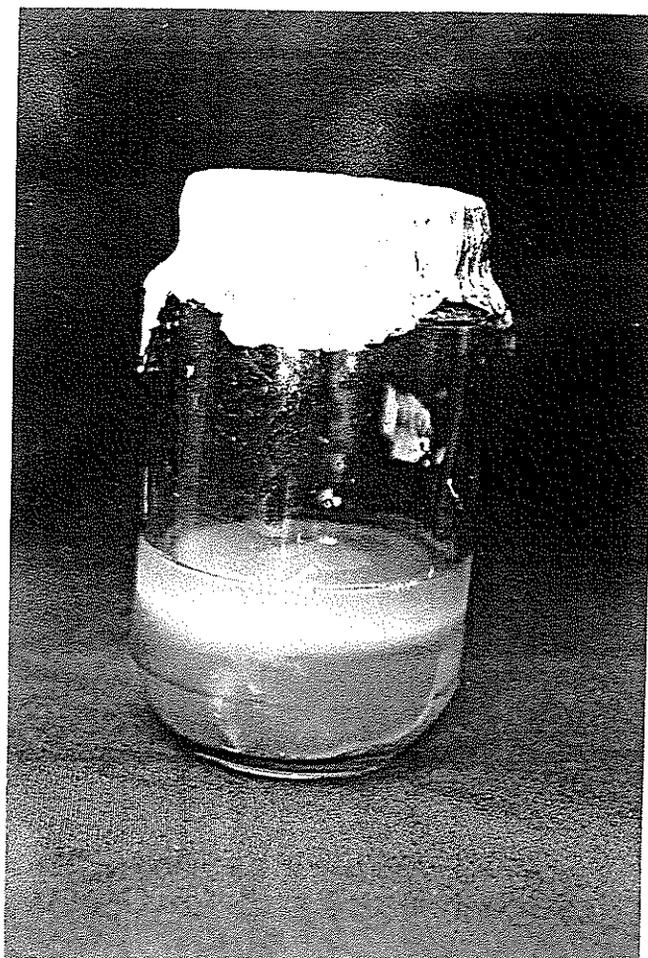
Lampiran 11d. Uji Jarak Berganda Duncan Untuk Interaksi Antar Perlakuan

Kombinasi perlakuan	Rata-rata	<i>Homogeneous groups</i>	
		$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
A2B1	7,9385	A	A
A1B3	5,0625	B	B
A3B2	5,017	B	B
A1B2	4,9065	B	BC
A1B1	4,4665	B	BC
A3B1	4,032	B	C
A2B2	1,9575	C	D
A3B3	1,878	C	D
A2B3	1,278	C	D

Lampiran 12. Contoh hasil propagasi oleh isolat PD5 menggunakan media modifikasi A1B1



Lampiran 13. Contoh hasil kultivasi oleh isolat PD5 menggunakan media modifikasi AIB1



Lampiran 14. Produk selulosa sebelum dan setelah dikeringkan

