

KAJIAN PRODUKSI PULULAN oleh *Aureobasidium pullulans* ISOLAT LOKAL DENGAN MENGGUNAKAN SUBSTRAT ONGGOK

oHk cipa mltk IPB University

Oleh

LINDA MARIA BOWAKH
F 27. 1377



1995

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R

LINDA MARIA BOWAKH. F 27.1377. Kajian Produksi Pululan oleh *Aureobasidium pullulans* Isolat Lokal Dengan Menggunakan Substrat Onggok. Dibawah bimbingan Liesbetini Hartoto dan Titi Candra Sunarti.

R I N G K A S A N

Onggok yang merupakan hasil samping industri tapioka sejauh ini belum dimanfaatkan secara optimal. Penelitian ini berupaya untuk memanfaatkan onggok sebagai bahan baku produksi pululan menggunakan *A. pullulans* isolat lokal. Kajian yang dilakukan meliputi konsentrasi substrat hidrolisat pati onggok dan pengaturan suhu fermentasi yang optimum agar dihasilkan polisakarida pululan yang optimal.

Pada penelitian pendahuluan dilakukan pengujian produksi pululan menggunakan substrat hidrolisat pati onggok dan optimasi suhu dan konsentrasi substrat dengan menggunakan labu Erlenmeyer. Pada penelitian utama dilakukan penentuan parameter kinetika fermentasi pada bioreaktor 2 liter, membandingkan pertumbuhan *A. pullulans* pada dua jenis sumber karbon yaitu glukosa dan hidrolisat pati onggok, serta membandingkan pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal dengan galur CBS-CY-PP-14.

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa *A. pullulans* isolat lokal mampu tumbuh dan memproduksi pada substrat sumber karbon hidrolisat onggok. Dari hasil optimasi konsentrasi substrat (25 g/l, 50 g/l, 75 g/l) dan suhu (24°C, 27°C, 30°C) didapatkan konsentrasi substrat yang optimal yaitu 50 g/l dan suhu optimal 27°C. Hasil analisis sidik ragam untuk biomassa, pH dan total gula sisa memperlihatkan bahwa pengaturan suhu dan konsentrasi substrat memberikan pengaruh nyata, namun tidak berpengaruh nyata terhadap produksi polisakarida.

Dari hasil perhitungan kinetika fermentasi untuk *A. pullulans* isolat lokal didapatkan nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0.059 jam⁻¹, dengan $X_{maks} = 6.30$ g/l dan nilai $\beta = 0.002$ (g/l)p/(g/l)x jam, $\alpha = 1.159$ (g/l)p/(g/l)x, $\delta = 0.010$ (g/l)s/(g/l)x jam, dan nilai $\tau = 10.580$ (g/l)s/(g/l)x.

Sumber karbon hidrolisat pati onggok lebih berpotensi dalam memproduksi pululan dibandingkan dengan glukosa, yang terlihat dari nilai μ , β , dan δ yang lebih tinggi. Laju pembentukan produk dan penggunaan substrat oleh *A. pullulans* isolat lokal lebih rendah jika dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14, akan tetapi produksi pululan yang dihasilkan dari isolat lokal lebih tinggi yaitu 6.72 g/l dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 yaitu 6.45 g/l dengan waktu fermentasi selama 6 hari.

**KAJIAN PRODUKSI PULULAN oleh *Aureobasidium pullulans*
ISOLAT LOKAL DENGAN MENGGUNAKAN SUBSTRAT ONGGOK**

Oleh :

LINDA MARIA BOWAKH

F 27.1377

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

pada JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

1995

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

IPB University
Bogor Indonesia

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

KAJIAN PRODUKSI PULULAN OLEH *Aureobasidium pullulans*
ISOLAT LOKAL DENGAN MENGGUNAKAN SUBSTRAT ONGGOK

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

pada JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Oleh :

LINDA MARIA BOWAKH

F 27.1377

Dilahirkan di Surabaya, 15 Maret 1972

Tanggal lulus, 11 Mei 1995



Ir. Titi Candra Sunarti, MS

Pembimbing I

Ir. Liesbetini Hartoto, MS

Pembimbing II

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan pada Allah Bapa Yang Maha Kuasa, karena berkat kasih dan karuniaNya, penelitian dan penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan, guna memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fateta, IPB.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan banyak terima kasih kepada :

1. Ir. Liesbetini Hartoto, MS. selaku dosen pembimbing I dan Ir. Titi Candra Sunarti, MS. selaku dosen pembimbing II atas petunjuk dan bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Dr. Ir. Muhammad Romli, MSc, St. atas kesediaan dan kehadirannya untuk menguji pada saat ujian skripsi penulis.
3. Staf Jurusan Teknologi Industri Pertanian, staf PAU Bioteknologi, staf AP₄ atas segala petunjuk dan bantuannya selama penelitian.
4. Papa, Mama, Ice dan Andre atas dorongan moril dan doa yang tak henti-hentinya kepada penulis.
5. Papi John, Mami Bea, Roy, Ferry dan Ita atas dorongan moril dan doa kepada penulis.
6. Frederick Purnama atas dorongan, dukungan doa dan keceriaan selama penulis melakukan penelitian dan menyelesaikan penulisan skripsi.

7. Tante Herman, Hermin, Kalista, Chaterine, Nian, Stevy, Linda, Eni, Uyu dan rekan-rekan lainnya yang tak dapat disebutkan satu persatu atas dorongan dan kebersamaannya selama studi, penelitian dan penyelesaian skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam tulisan ini masih terdapat beberapa kekurangan. Walupun demikian penulis berharap tulisan ini dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Bogor, Mei 1995

Penulis

4. Proses Hilir.....	19
C. KINETIKA PERTUMBUHAN.....	21
III. BAHAN DAN METODE.....	30
A. BAHAN DAN ALAT.....	30
1. Bahan.....	30
2. Alat.....	30
B. METODE PENELITIAN.....	31
1. Penelitian Pendahuluan.....	31
a. Pengujian produksi pululan pada hidrolisat.....	31
b. Optimasi suhu dan konsentrasi substrat.....	32
2. Penelitian Utama.....	34
3. Tata Laksana.....	37
a. Pembuatan sirup glukosa.....	37
b. Proses produksi.....	39
(1) Persiapan bahan.....	39
(2) Proses fermentasi.....	42
(3) Pemanenan.....	43
(4) Pengamatan.....	45
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	48
A. PENELITIAN PENDAHULUAN.....	48
1. Pengujian Produksi Pululan pada Hidrolisat Onggok.....	49
a. Keasaman (pH) kultur.....	49
b. Perolehan biomassa.....	53

c. Rendemen pululan.....55

d. Total gula sisa.....58

2. Optimasi Suhu dan Konsentrasi Substrat...59

a. Perolehan biomassa.....61

b. Rendemen pululan.....64

c. Total gula sisa.....66

d. Keasaman (pH) kultur.....67

B. PENELITIAN UTAMA.....69

1. Kinetika Fermentasi.....69

2. Pengaruh Jenis Sumber Karbon.....76

3. Membandingkan Galur CBS-CY-PP-14 dengan Isolat Lokal.....84

V. KESIMPULAN DAN SARAN.....87

A. KESIMPULAN.....87

B. SARAN.....88

DAFTAR PUSATAKA.....89

LAMPIRAN.....94



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar	1.	Struktur dasar polimaltotriosa dari pululan.....	8
Gambar	2.	Struktur morfologis <i>Aureobasidium pullulans</i>	9
Gambar	3.	Kurva pertumbuhan pada fermentasi curah.....	23
Gambar	4.	Foto bioreaktor berpengaduk untuk pembuatan sirup glukosa dari onggok.....	39
Gambar	5.	Tahapan proses hidrolisis pati onggok menjadi sirup glukosa.....	40
Gambar	6.	Tahapan proses produksi pululan.....	44
Gambar	7.	Tahapan proses pemanenan pululan.....	46
Gambar	8.	Grafik perubahan pH <i>A. pullulans</i> pada beberapa konsentrasi sumber karbon.....	52
Gambar	9.	Grafik perubahan total gula sisa <i>A. pullulans</i> pada beberapa konsentrasi sumber karbon.....	60
Gambar	10.	Grafik perubahan biomassa <i>A. pullulans</i> pada sumber karbon hidrolisat pati onggok.....	65
Gambar	11.	Grafik pertumbuhan <i>A. pullulans</i> isolat lokal dan galur CBS-CY-PP-14.....	70
Gambar	12.	Grafik hubungan $\ln[X(1.0 - X)]$ dan waktu untuk pertumbuhan <i>A. pullulans</i> isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok.....	72
Gambar	13.	Grafik hubungan antara $P-P_o - (nX_{maks}/\mu) \ln[1.0 - X_o/X_{maks}(1.0 - e^{\mu t})]$ untuk <i>A. pullulans</i> isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok.....	74
Gambar	14.	Grafik hubungan antara $S-S_o - (\delta X_{maks}/\mu) \ln[1.0 - X_o/X_{maks}(1.0 - e^{\mu t})]$ untuk <i>A. pullulans</i> isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok.....	75

DAFATR TABEL

Halaman

Tabel	1.	Komposisi kimia ampas onggok.....	5
Tabel	2.	Pengaruh suhu proses terhadap pululan yang dihasilkan oleh <i>Pullularia</i> sp. S-1....	16
Tabel	3.	Komposisi agar Sabouraud.....	41
Tabel	4.	Komposisi medium propagasi.....	42
Tabel	5.	Komposisi medium fermentasi.....	42
Tabel	6.	Hasil pengamatan parameter kinetika fermentasi pertumbuhan <i>A. pullulans</i>	76

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran	1. Tabel produksi tapioka dan perkiraan potensi onggok yang dihasilkan industri besar dan menengah.....	94
Lampiran	2. Daftar bahan-bahan kimia yang digunakan.....	95
Lampiran	3. Daftar alat-alat yang digunakan.....	97
Lampiran	4. Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode DNS.....	98
Lampiran	5. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi <i>A. pullulans</i> isolat lokal dengan beberapa konsentrasi sumber karbon glukosa dan hidrolisat pati onggok.....	99
Lampiran	6. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi <i>A. pullulans</i> isolat lokal dengan beberapa konsentrasi sumber karbon hidrolisat pati onggok.....	100
Lampiran	7. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi <i>A. pullulans</i> isolat lokal dan galur CBS-CY-PP-14 dengan beberapa konsentrasi sumber karbon glukosa dan hidrolisat pati onggok (suhu 27°C, 50 g/l).....	101
Lampiran	8. Hasil perhitungan efisiensi konversi substrat menjadi produk ($Y_{p/s}$), efisiensi konversi substrat menjadi biomassa ($Y_{x/s}$) dan kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi gula yang ada dalam substrat ($\Delta s/s$).....	102
Lampiran	9a. Hasil analisis sidik ragam untuk biomassa.....	103
Lampiran	9b. Uji Duncan untuk biomassa.....	103

Lampiran 10.	Hasil analisis sidik ragam untuk polisakarida.....	104
Lampiran 11a.	Hasil analisis sidik ragam untuk total gula sisa.....	105
Lampiran 11b.	Uji Duncan untuk total gula.....	105
Lampiran 12a.	Hasil analisis sidik ragam untuk pH....	106
Lampiran 12b.	Uji Duncan untuk pH.....	106
Lampiran 13a.	<i>A. pullulans</i> isolat lokal yang ditumbuhkan pada agar Sabouraud.....	107
Lampiran 13b.	<i>A. pullulans</i> di dalam medium propagasi.....	107
Lampiran 14a.	Kultur fermentasi <i>A. pullulans</i> pada jam ke-0 sampai jam ke-144 (fermentasi berlangsung dalam bioreaktor).....	108
Lampiran 14b.	Produk polisakarida pululan kering.....	108
Lampiran 15.	Fermentasi <i>A. pullulans</i> pada bioreaktor Biostat M (kapasitas 2 liter).....	109
Lampiran 16.	Fermentasi <i>A. pullulans</i> pada orbital shaker.....	110

I. PENDAHULUAN

Pengolahan hasil pertanian merupakan proses lanjutan dari usaha pertanian, yang menjadikan hasil pertanian mempunyai nilai tambah yang sebesar-besarnya. Namun berbagai hasil samping dan limbah juga dihasilkan dari setiap industri hasil pertanian tersebut.

Pemanfaatan kembali hasil samping industri pengolah hasil pertanian dapat meningkatkan nilai tambah hasil samping tersebut, sehingga dapat memberi manfaat semaksimal mungkin.

Di dalam kegiatan pengolahan ubi kayu menjadi tapioka, limbah padat yang dihasilkan industri tapioka terdiri dari 15 - 20 persen kulit kayu segar dan 5 - 20 persen ongkok kering (Sundhagul, 1972). Pada tahun 1992 jumlah total ongkok kering yang dihasilkan di Indonesia sebesar 3 263 600 ton (BPS, 1993). Hasil pendataan BPS (1993) menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan produksi ubi kayu setiap tahunnya di Indonesia (Lampiran 1). Oleh karena itu, diperkirakan bahwa produksi ongkok kering juga cenderung meningkat setiap tahun. Adanya kecenderungan peningkatan produksi ongkok kering dari tahun ke tahun selayaknya dimanfaatkan untuk menghasilkan produk-produk industri, dengan nilai tambah ekonomik yang tinggi.

Sitorus (1984), menyatakan bahwa ongkok yang merupakan hasil samping industri tapioka, belum dimanfaatkan secara

optimal. Onggok dapat digunakan sebagai bahan baku industri asam sitrat, pembuatan biogas, bahan campuran makanan (saos, kerupuk, oncom), pupuk tanaman, sirup atau etil alkohol. Namun sampai saat ini pemanfaatan onggok baru digunakan untuk makanan ternak, pembuatan tepung Asia, dan untuk pembuatan asam sitrat (Abbas et al., 1985).

Karbohidrat merupakan komponen utama pada onggok, terutama pati yang dapat dihidrolisis menjadi glukosa. Hidrolisat pati onggok (sirup glukosa) ini dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan *Aureobasidium pullulans* dalam memproduksi pululan.

Pululan merupakan polisakarida ekstraseluler netral yang dihasilkan oleh kapang *Aureobasidium pullulans* pada substrat sumber karbon seperti sukrosa, glukosa, fruktosa atau maltosa (Shipman dan Fan, 1978).

Pululan merupakan biopolimer yang dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan bioplastik, yaitu plastik yang dapat dihancurkan secara biologik oleh mikroorganisme. Kelebihan bioplastik tersebut adalah dapat mengurangi bahaya pencemaran lingkungan akibat pembuangan plastik yang tidak dapat dihancurkan oleh mikroorganisme. Pululan yang halus dapat digunakan sebagai bahan untuk membuat film kemasan dengan permukaan yang halus dan permeabilitas yang rendah terhadap oksigen (Sutherland, 1983).

Desphande et al. (1992) menyebutkan beberapa penggunaan penting pululan, yaitu sebagai bahan pembentuk untuk

kertas, kondensor dielektrik, lensa kontak untuk mata, emulsi untuk kosmetik, pembungkus untuk melindungi makanan serta berguna sebagai bahan baku perekat, resin pelapis atau laminasi dan serta berkekuatan tarik tinggi (Heald dan Kristiansen, 1985).

Proses produksi pululan dengan menggunakan sirup glukosa dari hasil hidrolisis pati onggok sebagai substrat sampai saat ini belum dikaji lebih jauh. Pada penelitian ini dilakukan pengkajian terhadap pengaruh konsentrasi substrat, suhu dan lama fermentasi yang optimum agar dihasilkan polisakarida yang optimal. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan industri khususnya industri biopolimer dan bioplastik.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. ONGGOK

Tapioka adalah pati yang diperoleh dari ubi kayu (*Manihot utilisima* Pohl) melalui proses pamarutan, penyaringan dan pengendapan serta pengeringan. Limbah industri tapioka secara fisik terdiri atas limbah padat dan limbah cair. Limbah padat berupa ampas atau onggok, sedangkan limbah cair berupa suspensi partikel padat dalam air proses. Pada limbah cair maupun onggok masih terdapat pati yang tidak dapat dipisahkan selama pengolahan.

Menurut Satiawiharja (1984) kandungan pati ampas tapioka sekitar 60-70 persen dari berat kering, sedangkan Syamsixman (1982) menyatakan bahwa proses pengolahan ubi kayu dengan peralatan sederhana akan menghasilkan tapioka kasar kering sekitar 23-35 kg dan 5-10 kg onggok kering dari 100 kg bahan baku ubi kayu tanpa kulit.

Komponen penting yang terdapat dalam onggok adalah pati dan serat kasar. Kandungan ini berbeda jumlahnya untuk setiap daerah asal, jenis ubi kayu dan teknologi yang digunakan (Anonim, 1984). Komposisi kimia onggok sangat bergantung pada varietas dan mutu ubi kayu yang diolah menjadi tapioka, efisiensi proses ekstraksi pati tapioka dan penanganan onggok. Oleh karena itu beberapa hasil analisis proksimat menunjukkan hasil yang berbeda-beda (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi kimia onggok^a

Komponen (%)	b	c	d
Abu	1.89	0.59	0.59
Serat	11.73	9.68	9.68
Lemak	0.29	0.31	0.31
Protein	1.92	1.54	1.54
Pati	83.57	73.22	75.69

^aDinyatakan sebagai persen berat kering^bAman dan Puspongoro (1983)^cCiptadi dan Sutamiharja (1984)^dThenawijaya (1986)

B. PULULAN

1. Pengertian dan Sifat Fisiko Kimia Pululan

Pululan merupakan polisakarida ekstraseluler netral yang dihasilkan *Aureobasidium pullulans* dari α -D-glukan dengan unit-unit maltotriosa atau maltotetraosa (berikatan α -1,4) yang berpasangan dan membentuk polimer yang berat molekulnya tergantung pada kondisi kultur (Sutherland, 1983).

Pengujian pululan dengan analisis oksidasi periodat dan metilasi yang dilakukan Wallenfels et al. (1977) di dalam Cartley (1979), ternyata membuktikan bahwa pululan mempunyai ikatan α -1,4 dan α -1,6 dengan ratio 2:1.

Pululan merupakan suatu biopolimer yang memiliki bobot molekul 10 000 sampai 400 000 atau bahkan lebih

tinggi, tergantung pada kondisi pertumbuhan mikroorganisme (Shipman dan Fan, 1978), lama fermentasi dan galur mikroorganisme (Sandford, 1979). Ueda et al. (1963) juga memperkirakan polisakarida yang dihasilkan mempunyai bobot molekul 250 000. Menurut Slodki dan Cadmus (1978) hasil dan bobot molekul pululan juga dapat dikendalikan dengan mengatur pH awal media dan konsentrasi ion fosfat.

Dengan teknik hidrodinamika Wallenfels et al. (1977) di dalam Cartley (1979) menemukan berat molekul pululan sebesar 2.35×10^5 , dan hasil lebih rendah 4.5×10^4 ditemukan oleh Bouveng et al. (1962) melalui pengukuran tekanan osmotik metil-eter polisakarida.

Taguchi et al. (1973) menemukan berat molekul pululan dengan perhitungan viskositas sebesar 170 000 dengan derajat polimerisasi 1050 pada kultur berumur 96 jam.

Hasil pengamatan Ueda et al (1963) menunjukkan pululan mempunyai bentuk seperti serbuk berwarna putih. Namun hasil penelitian Leathers et al. (1988) pada produksi pululan oleh beberapa galur *A. pullulans* menghasilkan pululan yang berwarna atau berpigmen. Galur tersebut juga menghasilkan kultur fermentasi yang mengandung zat warna melanin.

Pululan larut dalam air dan dapat dihidrolisis oleh asam dan enzim, akan tetapi tidak dapat mereduksi larutan Fehling.

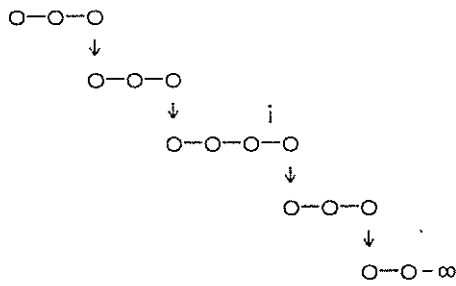
Hidrolisis asam pada pululan hanya menghasilkan unit glukosa, sedangkan dari hidrolisis enzim pululanase ditemukan maltotriosa dalam jumlah besar dan sebagian lagi maltotetraosa (Taguchi et al., 1973).

Pululan dapat dihidrolisis oleh α -amilase dan dihidrolisis secara lambat oleh amiloglukosidase, tapi tidak dapat dihidrolisis oleh β -amilase. Polisakarida ini juga memberi warna pada pewarnaan iodium (Ueda et al., 1963).

Pululanase (EC 3.2.1.41) merupakan enzim spesifik yang dapat mengkatalisa proses hidrolisis ikatan α -1,6 dan mengubah polisakarida menjadi maltotriosa. Struktur pululan disajikan pada Gambar 1

2. Mikrorganisme Penghasil Pululan

Pululan merupakan polisakarida yang diproduksi oleh berbagai galur *Aureobasidium pullulans* (De Bary) yang bersifat aerobik. Di alam bebas, *A. pullulans* selalu diasosiasikan sebagai hama penyakit pada tanaman atau biji-bijian. Pululan kini sudah diisolasi dari contoh air dan tanah, dan merupakan kapang yang dominan di udara bebas (Shipman dan Fan, 1978).



Keterangan gambar :

↓ : ikatan $\alpha-1,6$

- : ikatan α -1,4

o : unit D-glukosil non reduksi

$$\infty : \text{unit D-gukosil pereduksi}$$

i : bagian yang terpotong endo-amilase

Gambar 1. Struktur dasar polimaltotriosa dari pululan (Cartley, 1979)

Mikroorganisme penghasil pululan ini mempunyai deskripsi penamaan yang cukup banyak. *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud kini dianggap merupakan penamaan yang paling tepat meskipun kenyataan penamaan *aureo* dan *basidium* tampaknya tidak cocok jika diklasifikasikan sebagai khamir hitam atau kapang tidak sempurna. Dahulu *Aureobasidium pullulans* dikenal dengan nama *Pulularia pullulans*. Penamaan lain untuk kapang ini adalah *Dematium pullulans*.

Menurut Cole dan Kendrick (1981) kapang penghasil pululan ini mempunyai sistematika sebagai berikut:

Phylum : Thallophyta

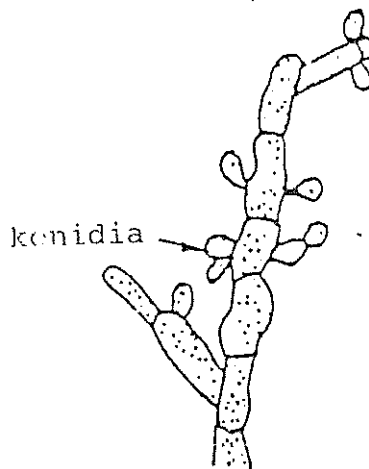
Klas : Coelomycetes

Ordo : Deuteromycetes

Famili : Dermaticaeae

Genus : Aureobasidium

Frazier dan Wethoff (1978) mengelompokkan *Aureobasidium* (*Pullularia*) *pullulans* sebagai kapang bersepta dan termasuk fungi tak sempurna, ordo Moniliales, famili Moniliaceae, genus *Pullularia*. Pada sel muda koloninya nampak pucat, berlendir, dan menyerupai khamir, sedang pada sel tua berubah menjadi miselia dan nampak gelap (hitam). Struktur morfologis kapang ini diperlihatkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur morfologis *Aureobasidium pullulans* (Frazier dan Westhoff, 1978)

Kapang ini juga menjadi penting karena kemampuannya melunturkan warna cat dan membusukkan produk-produk kayu. Pada produk-produk pangan, kapang ini dapat juga diisolasi sebagai kontaminan terutama

produk berkemas, seperti makaroni, spaghetti dan mie (Shipman dan Fan, 1978).

3. Proses Produksi

a. Media pertumbuhan

(1) Sumber karbon

A. pullulans mempunyai enzim-enzim yang dapat memanfaatkan glukosa, maltosa, galaktosa, sukrosa, pentosa, manosa, rafinosa dan trehalosa sebagai media pertumbuhannya. Kapang tersebut juga mengasimilasi laktosa, manitol, gliserol, etil alkohol serta berbagai n-alkana (Shipman dan Fan, 1978).

Shin et al. (1989) menyatakan untuk pertumbuhan sel *A. pullulans* dapat mengasimilasi D-xilosa, D-ribosa, D,L-arabinosa, L-rhamnosa, L-sorbose, D-galaktosa, sukrosa, maltosa, selobiosa, trehalosa, laktosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, inulin dan larutan pati. Dalam biosintesis pululan *A. pullulans* dapat menghasilkan polisakarida dari substrat glukosa, xilosa, galaktosa, arabinosa, rhamnosa, maltosa, sukrosa dan laktosa. Penelitian Ueda et al. (1963) menyatakan bahwa sukrosa dan maltosa memberikan hasil yang terbaik

(efisiensi konversi substrat menjadi polisakarida) jika dibandingkan dengan gula-gula lain sebagai sumber karbon, sebesar 27.7 persen dan 28.8 persen.

Pada saat ini telah dicoba untuk memanfaatkan sumber daya yang dapat diperbaharui sebagai substrat untuk kultivasi pululan, misalnya pati atau sirup glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis menggunakan enzim atau asam dari kayu, tongkol jagung dan limbah lignoselulosik lainnya (Shipman dan Fan, 1978). Dengan dasar ini maka diharapkan onggok yang dapat dihidrolisis menjadi sirup glukosa, dapat digunakan sebagai substrat pada kultivasi pululan.

(2) Sumber nitrogen

A. *pullulans* memerlukan nitrogen untuk pertumbuhan sel maupun sintesis enzim, tetapi jumlah nitrogen yang berlebihan akan menurunkan konversi substrat gula menjadi polisakarida ekstraseluler (Kang dan Cotrell, 1979).

Sumber nitrogen dapat berupa bahan organik seperti ekstrak khamir, pepton, monosodium glutamat atau bahan anorganik seperti persenyawaan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ekstrak khamir merupakan ekstrak yang baik untuk berbagai mikroorganisme. Menurut Fardiaz (1988) ekstrak khamir mengandung asam amino dan peptida, vitamin yang larut dalam air dan karbohidrat. Komposisi ekstrak khamir bervariasi tergantung dari substrat yang digunakan untuk menumbuhkan khamir.

Penggunaan ekstrak khamir dalam fermentasi sangat menentukan pertumbuhan. Konsentrasi terendah penggunaan ekstrak khamir yang dapat menginduksi pertumbuhan sebesar 0.05 persen (b/v) dan konsentrasi optimum untuk pertumbuhan miselia adalah 1.0 persen (b/v) (Cooper dan Gadd, 1984).

Penggunaan bahan anorganik seperti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dapat mempengaruhi pembentukan polisakarida. Pembentukan polisakarida akan menurun jika terdapat kelebihan ion amonium, meskipun kondisi-kondisi lain mendukung sintesis tersebut (Auer dan Seviour, 1990). Hasil penelitian dari Bermejo et al. (1981) menunjukkan konsentrasi optimal sumber nitrogen amonium sulfat adalah 0.15 persen (b/v).

(3) Sumber mineral

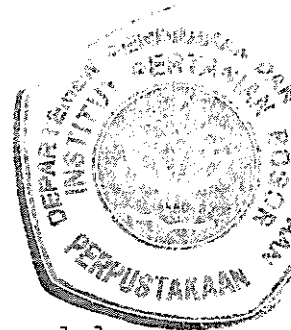
Semua mikroorganisme memerlukan nutrien dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi dan faktor esensial pertumbuhan (mineral dan vitamin) untuk menopang pertumbuhannya. Unsur-unsur nutrien dasar tersebut disamping menyediakan energi juga digunakan untuk pembentukan konstituen selluler. Oleh sebab itu untuk mendapatkan "yield" yang maksimum, medium pembiakan yang digunakan harus mengandung nutrien dasar tersebut (Judoamidjojo et al., 1989).

Media pertumbuhan *A. pullulans* perlu ditambah dengan beberapa mineral. Ueda et al. (1963) menyarankan komposisi mineral untuk produksi pululan adalah KH_2PO_4 , NaCl dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

b. Kondisi proses kultivasi

(1) Keasaman (pH) awal medium

Nilai pH awal medium yang digunakan dalam proses kultivasi pululan mempengaruhi jumlah total biomassa dan pululan yang dihasilkan. Heald dan Kristiansen (1985) melakukan proses produksi pululan pada pH awal medium sebesar 6.3, 5.0 dan 3.5.



Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan nilai pH awal medium akan meningkatkan jumlah biomassa dan pululan. Peningkatan nilai pH awal kultur akan meningkatkan jumlah gula yang dikonversi.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sampai saat ini belum ada patokan penentuan pH awal medium. Shipman dan Fan (1978) tidak melakukan pengaturan pH awal, sedangkan Shin et al. (1989) dan Cartley (1971b) mengatur pH medium pada pH 7.5, Boa dan LeDuy (1984) melakukan pada pH awal 6.5, dan Mulchandani et al. (1988) mengamati kultivasi pada pH 5.5.

Lacroix et al. (1985) melakukan fermentasi dengan pengaturan pH awal dua tahap. Pada tahap pertama pH awal diatur pada pH 2.0 kemudian pada hari keempat, pH kultur diubah menjadi sekitar pH 4-5. Dari hasil percobaannya, fermentasi dua tahap memang menghasilkan rendemen pululan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pengaturan pH awal.

Sunarti (1989) melakukan penelitian produksi pululan dari substrat tetes tebu dengan mengatur pH awal kultur pada besaran 5.5, 6.0 dan 6.5, dan membandingkannya dengan tanpa pengaturan pH awal.

Pada penggunaan kapang *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 diperoleh dari hasil bahwa proses produksi tanpa pengaturan pH awal kultur memberikan rendemen pululan tertinggi, karena tetes tebu yang digunakan sudah mencapai pH 6 sebelum dilakukan pengaturan pH.

(2) Suhu

Suhu proses perlu diatur karena berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan pembentukan polisakarida. Ueda *et al.* (1963) mendapatkan bahwa untuk produksi pululan, suhu 25°C lebih baik daripada 30°C. Demikian pula Boa dan LeDuy (1984) menegaskan bahwa pada suhu optimum untuk produksi pululan adalah 25°C.

Pengaturan suhu proses produksi pululan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan berkisar antara 20 - 30°C. Pada kisaran tersebut pengaruh suhu terhadap laju pertumbuhan sel tidak terlalu besar, namun terhadap pululan yang dihasilkan, suhu 25°C lebih baik jika dibandingkan 30°C (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh suhu proses terhadap pululan yang dihasilkan oleh *Pullularia sp.* S-1^a

Suhu proses (°C)	Polisakarida (g/l)	Konsumsi gula (persen)	Biomassa kering (g/l)
25	22.6	23.4	20.5
30	3.8	3.9	18.5

^aUeda et al. (1963)
Kultur berumur 110 jam

(3) Agitasi

Agitasi bertujuan untuk mengaduk kultur fermentasi sehingga suspensi kultur menjadi seragam, mempercepat laju perpindahan masa di dalam kultur, menyebarkan gelembung-gelembung udara di dalam kultur dan untuk memantapkan turbulensi cairan (Aiba et al., 1973).

Proses agitasi dapat dikatakan mempercepat pencampuran dan pelarutan bahan yang diinginkan (Gumbira-Sa'id, 1987). Pada sistem agitasi yang lebih tinggi, kebutuhan oksigen terpenuhi dengan cepat, penyebaran zat-zat makanan dan kultur merata sehingga aktivitas mikroorganisme berlangsung cepat (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Media fermentasi dengan viskositas tinggi akan memiliki pengadukan dan perpindahan massa yang lebih baik dengan semakin tingginya laju

agitasi, sehingga laju pertumbuhan spesifik dan perolehan biomassa maksimum diharapkan memiliki nilai yang tinggi pula.

Pada skala laboratorium, operasi agitasi dalam proses produksi dilakukan pada inkubator goyang, sedangkan proses produksi yang dilakukan di dalam bioreaktor memerlukan alat mekanik (agitator) untuk mengaduk suspensi kultur (Wang et al., 1978).

Shin et al. (1963), dan Mulchandani et al. (1988) melakukan percobaan pada kecepatan 200 rpm. Shipman dan Fan (1978) pada 250 rpm, Heald dan Kristiansen (1985) pada kecepatan putar 150 - 160 rpm. Boa dan LeDuy 1984) melakukan pada 145 rpm dan Ueda et al. (1963) telah melakukannya pada kecepatan putar 100 rpm. Diduga dengan meningkatnya laju agitasi akan meningkatkan kontak mikroorganisme dan mempercepat pencampuran dengan medium.

Percobaan produksi pululan pada berbagai taraf kecepatan agitasi (100 rpm, 150 rpm dan 200 rpm oleh Bunasor et al. (1992) memberikan hasil bahwa rendemen pululan tertinggi diperoleh dengan menggunakan agitasi 150 rpm, pada parameter agitasi 100 rpm, 150 rpm dan 200 rpm.

(4) Aerasi

Pengaturan aerasi banyak dilakukan pada proses produksi dalam bioreaktor. Pada percobaan awal dengan labu Erlenmeyer, pengaturan aerasi tidak dilakukan.

Aerasi bertujuan untuk memasok oksigen bagi pertumbuhan sel, pemeliharaan sel dan pembentukan produk (Aiba et al., 1973). Aerasi berhubungan dengan efisiensi relatif untuk produksi energi. Peningkatan kekentalan media fermentasi akan menurunkan efisiensi energi secara nyata.

Banyaknya oksigen yang harus dialirkan ke dalam bioreaktor sehingga dihasilkan rendemen pululan paling tinggi sampai saat ini belum diketahui. Hasil percobaan Heald dan Kristiansen (1985) menggunakan laju aerasi sebesar 0.5 vvm, Lacroix et al. (1985) pada 0.8 vvm sedangkan Mulchandani et al. (1988) pada 1.0 vvm.

Hasil penelitian Sondang (1993), menunjukkan bahwa laju aerasi 2.0 vvm memberikan nilai efisiensi pengubahan substrat menjadi produk ($Y_{p/s}$) tertinggi yaitu 1.0788, dengan menggunakan tetes sebagai sumber karbonnya.

4. Proses Hilir

Operasi pemanenan dalam proses produksi pululan terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama memisahkan biomassa dari kultur fermentasi, kemudian pengendapan polisakarida dari supernatannya dan pengambilan polisakarida.

Pemisahan biomassa dilakukan dengan operasi sentrifugasi dengan melakukan pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran ini untuk mengurangi viskositas medium sehingga akan mempermudah pemisahan biomassa dengan sentrifus. Kecepatan pengendapan berbanding terbalik dengan viskositas cairan. Semakin kental cairan akan semakin rendah kecepatan pengendapan biomassa (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Operasi sentrifugasi dibutuhkan karena biomassa yang dihasilkan dari pertumbuhan kapang pada medium cair berupa miselia yang menyebar, dengan gaya sentrifugasi 3 000 g selama 10 menit (Harjo, 1992)

Tahap kedua adalah pengendapan polisakarida dari supernatan yang telah bebas sel. Operasi pengendapan dapat dilakukan dengan menambahkan THF atau Tetrahidrofur (Leather et al., 1988), metanol (Boa dan LeDuy., 1984), campuran etanol-aseton dengan perbandingan 1:1 (Shipman dan Fan, 1978; Shin et al., 1989). Ueda et al. (1963), Cartley (1971a), Taguchi

et al. (1973) dan Mulchandani et al. (1988) serta Lacroix et al. (1985) menambahkan etanol. Harjo (1992) melakukan penelitian dengan menggunakan berbagai pelarut diatas, dan didapatkan hasil yang terbaik dengan menggunakan aseton 90 persen.

Menurut Peppler dan Perlman, 1979), penambahan pelarut organik dapat mengubah kekuatan dielektrik dari sistem pelarut sehingga dapat mengurangi kelarutannya. Smith dan Pace (1982) menyatakan bahwa pengaruh penambahan pelarut organik yang tidak dapat melarutkan polisakarida yang dapat bercampur dengan air pada larutan polianionik encer, tidak hanya meningkatkan kelarutan bagian hidrofilik polimer dengan menurunkan afinitas pelarut dengan polimer, tetapi juga mempertinggi ikatan bermacam-macam kation yang ada.

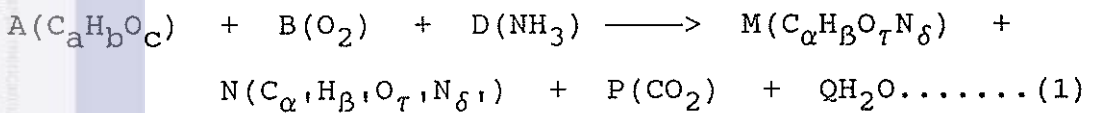
Pengambilan polisakarida dapat dilakukan dengan berbagai macam cara. Pemisahan dengan sentrifugasi dilakukan oleh Leather et al. (1988) pada kecepatan 15 000 selama 30 menit. Shipman dan Fan (1978) melakukan pada kecepatan 3 000 rpm selama 10 menit, sedangkan Harjo (1992) melakukan dengan gaya sentrifugasi 3 000 g selama 10 menit.

Pengeringan polisakarida pululan ini dilakukan dengan dua cara yaitu pengeringan dalam oven vakum (Leather et al., 1988; Mulchandani et al., 1988;

Shipman dan Fan, 1978) dan pengeringan dalam oven bersuhu 105°C sampai bobotnya konstan.

C. KINETIKA PERTUMBUHAN

Pertumbuhan mikroorganisme dapat dipandang sebagai suatu rangkaian reaksi kimia yang menuju ke arah sintesis massa sel. Menurut Wang et al. (1978) formulasi stoikiometri untuk pertumbuhan secara umum dapat dinyatakan sebagai :



Pertumbuhan mikroorganisme biasanya dicirikan sebagai waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa sel dan atau jumlah sel. Di bawah kondisi pertumbuhan yang optimal dan dengan tidak adanya pengaruh penghambatan oleh substrat dan produk, maka laju pertumbuhan sel mengikuti persamaan eksponensial. Pada keadaan seperti ini Wang et al. (1978) dan Mulchandani et al. (1988) menyatakan pertumbuhan sel sebagai :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \dots \dots \dots (2)$$

dengan μ adalah laju spesifik pertumbuhan sel persatuan waktu dan X adalah konsentrasi biomassa.

Pertumbuhan mikroorganisme secara curah pada medium tertentu, membentuk kurva seperti terlihat pada Gambar

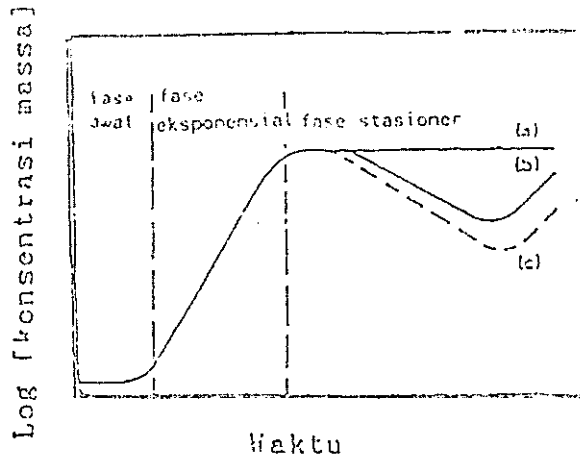
3.

Kurva pertumbuhan mempunyai tiga fase yaitu fase awal (lag fase), fase eksponensial atau fase logaritmik dan fase stasioner.

Fase awal adalah fase sejak inokulasi sel pada medium dan merupakan suatu periode adaptasi. Selama fase ini massa sel dapat berubah tanpa adanya perubahan jumlah sel.

Fase logaritmik dicirikan oleh suatu garis lurus pada plot grafik semi-log antara $\ln x$ dengan waktu. Pada periode ini keadaan pertumbuhan mantap, dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) yang konstan.

Fase stasioner terjadi bila seluruh sel berhenti membagi dua atau bilamana sel-sel hidup telah mencapai kesetimbangan dengan sel-sel mati. Meskipun pertumbuhan sel telah terhenti, metabolisme atau akumulasi produk masih dapat terjadi di dalam sel atau di dalam kultur (Gambar 3). Massa sel total dapat tetap konstan (kurva a), tetapi dapat juga jumlah sel cenderung menurun (c), atau lisis mungkin terjadi (b) dan massa sel menurun.



Kurva (a) memperlihatkan massa sel bila tidak terjadi lisis, (b) massa sel bila terjadi lisis dan diikuti pertumbuhan kriptik, sedangkan (c) "viabel cell count" bila terjadi lisis

Gambar 3. Kurva pertumbuhan pada fermentasi curah Wang et al. (1978)

Pertumbuhan sel dan pembentukan produk oleh mikro-organisme merupakan proses biokonversi; dengan nutrisi kimia yang diumpankan pada fermentasi dikonversi menjadi metabolit-metabolit. Setiap tahap konversi tersebut dapat dikuantitatifkan oleh suatu koefisien hasil yang dinyatakan sebagai massa sel atau produk yang terbentuk per unit massa nutrisi yang dikonsumsi, yaitu $Y_{x/s}$ untuk sel dan $Y_{p/s}$ untuk produk.

Dari persamaan (1) sebelumnya dapat ditentukan oleh Wang et al. (1978) bahwa koefisien hasil sel terhadap sumber karbon adalah :

$$Y_{x/s} = \frac{M(12\alpha + \beta + 16\tau + 14\delta) (1 - r)}{A (12a + b + 16c)} \dots\dots\dots (3)$$

dengan r adalah fraksi massa sel yang diwakili oleh kadar abu.

Dengan cara yang sama koefisien hasil produk dinyatakan sebagai :

$$Y_{p/s} = \frac{N(12\alpha' + \beta' + 16\tau' + 14\delta')}{A(12a + b + 16c)} \quad \text{.....(4)}$$

Pada persamaan (3) dan (4), angka-angka dalam kurung adalah berat molekul. Perhitungan yang biasa dilakukan adalah pengukuran massa sel atau produk yang dihasilkan dan substrat yang dikonsumsi pada periode waktu tertentu dan dinyatakan sebagai :

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{.....(5)}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta S} \quad \text{.....(6)}$$

dengan $Y_{x/s}$ dan $Y_{p/s}$ adalah koefisien konversi nutrisi dalam substrat menjadi biomassa dan polisakarida.

Pertumbuhan sel dan pembentukan produk metabolit selalu dihubungkan dengan konsumsi nutrisi. Pembentukan produk ini tidak mungkin terjadi tanpa adanya pertumbuhan sel. Wang et al. (1978) memberi persamaan neraca bahan untuk pertumbuhan sel, penggunaan substrat dan pembentukan produk pada kondisi mantap (*steady-state*) dan tidak mantap sebagai berikut:

Pertumbuhan Sel

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_o X}{V} \dots\dots\dots (7)$$

Akumulasi sel = pertumbuhan - pengambilan sel

dengan F_o = laju pengambilan sel per satuan waktu dan V adalah volume fermentor.

Penggunaan substrat

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_i S_o}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} - \frac{q_p X}{Y_{p/s}} - mX - \frac{F_o S}{V} \dots (8)$$

Akumulasi substrat = Umpan substrat - pertumbuhan - sintesa produk - pemeliharaan - pengambilan substrat

dengan F_i = laju umpan per satuan waktu, m = laju pemeliharaan substrat per satuan waktu dan q_p adalah laju spesifik pembentukan produk.

Pembentukan produk

$$\frac{dP}{dt} = q_p X - \frac{F_o P}{V} - KP \dots\dots\dots (9)$$

Akumulasi produk = sintesa produk - pengambilan produk - destruksi produk

dengan K = laju destruksi produk per satuan waktu.

Bila tidak ada substrat yang diumpankan atau pengambilan produk dari proses tersebut, maka persamaan menjadi :

$$-\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} - m X - \frac{q_p X}{Y_{P/S}} \dots\dots\dots(10)$$

Mulchandani et al. (1988) menyatakan bahwa kesetimbangan substrat oleh fermentasi polisakarida adalah sebagai berikut :

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \left[\frac{dX}{dt} \right] + \frac{1}{Y_{P/S}} \left[\frac{dP}{dt} \right] + m X \dots\dots(11)$$

Bila dP/dt adalah laju pembentukan produk per satuan waktu mengikuti persamaan yang digambarkan oleh Leudeking dan Piret sebagai berikut :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \dots\dots\dots(12)$$

maka persamaan (11) menjadi :

$$-\frac{dS}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\beta}{Y_{P/S}} \right] \frac{dX}{dt} + \left[\frac{\alpha}{Y_{P/S}} + m \right] X \dots\dots\dots(13)$$

atau

$$-\frac{dS}{dt} = \tau \frac{dX}{dt} + \delta X \dots\dots\dots(14)$$

dengan

$$\tau = \frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\beta}{Y_{P/S}} \quad \text{dan} \quad \delta = \frac{\alpha}{Y_{P/S}} + m$$

Menurut Klimek dan Ollis (1980), kinetika pertumbuhan pada kultivasi curah mempunyai model umum sebagai berikut :

$$dX/dt = f(X) = \mu X (1.0 - (X/X_{maks})) \quad \dots\dots\dots(15)$$

dimana :

μ = laju pertumbuhan spesifik

X = konsentrasi biomassa

X_{maks} = konsentrasi biomassa maksimum

Integrasi persamaan (15) dan setelah melakukan penyusunan kembali akan menghasilkan persamaan berikut:

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1.0 - (X_0/X_{maks}) (1.0 - e^{\mu t})} \quad \dots\dots\dots(16)$$

dengan : $X_0 = X(t=0)$

Persamaan (16) disusun kembali menghasilkan persamaan berikut :

$$\mu t = -\ln [(X_{maks}/X_0) - 1.0] + \ln [\bar{X}/(1.0 - \bar{X})] \dots\dots\dots(17)$$

dengan : $\bar{X} = X(t)/X_{maks}$

Plot $\ln [\bar{X}/(1.0 - \bar{X})]$ terhadap waktu akan menghasilkan garis lurus dengan kemiringan μ dan titik potongnya pada $\ln [(X_{maks}/X_0)-1.0]$, yang mana nilai sel awal yang dapat hidup atau X_0 ($= \bar{X}_0 \cdot X_{maks}$) dapat ditentukan.

Pembentukan produk pada pertumbuhan sel secara curah tetap berlaku persamaan Leudeking dan Piret pada persamaan (12). Parameter β ditentukan dari data (dP/dt) pada fase stasioner, dengan ketentuan nilai $dx/dt = 0$, $X = X_{maks}$, maka :

$$\beta = \frac{(dP/dt)_{stat} \times X_{maks}}{X_{maks}} \dots\dots\dots(19)$$

Integrasi persamaan (12) menghasilkan nilai P sebagai fungsi dari waktu sebagai berikut :

$$P(t) = P_0 + \alpha X_0 \{e^{\mu t}[1.0 - (X_0)(1.0 - e^{\mu t})] - 1.0\} + \beta(X_{maks}/\mu) \ln[1 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})] \dots\dots\dots(20)$$

Dengan menentukan $P_0 = P(t=0)$ maka dari persamaan (20) diperoleh nilai α dari kemiringan dari persamaan :

$$P(t) - P_0 - \beta(X_{maks}/\mu) \ln[1.0 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})] = \alpha X_0 \{e^{\mu t}/[1.0 - X_0(1.0 - e^{\mu t})] - 1.0\} \dots\dots(21)$$

Penentuan parameter laju penggunaan substrat dihitung dari data fase stasioner, dan dihasilkan dari percobaan nilai δ sebagai berikut :

$$\delta = \frac{(dS/dt)_{\text{stat}} \times X_{\text{maks}}}{\dots\dots\dots} \quad \dots\dots\dots (22)$$

Nilai parameter τ dihasilkan dari integrasi persamaan (13) sebagai berikut :

$$S_0 - S(t) - \tau [X(t) - X_0] = \delta (X_{\text{maks}}/\mu) \ln[1.0 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})] \quad \dots\dots\dots (23)$$

dengan $S_0 = S(t=0)$. Dari plot data-data pada persamaan (23) di atas dihasilkan nilai parameter τ .

Kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk memperlihatkan kemampuan sel dalam memberikan respon terhadap lingkungannya.

Kinetika pertumbuhan dipelajari untuk mengetahui laju pertumbuhan, pembentukan produk dan penggunaan substrat, sehingga dapat ditentukan saat pemanenan yang optimal dan efisiensi penggunaan substratnya. Selain itu juga dapat diketahui fisiologi pertumbuhan pada jenis sumber karbon yang digunakan (Fardiaz, 1988).

III. BAHAN DAN METODE

A. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah onggok kering yang diperoleh dari pabrik tapioka di daerah Ciluar Bogor, enzim α -amilase dan enzim amiloglukosidase dari PT. Supra Incomer Jakarta.

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari bahan kimia untuk pemurnian hidrolisat pati onggok, bahan kimia sebagai sumber nutrisi, bahan kimia untuk analisis dan bahan kimia untuk pengendap pululan. Keseluruhan bahan-bahan kimia tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2.

Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aureobasidium pullulans* isolat lokal yang diperoleh dari Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sudirman Purwokerto dan galur CBS-CY-PP-14 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA, IPB, Bogor.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bioreaktor untuk hidrolisis pati onggok berkapasitas 2 liter, bioreaktor Biostat M (kapasitas 2

liter), inkubator goyang, *shaker bath*, inkubator suhu ruang, neraca analitik, *clean bench*, otoklaf, oven pengering, spektrofotometer, pH meter, sentrifus, viskosimeter, kompresor udara serta alat-alat gelas. Keseluruhan alat yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 3.

B. METODE PENELITIAN

1. Penelitian Pendahuluan

a. Pengujian produksi pululan menggunakan hidrolisat pati onggok

Penelitian ini dilakukan untuk menguji tumbuh *A. pullulans* isolat lokal pada hidrolisat pati onggok. Hasil fermentasi nantinya akan dibandingkan dengan pertumbuhan kapang tersebut pada medium dengan sumber karbon glukosa murni.

Fermentasi berlangsung selama 6 hari pada suhu kamar ($27-30^{\circ}\text{C}$), dengan menggunakan konsentrasi substrat 25 g/l, 50 g/l dan 75 g/l, yang berlangsung pada *orbital shaker* pada agitasi 150 rpm. Fermentasi berlangsung dalam labu Erlenmeyer 250 ml dengan volume kerja 50 ml.

Parameter yang diamati adalah nilai pH akhir kultur, perolehan biomassa, rendemen pululan dan total gula sisa.

b. Optimasi suhu dan konsentrasi substrat

Penelitian ini ditujukan untuk melihat pengaruh konsentrasi substrat dan pengaturan suhu terhadap produktivitas optimal pululan yang dihasilkan.

Penelitian dilakukan menggunakan labu Erlenmeyer 250 ml, dengan volume kerja 50 ml. Fermentasi berlangsung pada *orbital shaker* dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 6 hari, dan waktu pengamatan dilakukan setiap 24 jam.

Parameter yang diamati adalah nilai pH akhir kultur, perolehan biomassa, rendemen pululan dan total gula sisa.

Model rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah rancangan acak lengkap faktorial dengan dua kali ulangan. Konsentrasi hidrolisat onggok sebagai substrat (faktor A) terdiri atas tiga taraf, yaitu: 25 g/l, 50 g/l dan 75 g/l. Pengaturan suhu kultivasi (faktor B) terdiri atas tiga taraf, yaitu: 24°C, 27°C, dan 30°C.

Menurut Sudjana (1985), model umum persamaan yang digunakan adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + k(ij)$$

dengan :

Y_{ijk} = Peubah respon karena pengaruh bersama taraf ke- i faktor A dan taraf ke- j faktor B yang terdapat pada pengamatan ke- k ,

μ = efek rata-rata yang sebenarnya (berharga tetap),

A_i = efek sebenarnya dari taraf ke- i faktor A (konsentrasi substrat) ($i = 25\text{g/l}, 50\text{g/l}, 75\text{g/l}$),

B_j = efek sebenarnya dari taraf ke- j faktor B (suhu) ($j = 24^\circ\text{C}, 27^\circ\text{C}, 30^\circ\text{C}$),

AB_{ij} = efek sebenarnya dari interaksi antara taraf ke- i faktor A dengan taraf ke- j faktor B,

$k(ij)$ = efek sebenarnya dari unit percobaan ke- k dalam kombinasi perlakuan (ij), ($k = 1, 2$).

Asumsi yang digunakan untuk model ini adalah :

$$A_i = B_j = AB_{ij} = AB_{ij} = 0$$

Sedang hipotesis yang akan diuji adalah :

$$H_1 : A_i = 0 ; (i = 1, 2, 3)$$

$$H_2 : B_j = 0 ; (j = 1, 2, 3)$$

$$H_3 : AB_{ij} = 0 ; (i = 1, 2, 3, \text{ dan } j = 1, 2, 3)$$

Hipotesis H_1 menyatakan bahwa tidak terdapat pengaruh faktor A dalam percobaan, hipotesis H_2 menyatakan bahwa tidak terdapat pengaruh faktor B dalam percobaan, sedang hipotesis H_3 menyatakan tidak terdapat pengaruh interaksi antara faktor A dan B dalam percobaan.

Semua data yang diperoleh dari hasil penelitian ini diolah dengan paket program Sirichai, jika analisis sidik ragam menunjukkan adanya perbedaan nyata atau sangat nyata diantara perlakuan atau interaksinya maka pengujian lanjutan digunakan uji kisaran ganda Duncan pada paket program yang sama.

Setelah didapatkan konsentrasi sumber karbon dan suhu yang terpilih, dilakukan proses kultivasi pada bioreaktor Biostat M (kapasitas 2 liter).

2. Penelitian Utama

Penelitian utama ditujukan untuk mengetahui parameter kinetika pertumbuhan *Aureobasidium pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat pati onggok, yang nantinya akan dibandingkan dengan sumber karbon glukosa.

Parameter kinetika untuk galur lokal pada hidrolisat pati onggok ini nantinya juga akan dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon yang sama.

Parameter kinetika yang diamati adalah laju pertumbuhan spesifik (μ), tetapan laju pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan (α), tetapan laju pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan (β), tetapan laju penggunaan substrat yang berasosiasi dengan pertumbuhan (δ), tetapan laju penggunaan substrat yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan (τ), laju pembentukan polisakarida (dP/dt), laju penggunaan substrat (dS/dt), efisiensi konversi substrat menjadi biomassa ($Y_{X/S}$), efisiensi konversi substrat menjadi polisakarida ($Y_{P/S}$) dan kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi gula yang ada dalam substrat ($\Delta S/S$).

Penentuan nilai parameter kinetika fermentasi digunakan metode yang dilakukan oleh Klimek dan Ollis (1980), kinetika pertumbuhan pada kultivasi curah mempunyai model umum sebagai berikut :

$$dX/dt = f(X) = \mu X (1.0 - (X/X_{maks}))$$

dimana :

μ = laju pertumbuhan spesifik

X = konsentrasi biomassa

X_{maks} = konsentrasi biomassa maksimum

Integrasi persamaan diatas dan setelah melakukan penyusunan kembali akan menghasilkan persamaan berikut:

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1.0 - (X_0/X_{\text{maks}}) (1.0 - e^{\mu t})}$$

dengan : $X_0 = X(t=0)$. Persamaan ini disusun kembali dan menghasilkan persamaan berikut : $\mu t = -\ln [(X_{\text{maks}}/X_0) - 1.0] + \ln [\bar{X}/(1.0 - \bar{X})]$, dengan $X=X(t)/X_{\text{maks}}$. Plot $\ln [\bar{X}/(1.0 - \bar{X})]$ terhadap waktu akan menghasilkan garis lurus dengan kemiringan μ dan titik potongnya pada $\ln [(X_{\text{maks}}/X_0)-1.0]$, yang mana nilai sel awal yang dapat hidup atau $X_0 (= \bar{X}_0 \cdot X_{\text{maks}})$ dapat ditentukan.

Pembentukan produk pada pertumbuhan sel secara curah tetap berlaku persamaan Leudeking dan Piret. Parameter β ditentukan dari data (dP/dt) pada fase stasioner, dengan ketentuan nilai $dX/dt = 0$, $X = X_{\text{maks}}$, maka :

$$\beta = \frac{(dP/dt)_{\text{stat}} x}{X_{\text{maks}}}$$

Integrasi persamaan diatas menghasilkan nilai P sebagai fungsi dari waktu yaitu $P(t) = P_0 + \alpha X_0 \{e^{\mu t} [1.0 - (X_0)(1.0 - e^{\mu t})] - 1.0\} + \beta(X_{\text{maks}}/\mu) \ln[1 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})]$. Dengan menentukan $P_0 = P(t=0)$ maka diperoleh nilai α dari kemiringan pada persamaan : $P(t) - P_0 - \beta(X_{\text{maks}}/\mu) \ln[1.0 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})] = \alpha X_0 \{e^{\mu t} / [1.0 - X_0(1.0 - e^{\mu t})] - 1.0\}$.

Penentuan parameter laju penggunaan substrat dihitung dari data fase stasioner, dan dihasilkan dari percobaan nilai δ sebagai berikut :

$$\delta = \frac{(dS/dt)_{\text{stat}} \times X_{\text{maks}}}{X_{\text{maks}}}$$

Nilai parameter τ dihasilkan dari persamaan sebagai berikut : $S_0 - S(t) - \tau [X(t) - X_0] = \delta(X_{\text{maks}}/\mu) \ln[1.0 - \bar{X}_0(1.0 - e^{\mu t})]$, dengan $S_0 = S(t=0)$. Dari plot data antara $[X(t)-X_0]$ dihasilkan nilai parameter τ .

Proses fermentasi dilakukan dalam bioreaktor Biostat M kapasitas 2 liter, pada konsentrasi sumber karbon dan pengaturan suhu yang optimal (hasil penelitian pendahuluan). Proses fermentasi dilakukan selama 6 hari dengan kecepatan agitrasinya 150 rpm dan waktu pengamatan dilakukan setiap 12 jam.

3. Tata Laksana

a. Pembuatan sirup glukosa

Pembuatan sirup glukosa atau hidrolisat pati onggok dilakukan secara enzimatik. Hidrolisis onggok berlangsung dalam dua tahap yaitu likuifikasi dan sakarifikasi.

Sebelum memasuki tahap likuifikasi, bahan baku onggok kering digiling menjadi tepung yang lolos saringan 60 mesh, kemudian dibuat suspensi dengan konsentrasi 7 persen (b/v).

Tahap likuifikasi berlangsung dengan cara sebagai berikut : mula-mula tepung onggok dilarutkan dengan sebagian air suling dan diatur pH-nya sampai 6.5 dengan penambahan larutan NaOH 2N. Sisa air suling dimasukkan ke dalam bioreaktor berpengaduk yang ditempatkan dalam penangas air bersuhu 90°C (Gambar 4).

Thermamyl atau α -amilase sebanyak 1 ml/kg pati dimasukkan ke dalam bioreaktor yang berisi air suling bersuhu 90°C dan kemudian suspensi onggok dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam bioreaktor. Setelah semua suspensi onggok dimasukkan, tahap likuifikasi dilanjutkan selama 2 jam.

Setelah tahap likuifikasi selesai, dilakukan penurunan suhu sampai 55°C dengan cara menempatkan bioreaktor ke dalam wadah yang berisi air dingin. Setelah itu dilakukan penurunan pH sampai 4.5 dengan penambahan larutan HCl 1N. Tahap sakarifikasi dilakukan dengan penambahan amiloglukosidase sebanyak 0.8 ml/kg pati. Sakarifikasi berlangsung selama 48 jam pada suhu 55 °C. Tahapan proses hidrolisis onggok dapat dilihat pada Gambar 5.



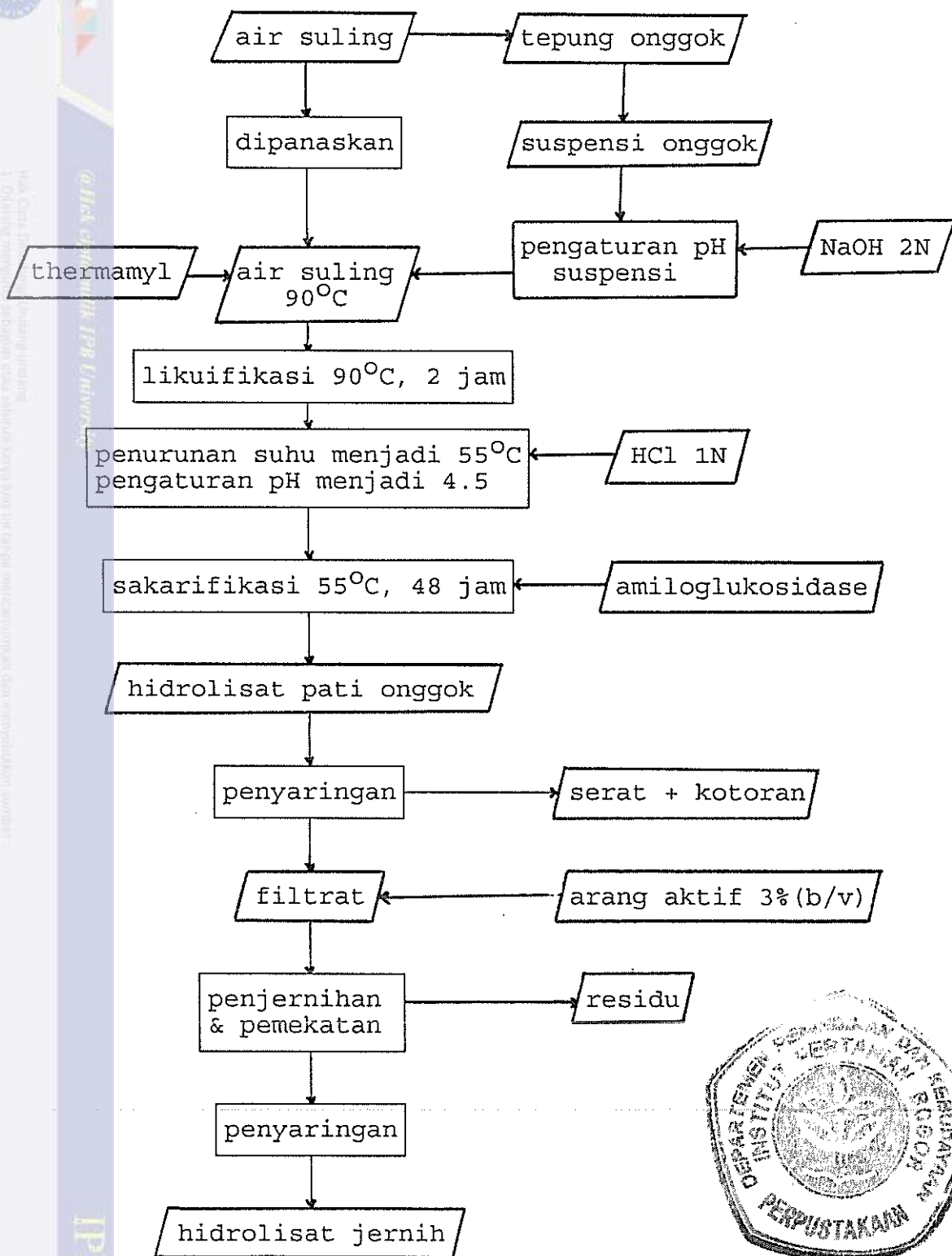
Gambar 4. Foto bioreaktor berpengaduk untuk pembuatan sirup glukosa dari onggok

b. Proses produksi

(1) Persiapan bahan

Proses produksi dilakukan dalam tiga tahapan yaitu penumbuhan kultur pada agar miring, propagasi pada medium cair dan penumbuhan pada media kultivasi.

Medium pertumbuhan awal adalah pada agar miring dan medium yang digunakan adalah agar



Gambar 5. Tahapan proses hidrolisis pati onggok menjadi sirup glukosa (modifikasi Dziedzic dan Kearsley, 1984; Anonim, 1984)

Sabouraud dengan komposisi seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi agar Sabouraud^a

Komponen	jumlah (g/l)
Neopepton (Difco)	10.0
Sukrosa	40.0
Agar	15.0

^aShipman dan Fan (1978)

Agar Sabouraud yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada inkubator bersuhu kamar (28 - 30°C) selama 48 jam. Setelah ditumbuhkan pada agar Sabouraud, kultur kemudian ditumbuhkan pada medium propagasi yang komposisinya terlihat pada Tabel 4.

Beberapa loop koloni pada agar Sabouraud diambil untuk diinokulasikan pada medium propagasi yang telah disterilkan kemudian diinkubasikan pada inkubator bergoyang dengan putaran 150 rpm, selama 48 jam dan pada suhu 28 - 30°C.

Substrat untuk proses produksi dimodifikasi dengan menggunakan sumber karbon dari hidrolisat pati onggok sebanyak konsentrasi yang diinginkan. Selain itu untuk memproduksi pululan juga dibutuhkan sejumlah mineral dan sumber N organik. Komposisi medium untuk produksi pululan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Komposisi medium propagasi^a

Komponen	Jumlah (g/l)
Glukosa	25.0
KH_2PO_4	5.0
NaCl	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Ekstrak khamir	2.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0

^aShipman dan Fan (1978)Tabel 5. Komposisi medium kultivasi^a

Komponen	Jumlah (g/l)
Hidrolisat onggok	25,50,75
KH_2PO_4	3
NaCl	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
Ekstrak khamir	0.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1

^aTaguchi et al. (1963)

(2) Proses fermentasi

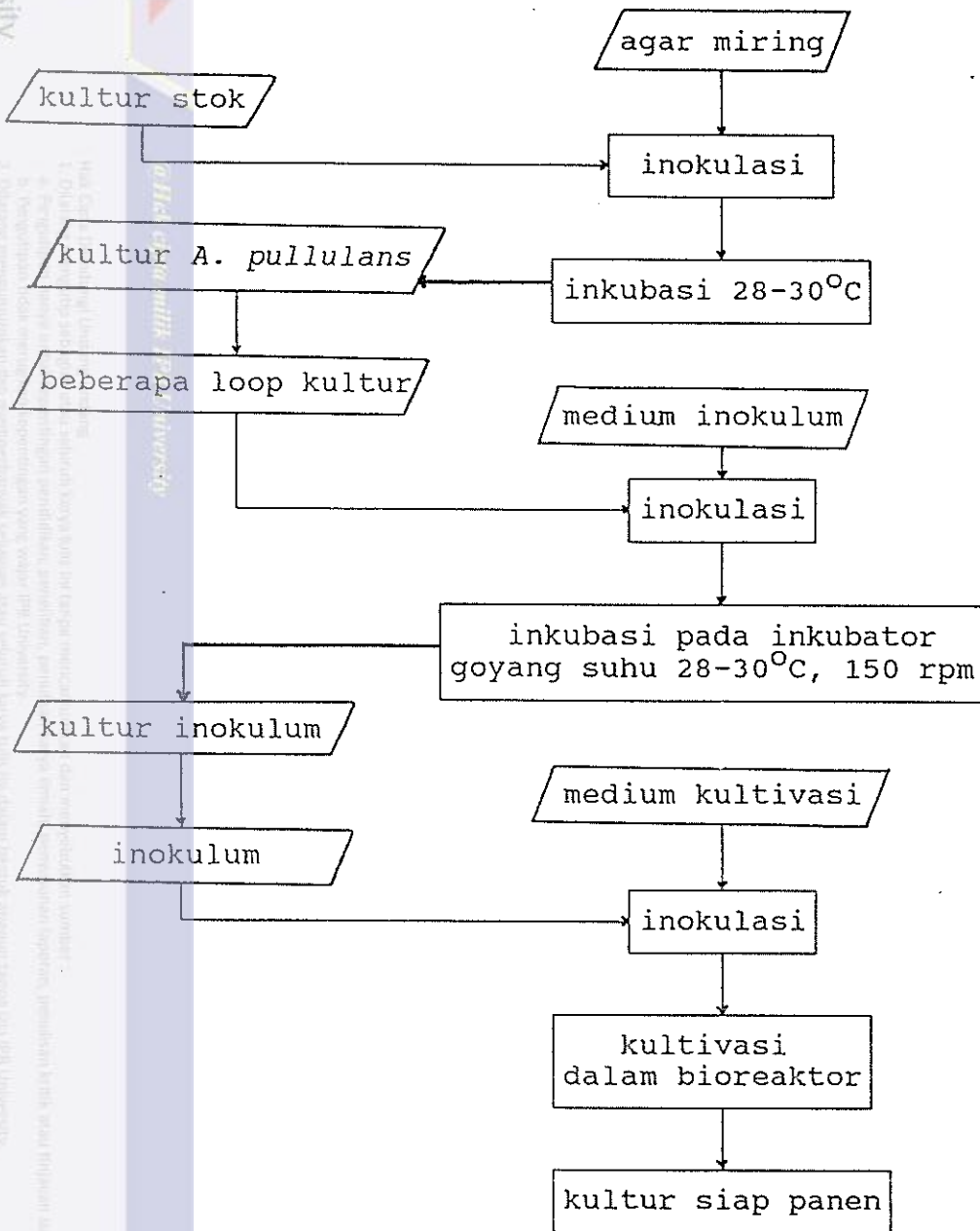
Proses fermentasi atau produksi pululan dilakukan dalam labu Erlenmeyer 250 ml dengan volume kultur 50 ml. Substrat diinokulasi oleh inokulum cair (dari medium propagasi) sebanyak 5 persen (v/v). Inkubasi dilakukan pada inkubator goyang (*shaker*) dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 6 hari, dan waktu pengamatan dilakukan setiap 24 jam.

Setelah didapatkan suhu dan konsentrasi sumber karbon yang optimum, dilakukan proses kultivasi pada bioreaktor (kapasitas 2 liter) dengan volume kerja 1 liter selama 6 hari dengan waktu pengamatan dilakukan setiap 12 jam pada kecepatan agitasi 150 rpm. Tahapan proses produksi selengkapnya terlihat pada Gambar 6.

(3) Pemanenan

Proses pemanenan dilakukan setelah berlangsung proses kultivasi selama 6 hari. Kultur mula-mula diukur volumenya misalkan X ml, kemudian ditambahkan air destilasi hangat ($\pm 80^{\circ}\text{C}$) dengan volume yang sama (X ml). Biomassa dipisahkan melalui sentrifugasi pada gaya sentrifugal 3 000 g selama 10 menit (hasil terbaik penelitian Harjo, 1992). Endapan yang terbentuk adalah biomassa dan selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai beratnya konstan, dan dinyatakan sebagai berat biomasa kering.

Fase cair yang berupa supernatan bebas sel, diukur volumenya (Y ml), kemudian ditambahkan pelarut aseton absolut dingin dengan volume yang sama (Y ml). Kemudian dilakukan



Gambar 5. Tahapan proses produksi pululan
(Modifikasi Shipman dan Fan, 1978).

pengadukan kencang dengan menggunakan pengaduk untuk menyempurnakan pengendapan. Selanjutnya supernatan disimpan dalam wadah pendingin bersuhu 0°C selama 4-6 jam.

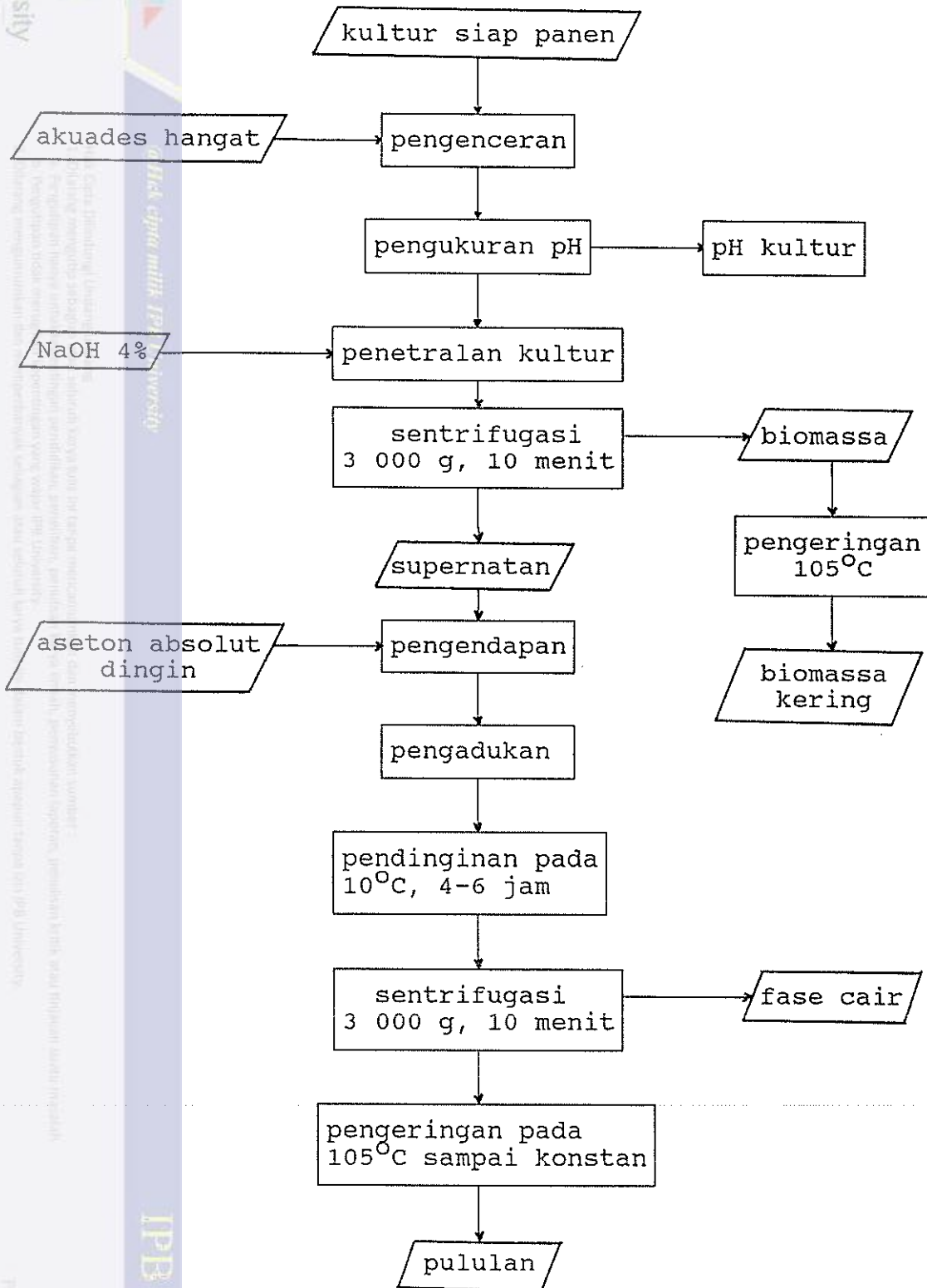
$$\text{Perolehan biomassa} = \frac{\text{bobot biomassa kering}}{\text{X ml kultur}} \quad (\text{mg/ml})$$

Pululan dipisahkan melalui sentrifugasi dengan menggunakan gaya sentrifugal 3 000 g selama 10 menit (hasil terbaik penelitian Harjo, 1992). Endapan yang terbentuk adalah pululan kasar, kemudian pululan dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C sampai beratnya konstan dan dinyatakan sebagai berat pululan kering. Tahapan proses pemanenan selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7.

$$\text{Rendemen pululan} = \frac{\text{berat pululan kering}}{\text{Y ml kultur}} \quad (\text{mg/ml})$$

(4) Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan meliputi perolehan biomassa dan pululan (modifikasi metode Shipman dan Fan, 1978), total gula sisa secara



Gambar 7. Tahapan proses pemanenan pululan
(Modifikasi Shipman dan Fan, 1978)

DNS (Miller, 1959), nilai pH kultur (menggunakan pH meter), viskositas kultur (menggunakan viskosimeter), penentuan parameter kinetika yang meliputi laju pertumbuhan spesifik (μ), metode Klimek dan Ollis, 1980), efisiensi konversi substrat menjadi biomassa ($Y_{x/s}$), efisiensi konversi substrat menjadi produk ($Y_{p/s}$), efisiensi penggunaan substrat ($\Delta s/s$) dan efisiensi pembentukan produk berdasarkan biomassa ($Y_{p/x}$).

Foto-foto yang berkaitan dengan penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 12 sampai dengan 16.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PENELITIAN PENDAHULUAN

Pada penelitian pendahuluan, dilakukan pengujian kemampuan tumbuh *Aureobasidium pullulans* isolat lokal dalam medium dengan sumber karbon hidrolisat pati onggok, serta optimasi suhu dan konsentrasi substrat pada produksi pululan isolat lokal tersebut.

Pengujian yang dilakukan dimaksudkan untuk melihat apakah *A. pullulans* isolat lokal ini mampu tumbuh dan berproduksi pada sumber karbon hidrolisat onggok.

Hidrolisat pati onggok ini mengandung komponen glukosa yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena kandungan pati (hasil analisis proksimat) dari onggok singkong kering yang digunakan cukup tinggi (Tabel 1), sehingga mempunyai potensi yang cukup besar untuk dapat dikonversikan menjadi glukosa melalui proses hidrolisis.

Hasil pengujian ini nantinya akan dibandingkan dengan kemampuan tumbuh kapang yang sama namun dengan menggunakan sumber karbon berupa glukosa murni.

Optimasi suhu dan konsentrasi substrat yang dilakukan bertujuan untuk melihat kemampuan memproduksi pululan dan efisiensi konversi substrat menjadi produk yang paling optimal pada kondisi suhu dan konsentrasi substrat tertentu. Hasil yang didapatkan ini nantinya digunakan pada penelitian utama, yang ditujukan untuk

mengetahui kinetika pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal.

1. Pengujian Produksi Pululan pada Hidrolisat Onggok

A. pullulans isolat lokal dicoba untuk ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon hidrolisat pati onggok. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 25 g/l, 50 g/l dan 75 g/l.

Alasan pemilihan glukosa murni sebagai sumber karbon pembanding adalah karena hasil hidrolisis onggok tapioka secara enzimatis memiliki kandungan komponen glukosa yang terbanyak.

a. Keasaman (pH) kultur

Pada penelitian yang dilakukan, tidak dilakukan pengaturan pH awal kultur. Pertimbangan ini didasarkan dari hasil penelitian Sunarti (1989) yang menyatakan bahwa proses produksi tanpa pengaturan pH awal kultur memberikan rendemen pululan tertinggi, dengan menggunakan sumber karbon dari tetes (molase). Jenis sumber karbon ini merupakan sumber karbon yang heterogen yaitu terdiri dari beberapa komponen gula-gula sederhana dan pH-nya sekitar 6.

Sirup glukosa dari hasil hidrolisis pati onggok secara enzimatis juga merupakan sumber karbon

yang heterogen, sehingga penggunaan kedua jenis sumber karbon ini mendapat perlakuan yang sama terhadap penentuan nilai pH awal kultur.

Keasaman (pH) suatu kultur selama fermentasi berlangsung mempunyai kecenderungan untuk berubah. Perubahan ini memperlihatkan adanya aktivitas pertumbuhan. Menurut Rehm dan Reed (1981), laju pertumbuhan tergantung pada nilai pH kultur, karena pH mempengaruhi fungsi membran, enzim dan komponen sel lainnya. Selain mempengaruhi pertumbuhan sel, nilai pH ini juga mempengaruhi pembentukan produk.

Laju produksi pululan tergantung pada pH eksternal medium (Heald dan Kristiansen, 1985). Nilai pH awal medium berpengaruh terhadap bentuk morfologi *A. pullulans* selama masa pertumbuhan sel. Pada pH rendah (pH 2.5), *A. pullulans* cenderung berada dalam bentuk filamen-filamen kapang, sedangkan pada pH tinggi *A. pullulans* cenderung berbentuk khamir. Bentuk morfologik khamir cenderung menghasilkan pululan lebih banyak daripada bentuk kapang (Harvey (1980) di dalam Heald dan Kristiansen, 1985).

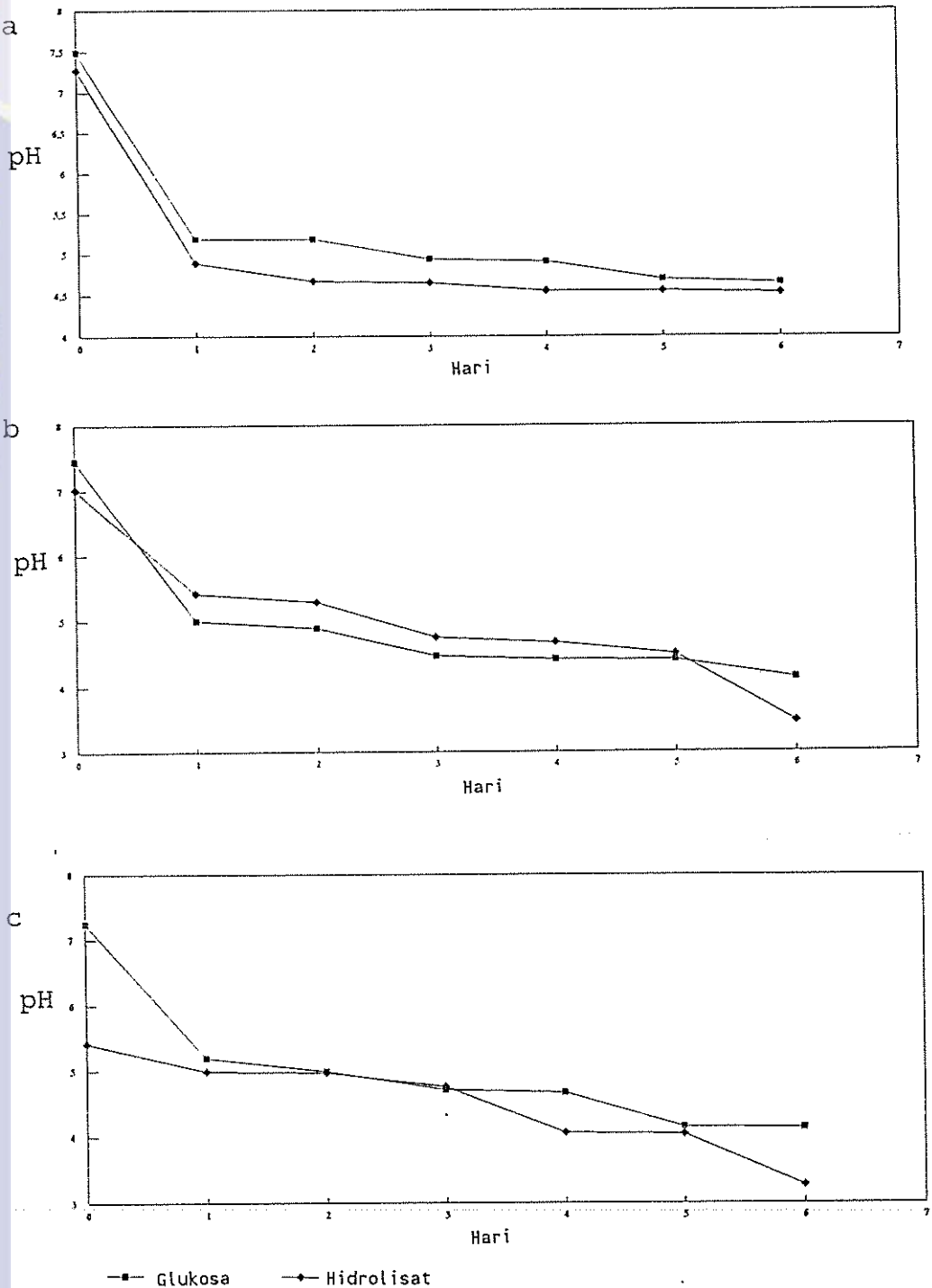
Nilai pH awal medium yang digunakan diatur pada kisaran netral (pH 7), dan diharapkan pada pH

ini proporsi bentuk khamir lebih dominan, sehingga produksi pululan dapat ditingkatkan.

Dari hasil penelitian (pada Gambar 8) dapat dilihat bahwa dari sejak dimulainya fermentasi sampai pada hari keenam, terjadi penurunan pH kultur dengan cepat (pH akhir 3.27 pada penggunaan sumber karbon hidrolisat pati onggok, konsentrasi 75 g/l). Walaupun demikian sel masih dapat tumbuh karena menurut Wang et al. (1978), sel khamir dapat tumbuh pada kisaran pH 3 - 6, sedangkan Clark dan Wallace (1957) menyatakan bahwa *A. pullulans* masih dapat mengkonsumsi oksigen pada kisaran pH 3.0 - 7.4.

Secara umum, kapang dapat tumbuh pada kisaran pH yang cukup besar (pH 3 - 8.5), dengan nilai pH optimumnya adalah 4.5 - 5.5 (Judoamidjojo et al., 1989; Fardiaz, 1988).

Penurunan nilai pH kultur disebabkan karena penggunaan amonium sulfat sebagai sumber nitrogen. Di dalam kultur, amonium terdisosiasi menjadi NH_4^+ , dan dengan sel mikroorganisme bergabung membentuk kompleks R-NH_3^+ . Pelepasan ion H^+ ke dalam kultur menyebabkan nilai pH kultur menurun. Selain itu pembentukan dan akumulasi asam organik seperti asam laktat, asam asetat dan asam piruvat juga menyebabkan penurunan nilai pH kultur (Wang et al., 1978).



Gambar 8. Grafik perubahan pH *A. pullulans* pada beberapa konsentrasi sumber karbon (fermentasi pada labu Erlenmeyer, agitasi 150 rpm, suhu kamar): a. konsentrasi substrat 25 g/l; b. konsentrasi substrat 50 g/l; c. konsentrasi substrat 75 g/l

Penurunan nilai pH lebih tajam yang terjadi pada penggunaan sumber karbon hidrolisat pati onggok yang dibandingkan dengan glukosa. Disebabkan karena dari proses hidrolisis enzimatis umumnya dihasilkan nilai pH sekitar 5. Selain itu adanya kandungan komponen garam-garam anorganik seperti kalsium dan potasium yang dihasilkan selama proses hidrolisis dapat mempengaruhi penurunan pH (Dziedzic dan Kearsley, 1984). Hal ini juga yang mempengaruhi terjadinya penurunan pH setelah dilakukan sterilisasi sumber karbon pada penggunaan konsentrasi substrat yang lebih tinggi (75 g/l).

b. Perolehan Biomassa

Biosintesis komponen-komponen penyusun sel dimulai dari senyawa-senyawa yang terdapat di dalam medium. Adanya pertumbuhan *A. pullulans* di dalam kultur ditandai dengan peningkatan massa sel atau jumlah sel. Kedua hal tersebut dapat diketahui dari perolehan biomassa yang dihasilkan selama fermentasi.

Usaha memaksimumkan pertumbuhan mikroorganisme dapat dilakukan dengan menentukan nutrisi yang diperlukan dan pengaturan kondisi yang sesuai. Semua mikroorganisme memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi dan faktor

esensial pertumbuhan (mineral dan vitamin) untuk menopang pertumbuhannya.

Pemasokan sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan optimal. Ditinjau dari jumlahnya, komponen utama nutrisi merupakan sumber karbon dan nitrogen. Senyawa ini menyediakan energi dan bahan-bahan pembangun untuk senyawa sel, dan karena hampir semua komponen sel mengandung karbon, maka kebutuhan nutrisi yang mengandung karbon adalah tinggi (Prentis, 1985). Hal inilah yang menyebabkan perolehan biomassa tertinggi dihasilkan pada konsentrasi substrat yang paling besar yaitu 75 g/l baik pada sumber karbon hidrolisat onggok maupun pada glukosa murni (19.47 g/l dan 19.20 g/l) (Lampiran 4).

A. pullulans merupakan kapang yang bersifat aerobik (Shipman dan Fan, 1978). Dalam upaya untuk tetap dapat hidup, maka *A. pullulans* mendapatkan energi melalui oksidasi piruvat, menghasilkan CO_2 dan air (siklus asam trikarboksilat atau siklus Krebs). Untuk itu, sumber karbon harus dihidrolisa menjadi karbon rantai 2 atau 3 yang akan diumpankan ke dalam siklus trikarboksilat. Oleh karena itu semakin tinggi konsentrasi sumber karbon yang terkandung dalam medium, maka akan semakin besar

energi yang dihasilkan untuk pertumbuhan mikroorganisme, yang menyebabkan semakin tinggi jumlah perolehan biomassa yang dihasilkan.

Perolehan biomassa juga dipengaruhi oleh nilai pH awal kultur (Lacroix et al., 1985) dan konsentrasi senyawa nitrogen dalam medium (Cartley, 1971b). Berdasarkan hasil penelitian terlihat bahwa perolehan biomassa yang tertinggi dari ketiga konsentrasi substrat yang digunakan, dihasilkan pada nilai pH yang optimum (pH 4.55 - 4.76).

c. Rendemen pululan

Pululan merupakan produk utama dalam kultivasi ini. Pululan terbentuk karena enzim-enzim di dalam sel dikeluarkan melewati dinding sel, untuk mengubah substrat menjadi produk.

Menurut Fardiaz (1988), salah satu ciri dari metabolit sekunder yaitu komponen tersebut tidak diproduksi pada waktu pertumbuhan sel secara cepat, tetapi dibentuk pada akhir masa pertumbuhan. Pululan merupakan produk metabolit yang dipanen pada fase stasioner pertumbuhan sel (Clark dan Wallace, 1957). Dengan demikian, pada akhir waktu fermentasi diharapkan produksi pululan menghasilkan rendemen yang tertinggi.

Pada fermentasi *A. pullulans* secara curah, rendemen pululan dipengaruhi oleh galur *A. pullulans* (Leather et al., 1988), pH awal kultur dan jenis serta konsentrasi sumber nitrogen (Cartley, 1971b), jenis dan konsentrasi sumber karbon (Cartley, 1971a) dan suhu proses (Ueda et al., 1963).

Shin et al. (1989) menyatakan bahwa dalam biosintesis pululan, *A. pullulans* dapat menghasilkan polisakarida dari substrat glukosa, xilosa, galaktosa, arabinosa, maltosa, sukrosa dan laktosa, yang kesemuanya itu merupakan sumber karbon yang homogen. Selain glukosa, hidrolisat pati onggok juga mengandung xilosa dan manosa (hasil penelitian Ratmono, 1994), yang dapat mempengaruhi pembentukan polisakarida pululan. Hal ini menyebabkan *A. pullulans* harus mengeluarkan energi yang berlebih dalam mengkonsumsi sumber karbon hidrolisat pati onggok, sehingga mempengaruhi nilai rendemen pululan yang dihasilkan pada akhir waktu fermentasi. Moat dan Foster (1988) menyatakan bahwa apabila mikroorganisme ditumbuhkan pada medium yang mengandung sumber karbon heterogen (lebih dari satu jenis komponen gula), maka mikroorganisme tersebut akan menggunakan gula yang lebih mudah dikonsumsi terlebih dahulu, setelah itu baru kemudian mengkonsumsi jenis gula yang lainnya.

Cartley (1979) mengamati pengaruh konsentrasi sumber karbon dan dinyatakan bahwa pululan diproduksi pada saat terjadi kelebihan sumber karbon. Namun pululan tidak dapat terbentuk jika kandungan sumber karbon kurang dari 0.5 persen, sedangkan Bermejo et al. (1981) menyatakan bahwa polimer ekstraseluler pululan hanya dapat diproduksi pada konsentrasi glukosa 2 persen atau lebih. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa rendemen pululan yang tertinggi dihasilkan pada konsentrasi substrat 50 g/l, baik pada penggunaan glukosa (8.64 g/l) maupun hidrolisat pati onggok (7.3 g/l) sebagai sumber karbonnya (Lampiran 5).

Konsentrasi substrat sebesar 25 g/l terlalu rendah untuk dapat menghasilkan pululan (Lacroix et al., 1985), sehingga sumber karbon yang ada telah dikonversi untuk membentuk metabolit-metabolit primer yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel mikroorganismenya, sehingga tidak terjadi kelebihan sumber karbon yang optimal untuk dapat dikonversi menjadi polisakarida pululan.

Sedangkan rendemen pululan yang rendah pada konsentrasi substrat 75 g/l (5.25 g/l pada sumber karbon glukosa dan 4.71 g/l pada sumber karbon hidrolisat pati onggok, dalam Lampiran 5.), disebabkan karena terjadinya penurunan relatif kecepatan sintesis suatu enzim tertentu oleh karena

adanya efek glukosa atau kekurangan C'AMP (defisiensi siklik 3', 5', adenosin monofosfat) (Fardiaz, 1988; Gumbira-Sa'id, 1987).

d. Total gula sisa

Substrat gula dikonsumsi oleh *A. pullulans* untuk pertumbuhan sel, pemeliharaan sel dan pembentukan pululan.

Total gula akhir merupakan residu gula yang tidak dapat dikonversi oleh mikroorganisme. Gumbira-Sa'id (1985) menyatakan bahwa pemasokan sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan optimal, tetapi pada kenyataannya konsentrasi sumber karbon mempunyai batas maksimum.

Hasil penelitian memperlihatkan terjadinya penurunan kadar total gula sisa di dalam kultur sampai akhir fermentasi. Hal ini disebabkan karena *A. pullulans* memiliki enzim-enzim yang dapat memanfaatkan glukosa, xilosa dan manosa yang terdapat didalam hidrolisat onggok (Shipman dan Fan, 1978).

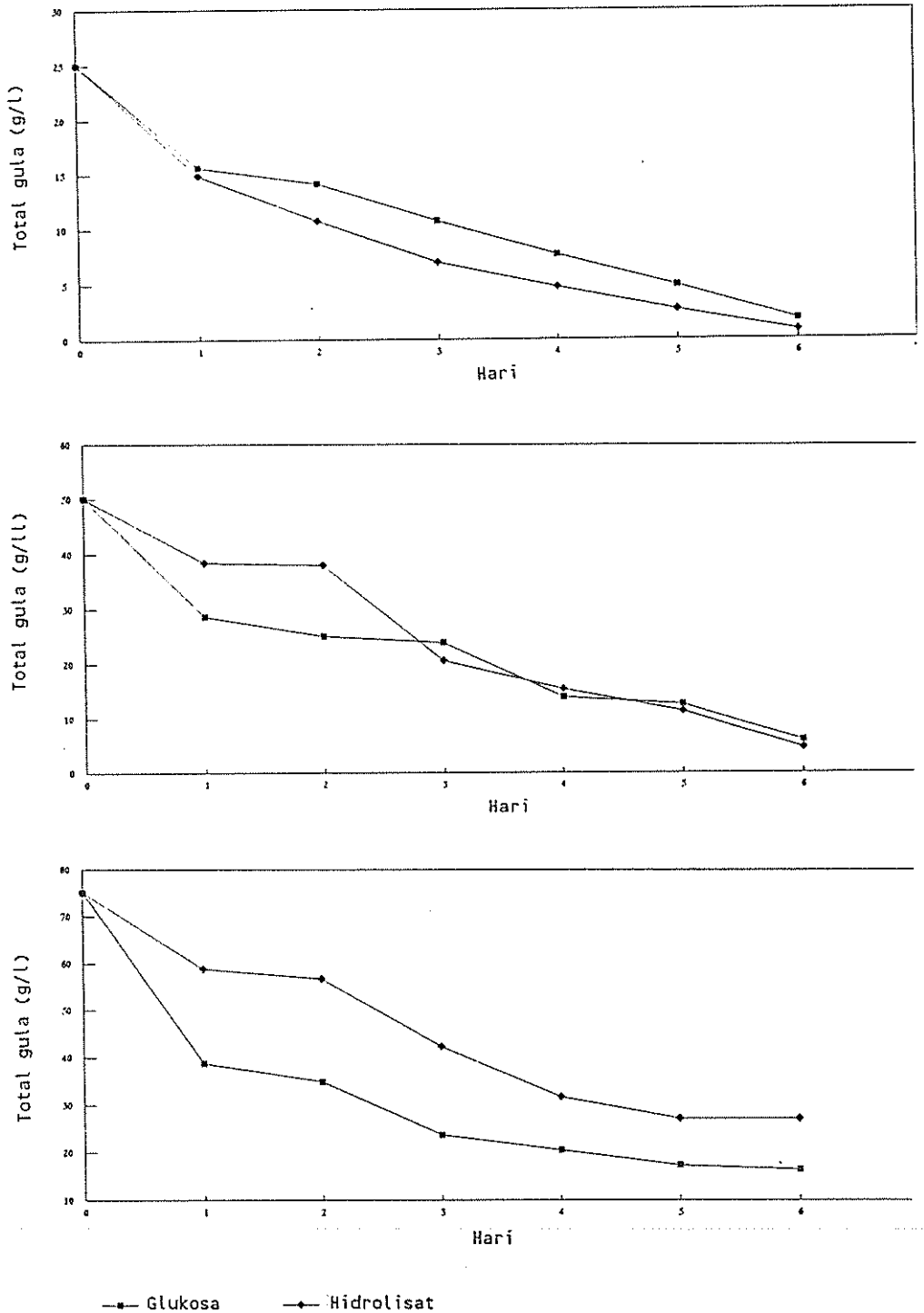
Pada Gambar 9 dapat dilihat bahwa penurunan kadar total gula sisa terjadi secara cepat dari sejak awal fermentasi sampai dengan hari kedua (jam ke 48), dan seterusnya laju penurunannya

berkurang. Hal tersebut disebabkan karena pada 48 jam pertama, *A. pullulans* berada dalam bentuk morfologik khamir, dan menggunakan sumber karbon lebih banyak dibandingkan pada fase-fase pertumbuhan berikutnya (Neil et al., 1989).

Kadar gula sisa di akhir fermentasi berbeda-beda untuk setiap konsentrasi substrat dan jenis sumber karbon yang digunakan. Hasil perhitungan efisiensi konversi substrat dalam pembentukan produk ($Y_{p/s}$) yang tertinggi dihasilkan pada penggunaan konsentrasi substrat sebesar 50 g/l (Lampiran 5.), baik pada sumber karbon glukosa murni (0.19) maupun pada hidrolisat pati onggok (6.46).

2. Optimasi Suhu dan Konsentrasi Substrat

Dari hasil pengujian produksi pululan pada hidrolisat pati onggok didapatkan bahwa *A. pullulans* isolat lokal dapat ditumbuhkan pada sumber karbon hidrolisat pati onggok. Berdasarkan parameter yang diamati (nilai pH akhir kultur, perolehan biomassa, rendemen pululan dan kadar gula sisa) terlihat kecenderungan yang sama jika dibandingkan dengan penggunaan sumber karbon glukosa murni.



Gambar 9. Grafik perubahan total gula sisa *A. pullulans* pada beberapa konsentrasi sumber karbon (kultivasi pada erlenmeyer, agitasi 150 rpm, suhu kamar): a. konsentrasi substrat 25 g/l; b. konsentrasi substrat 50 g/l; c. konsentrasi substrat 75 g/l

Untuk mendapatkan produksi pululan yang optimal dalam bioreaktor, maka perlu diketahui kondisi pertumbuhan optimal dari *A. pullulans* isolat lokal ini. Oleh karena itu dilakukan pengkajian terhadap optima suhu dan konsentrasi substrat.

Fermentasi dilakukan dengan menggunakan tiga tingkat suhu (24°C , 27°C , 30°C) dan tiga tingkat konsentrasi substrat (25 g/l, 50 g/l, 75 g/l).

a. Perolehan biomassa

Biomassa merupakan hasil ikutan proses produksi pululan, terutama karena pembentukan polisakarida tidak mungkin terjadi tanpa adanya sel.

Pertumbuhan kapang *A. pullulans* sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan pertumbuhan seperti pH, suhu dan zat hara.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 7a) memperlihatkan bahwa pengaturan suhu berpengaruh nyata terhadap rendeman biomassa. Konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata terhadap perolehan biomassa. Interaksi antara pengaturan suhu dan konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap perolehan biomassa yang dihasilkan.

Hasil analisis dengan uji kisaran ganda Duncan terhadap biomassa pada Lampiran 7b. memperlihatkan interaksi antar perlakuan.

Perolehan biomassa yang didapatkan berkisar antara 5.00 g/l sampai dengan 19.47 g/l sel kering (Lampiran 6). Rendemen biomassa tertinggi diperoleh dari medium dengan konsentrasi 75 g/l pada suhu 27°C dengan lama fermentasi 3 hari yaitu 19.47 g/l, sedangkan rendemen biomassa terendah (5.00 g/l) diperoleh pada suhu 30°C dengan konsentrasi substrat 25 g/l setelah 3 hari waktu fermentasi.

Konsentrasi substrat yang rendah merupakan salah satu faktor pembatas bagi pertumbuhan mikroorganisme. Sebaliknya jika konsentrasi substrat terlalu tinggi dapat menyebabkan proses dehidrasi pada sel mikroorganisme sehingga dapat juga menjadi faktor penghambat bagi pertumbuhan, selain adanya faktor penghambat lain seperti adanya regulasi katabolit dari sumber karbon yang digunakan selama kultivasi berlangsung (Fardiaz, 1988; Gumbira-Sa'id, 1987; Moat dan Foster, 1988).

Penurunan massa sel pada umumnya terjadi pada hari ke-3 dan ke-4 dari waktu kultivasi yang berlangsung selama 6 hari. Penurunan massa sel dapat disebabkan karena adanya hasil-hasil metabolisme yang beracun dan dapat menghambat pertumbuhan sel. Pada fase ini pertumbuhan sel masih mungkin naik, karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati (Fardiaz, 1992).

Pengaturan suhu proses produksi pululan berkisar antara 20-30°C (Ueda et al., 1963). Mikroorganisme mempunyai suhu optimum, minimum dan maksimum untuk pertumbuhannya. Hal ini disebabkan di bawah suhu minimum dan di atas suhu maksimum, aktivitas enzim akan berhenti, bahkan pada suhu yang terlalu tinggi akan terjadi denaturasi enzim. Fardiaz (1992) menyatakan bahwa kapang tumbuh baik pada suhu kamar. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa pengaturan suhu 27°C memberikan hasil yang terbaik, yang menghasilkan perolehan biomassa yang tertinggi pada berbagai konsentrasi substrat, yaitu 11.13 g/l, 11.56 g/l dan 19.47 g/l untuk konsentrasi substrat 25 g/l, 50 g/l dan 75 g/l.

Penurunan massa sel yang terjadi pada medium dengan konsentrasi substrat 25 g/l, mempunyai pola yang sedikit berbeda (Gambar 10.). Pada perlakuan suhu 24°C dan 27°C, penurunan massa sel terjadi pada hari ke-6, dan pertumbuhan sel yang terjadi pada suhu 24°C lebih lambat jika dibandingkan pada suhu 27°C. Hal ini disebabkan karena isolat lokal diisolasi dari daerah tropis sehingga lebih mudah tumbuh pada kisaran suhu yang tinggi (27 - 30 °C), disamping itu konsentrasi sumber karbon yang terlalu rendah.

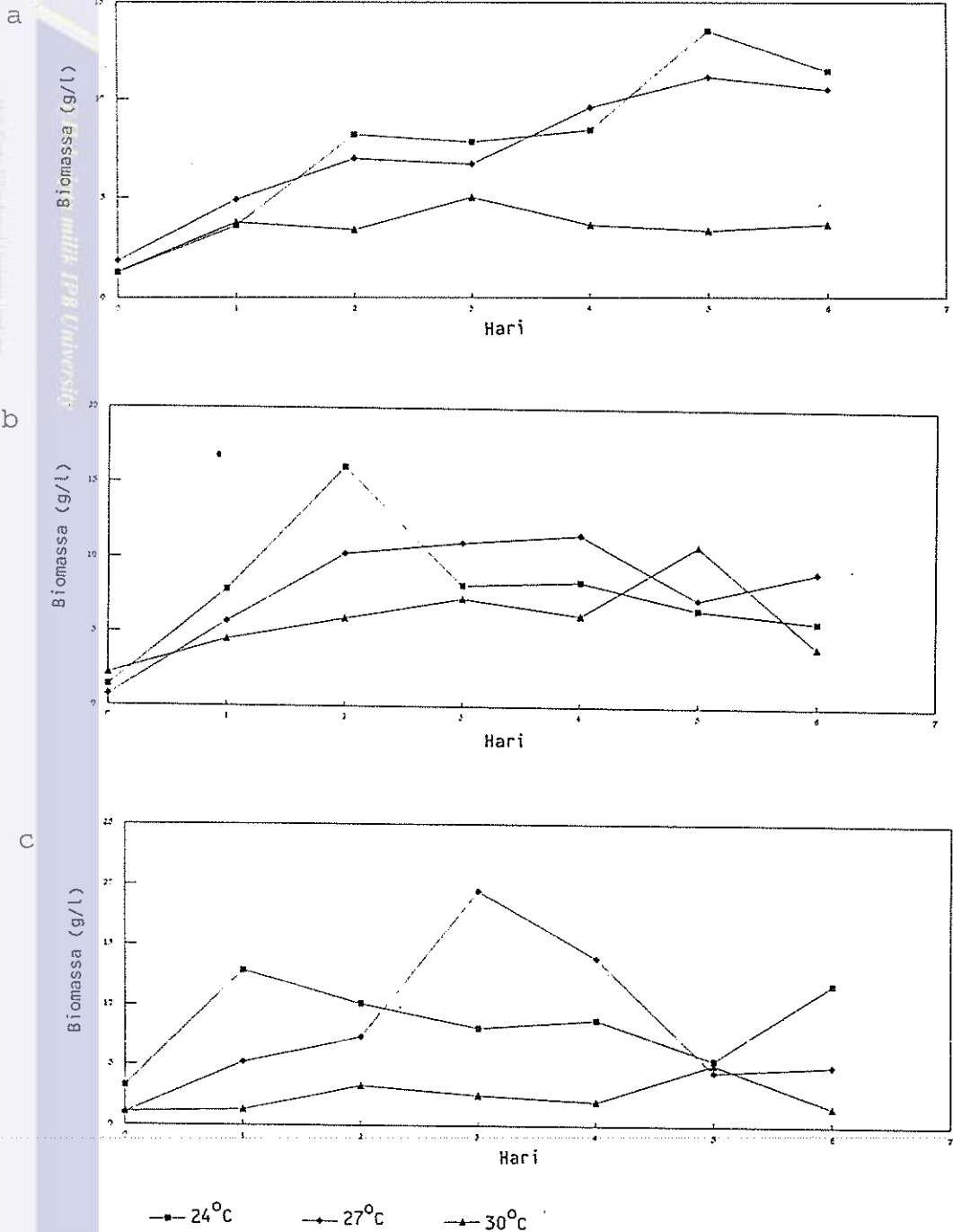
Sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan optimal. Disamping itu *A. pullulans* pada 48 jam pertama berada dalam bentuk khamir, dan menggunakan sumber karbon lebih banyak dibandingkan pada waktu-waktu fermentasi berikutnya (Neil et al., 1989), sehingga keterseediaan sumber karbon yang kurang mencukupi dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang lambat.

b. Rendemen pululan

Pululan merupakan hasil utama yang diharapkan pada kultivasi ini. Dari hasil penelitian, nilai rendemen pululan berkisar antara 1.34 g/l sampai dengan 7.30 g/l. Produksi pululan yang tertinggi dihasilkan pada media kultivasi dengan konsentrasi substrat 50 g/l pada suhu 27°C, sedangkan produksi pululan yang terendah dihasilkan pada media fermentasi dengan konsentrasi substrat 25 g/l pada suhu 24°C.

Hasil analisis sidik ragam produksi pululan pada Lampiran 8. menunjukkan bahwa konsentrasi substrat dan pengaturan suhu, serta interaksi antar kedua perlakuan tidak berbeda nyata.

Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa pululan dapat diproduksi pada setiap perlakuan, walaupun hasil produksinya belum tentu optimal.



Gambar 10. Grafik perubahan biomassa *A. pullulans* pada sumber karbon hidrolisat pati onggok (fermentasi pada Erlenmeyer, agitasi 150 rpm): (a) Konsentrasi substrat 25 g/l; (b) konsentrasi substrat 50 g/l; (c) konsentarsi substrat 75 g/l

Cartley (1979) menyatakan bahwa pululan akan diproduksi pada keadaan dimana terdapat kelebihan sumber karbon.

Produksi pululan tertinggi terlihat pada penggunaan konsentrasi substrat 50 g/l. Produksi pululan pada konsentrasi 75 g/l lebih tinggi dibandingkan pada konsentrasi substrat 25 g/l.

Produksi pululan pada konsentrasi substrat 75 g/l lebih rendah jika dibandingkan pada 50 g/l, tetapi produksi biomassa yang dihasilkan lebih tinggi (Lampiran 6). Hal ini dapat disebabkan karena sumber karbon (konsentrasi substrat 75 g/l) yang terdapat dalam media kultivasi hanya digunakan untuk pembentukan sel mikroorganisme (pembentukan metabolit primer) dan adanya represi katabolit karbon yang dapat menghambat pembentukan metabolit sekunder (produksi pululan).

c. Total gula sisa

Total gula akhir merupakan residu gula yang belum atau tidak dapat dikonversi lagi. Dari hasil pengamatan (Lampiran 6) terlihat bahwa total gula sisa berkisar antara 0.82 g/l sampai dengan 36.81 g/l. Tinggi rendahnya kandungan gula residu dalam kultur dipengaruhi oleh kemampuan kapang untuk mengkonversi sumber karbon yang terdapat dalam substrat menjadi biomassa dan pululan.

Hasil analisis sidik ragam total gula sisa pada Lampiran 9a. menunjukkan bahwa konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap total gula sisa, sedangkan pengaturan suhu memperlihatkan pengaruh yang sangat nyata terhadap total gula sisa. Interaksi antar kedua perlakuan juga memperlihatkan pengaruh yang nyata terhadap total gula sisa.

Hasil analisis dengan uji kisaran ganda Duncan terhadap total gula sisa memperlihatkan interaksi antar perlakuan (Lampiran 9b).

Hasil tertinggi diperlihatkan pada medium dengan konsentrasi substrat 75 g/l pada suhu 30°, sedangkan hasil yang terendah diperlihatkan pada medium dengan konsentrasi substrat 25 g/l pada suhu 27°C. Hal ini disebabkan karena konsentrasi substrat yang terlalu rendah (25 g/l), dan suhu yang tinggi (30°C). Suhu tinggi ini dapat menyebabkan denaturasi enzim yang terdapat di dalam sel *A. pulullulans* sehingga mempengaruhi pertumbuhan sel.

d. Keasaman (pH) kultur

Salah satu kondisi lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah pH media pertumbuhan. Kapang dapat tumbuh pada kisaran pH

yang luas, yaitu pH 3 - 8.5 (Judoamidjojo et al., 1989; Fardiaz, 1988).

Perhitungan hasil analisis sidik ragam pH akhir kultur pada Lampiran 10a. menunjukkan bahwa konsentrasi substrat, pengaturan pH dan interaksi antar keduanya memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai pH akhir kultur. Pengujian dilanjutkan dengan analisis uji ganda Duncan untuk memperlihatkan interaksi antar perlakuan (Lampiran 10b).

Keasaman (pH) kultur mempunyai kecenderungan yang berubah, yang dapat disebabkan karena adanya amonium sulfat sebagai sumber nitrogen. Amonium sulfat dalam keadaan terdisosiasi (NH_4^+), akan bergabung dengan mikroorganisme membentuk sel dalam bentuk R-NH_3^+ , dan meninggalkan ion H^+ di dalam kultur (Wang et al., 1978).

Hasil penelitian yang dilakukan (Lampiran 6) menunjukkan pH akhir kultur berkisar antara 3.27 sampai 4.55.

Menurut Heald dan Kristiansen (1985) pH eksternal tidak berhubungan dengan produksi pululan. Pengaruh pH bukanlah merubah jumlah biomassa tetapi menginduksi bentuk khamir selama awal pertumbuhan. Bentuk khamir ini akan berasosiasi dengan produksi polisakarida ekstraseluler pululan.

B. PENELITIAN UTAMA

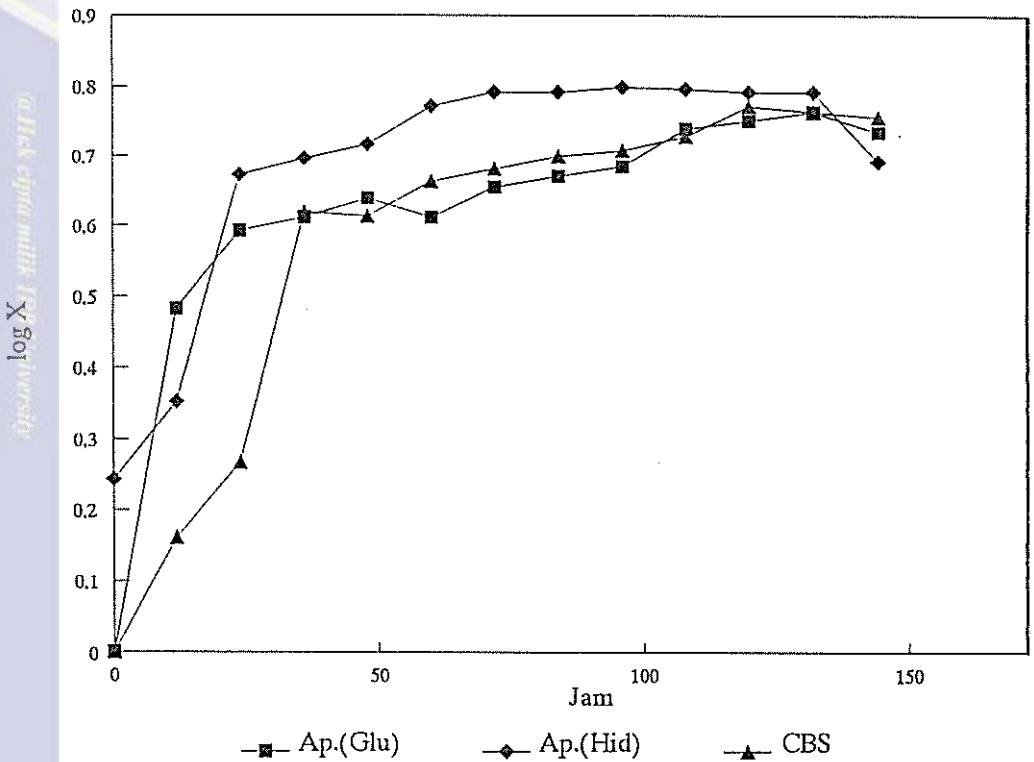
1. Kinetika Fermentasi

Pertumbuhan mikroorganisme yang dicirikan dengan peningkatan massa sel dan atau jumlah sel, dapat langsung terjadi bila kondisi kimiawi dan fisik tertentu terpenuhi. Kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk memperlihatkan kemampuan sel dalam memberikan respon terhadap lingkungan dan kondisi proses.

Pertumbuhan sel dan pembentukan produk selalu berhubungan dengan konsumsi nutrisi dalam media dan pembentukan produk tidak mungkin terjadi tanpa adanya sel. Dengan demikian jelas bahwa kinetika fermentasi merupakan fungsi dari waktu dan sel.

Kurva pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal dan *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada konsentrasi substrat 50 g/l dan suhu 27°C (konsentrasi substrat dan suhu yang optimal) ditunjukkan pada Gambar 9.

Dengan membandingkan hasil pengamatan pada Gambar 11 dengan Gambar 4, maka dapat ditentukan fase stasionernya. Fase stasioner untuk *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa terjadi setelah jam ke 36, sedangkan fase stasioner dari *A. pullulans* isolat lokal dan galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat onggok terjadi setelah jam ke-48.



Keterangan :

Ap. (Glu) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa

Ap. (Hid) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat onggok

CBS : *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat onggok

Gambar 11. Grafik pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal dan galur CBS-CY-PP-14 pada bioreaktor

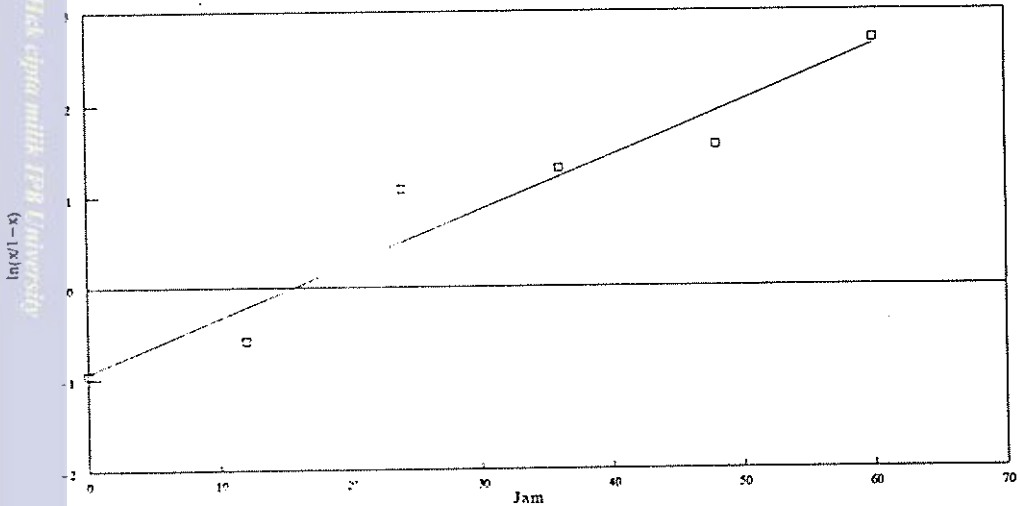
Penentuan kurva pertumbuhan untuk setiap kultur digunakan untuk menghitung parameter kinetika fermentasi. Parameter kinetika fermentasi dihitung berdasarkan metode yang diberikan oleh Klimek dan Ollis (1980).

Berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan sel, didapatkan *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat pati onggok mempunyai nilai $X_{\max}$ sebesar 6.30 (g/l)_x (Lampiran 7). Dengan mengasumsikan bahwa pada suatu lingkungan tertentu, peningkatan massa sel atau penggandaan jumlah sel tidaklah konstan dengan waktu. Pada keadaan tersebut mikroorganisme tumbuh pada fase eksponensial serta pertumbuhan yang seimbang dan mantap ditandai oleh laju pertumbuhan spesifik (μ) yang konstan. Hal ini terjadi pada periode pertumbuhan sel fase eksponensial (Wang et al., 1978).

Dengan menggunakan persamaan (17), diplotkan semua data pada fase eksponensial dan dihasilkan regresi garis lurus pada Gambar 12. Parameter μ diperoleh dari plot data antara $\ln [X/(1.0 - X)]$ dengan waktu (t). Kemiringan yang diperoleh pada data tersebut merupakan nilai $\mu = 0.059 \text{ jam}^{-1}$, dan nilai konstanta yaitu perpotongan pada saat $t=0$ adalah nilai $-\ln[X_{\max}/X_0]-1.0$, sehingga dihasilkan nilai $X_0 = 1.781 \text{ g/l}$, yang merupakan jumlah sel awal yang dapat hidup. Nilai parameter μ dan X_0 dapat dilihat pada Tabel 6.

Pengukuran parameter pembentukan produk ditentukan dari data setelah memasuki fase stasioner. Hal ini berarti kinetika pertumbuhan sel dan pembentukan

produk pada fermentasi curah mengikuti pola pertumbuhan tidak berasosiasi dengan pertumbuhan sel (Wang



Persamaan garis :

$$\ln [X/(1.0 - X)] = 0.0265 t + 0.2182$$

$$r^2 = 0.93$$

Gambar 12. Grafik hubungan $\ln[X/(1.0 - X)]$ dan waktu untuk pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok

et al., 1978). Pululan tidak disintesis sejalan dengan pembentukan sel, tetapi diproduksi pada kondisi dimana terdapat kelebihan sumber karbon dan pertumbuhan sel dibatasi oleh beberapa nutrisi penting terutama senyawa N. Dari keadaan di atas, Cartley (1979) menyimpulkan bahwa pululan merupakan produk metabolit sekunder dan diasosiasikan sebagai cadangan nutrisi serta terbentuk pada fase pemeliharaan sel.

Parameter laju pembentukan produk ditentukan dari nilai (dP/dt) pada fase stasioner. Dengan memasukkan nilai pada persamaan (19), dapat ditentukan nilai β sebagai berikut :

$$\beta = \frac{(6.72 - 5.92) (g/l)p/60jam}{6.30 (g/l)x} = 0.0021 \frac{(g/l)p}{(g/l)x jam}$$

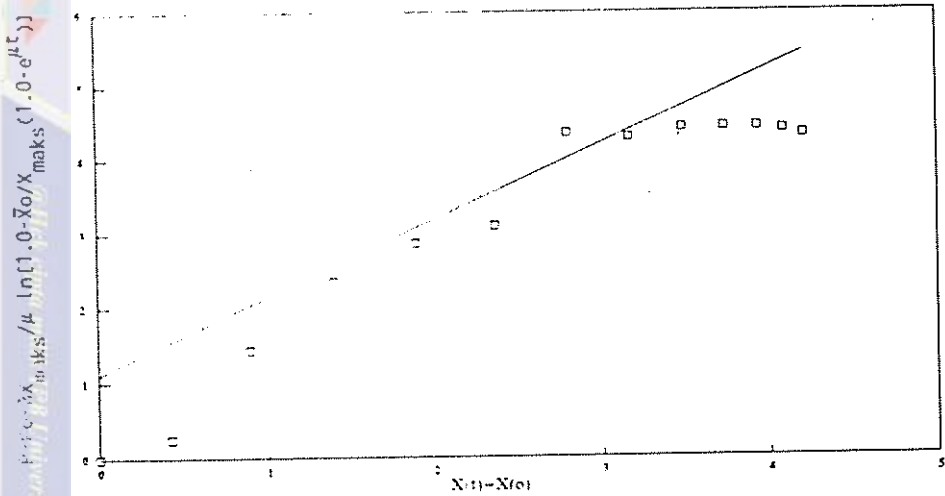
Parameter α dihitung dari kemiringan garis dari plot data antara $(X_t - X_o)$ dengan $[P - P_o - \beta X_{maks}/\mu \ln(1.0 - X_o(1.0 - e^{\mu t}))]$, dengan menggunakan persamaan (21), sehingga akan didapatkan nilai $\alpha = 1.159 (g/l)p/(g/l)x$ (Gambar 13).

Parameter laju penggunaan substrat ditentukan dari nilai (dS/dt) pada fase stasioner. Nilai δ dihitung dengan memasukkan nilai pada persamaan (22) sebagai berikut:

$$\delta = \frac{(4.03 - 0.31) (g/l)s/60jam}{6.3 (g/l)x} = 0.0098 \frac{(g/l)s}{(g/l)x jam}$$

Parameter τ diperoleh dari kemiringan grafik plot data antara $(X_t - X_o)$ dengan $[S - S_o - \beta X_{maks}/\mu \ln(1.0 - X_o(1.0 - e^{\mu t}))]$, dengan menggunakan persamaan (23), sehingga akan didapatkan nilai $\tau = 10.580 (g/l)s/(g/l)x$ (Gambar 14).

Penentuan nilai parameter kinetika fermentasi untuk pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal pada



Persamaan Garis :

$$P - P_o - \frac{\beta X_{\text{maks}}}{\mu} \ln 1.0 - \bar{X}_o (1.0 - e^{\mu t}) = 1.0851 [X(t) - X(o)] + 0.4083$$

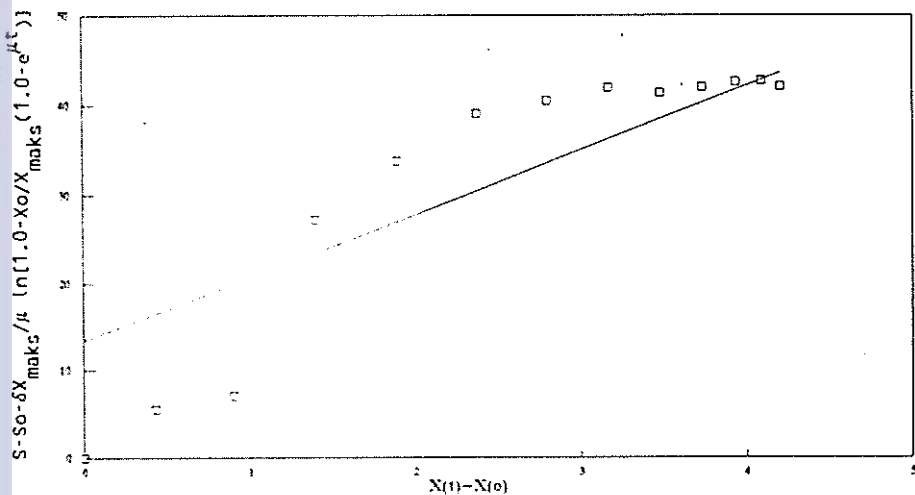
$$r^2 = 0.92$$

Gambar 13. Grafik hubungan antara $P - P_o - (nX_{\text{maks}}/\mu) \ln[1.0 - X_o(1.0 - e^{\mu t})]$ untuk *A. pullulans* isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok.

sumber karbon glukosa dan *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat dihitung dengan cara yang sama, dapat dilihat pada Tabel 6.

Penentuan parameter kinetika fermentasi digunakan untuk menentukan kecepatan pertumbuhan sel, pembentukan produk dan penggunaan nutrisi, sedangkan untuk menentukan tingkat efisiensi penggunaan substrat menjadi biomassa dan pululan dapat ditentukan dari nilai $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ dan $\Delta S/S$ (Lampiran 8). Pada Gambar 15. dapat terlihat nilai efisiensi tersebut

pada kultur *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa dan hidrolisat pati onggok dan galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat pati onggok.



Persamaan Garis :

$$S - S_o - \frac{\delta X_{\text{maks}}}{\mu} \ln \left[1.0 - \frac{X_o}{X_{\text{maks}}} (1.0 - e^{\mu t}) \right] = 10.2363 [X(t) - X(o)] + 5.7071$$

$$r^2 = 0.86$$

Gambar 14. Grafik hubungan antara $S - S_o - (\delta X_{\text{maks}}/\mu) \ln[1.0 - X_o/(1.0 - e^{\mu t})]$ untuk *A. pullulans* isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok

Parameter $Y_{p/s}$ menyatakan efisiensi konversi nutrien dalam substrat menjadi polisakarida, $Y_{x/s}$ menyatakan efisiensi konversi nutrien dalam substrat menjadi biomassa dan $\Delta S/S$ melihat kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi gula yang ada di dalam substrat.

Tabel 6. Hasil pengamatan parameter kinetika fermentasi pertumbuhan *A. pullulans*

Parameter	Ap. (Hid)	Ap. (Glu)	CBS (Hid)
μ	0.059	0.054	0.052
β	0.002	0.002	0.0008
α	1.159	0.637	1.100
δ	0.010	0.016	0.010
τ	10.580	10.159	8.019
X_0	1.781	1.454	0.955
(dp/dt)stas	0.027	0.012	0.019
(ds/dt)stas	0.094	0.195	0.105

Keterangan:

Ap. (Glu) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa

Ap. (Hid) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat

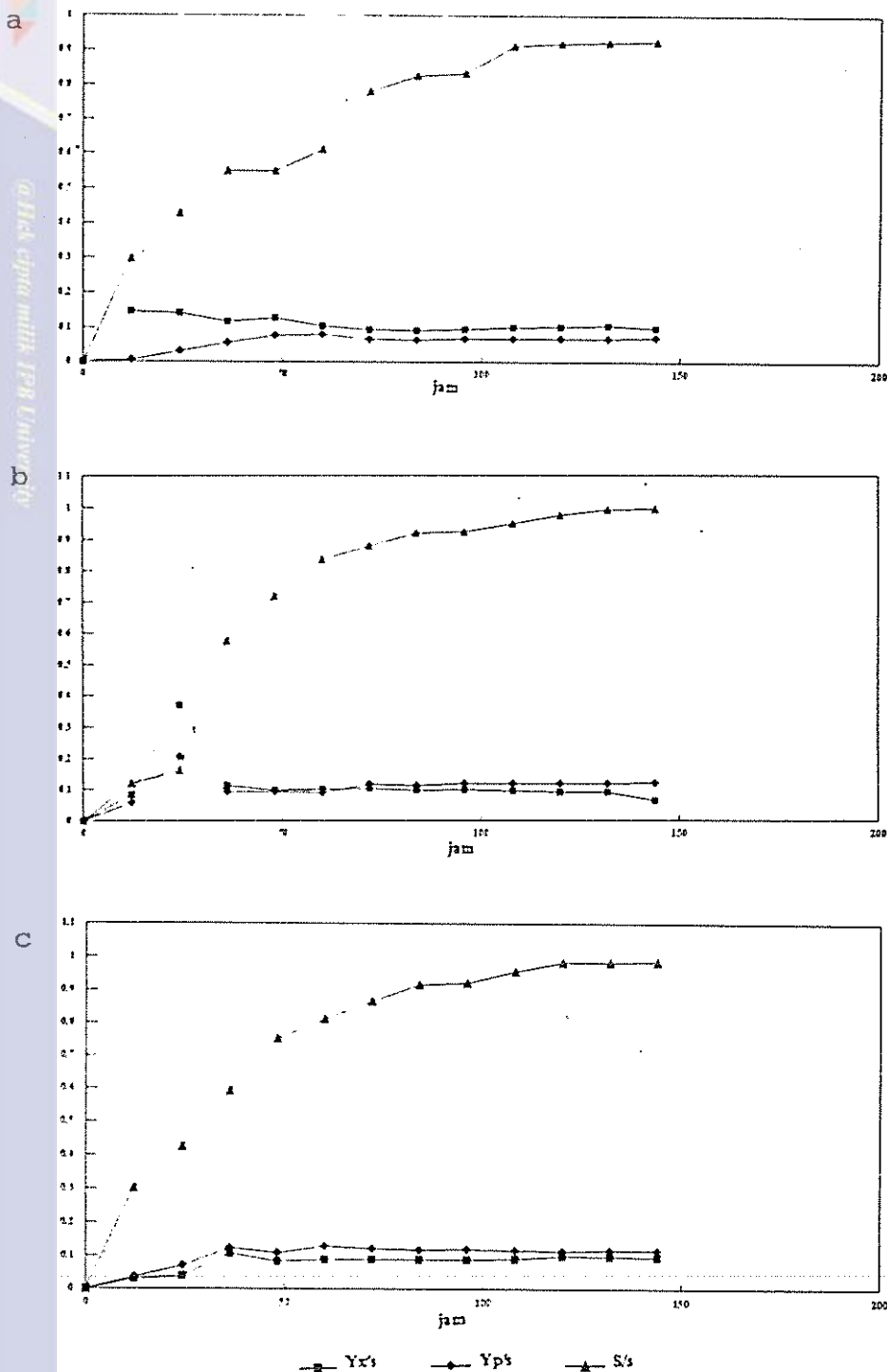
CBS (Hid) : *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat

2. Pengaruh jenis sumber karbon

Sumber karbon dibutuhkan oleh kapang *A. pullulans* untuk pertumbuhan sel, pemeliharaan sel dan pembentukan polisakarida. Pemasokan sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan optimal.

Kebutuhan akan sumber karbon ini cukup tinggi, mengingat bahwa senyawa ini menyediakan energi dan bahan-bahan pembangun untuk senyawa sel dan karena hampir semua komponen sel mengandung karbon (Prentis, 1985).

Dalam mengkonsumsi sumber karbon untuk pertumbuhannya, *A. pullulans* akan mengeluarkan enzim yang dapat mensintesa sumber karbon yang terdapat di dalam



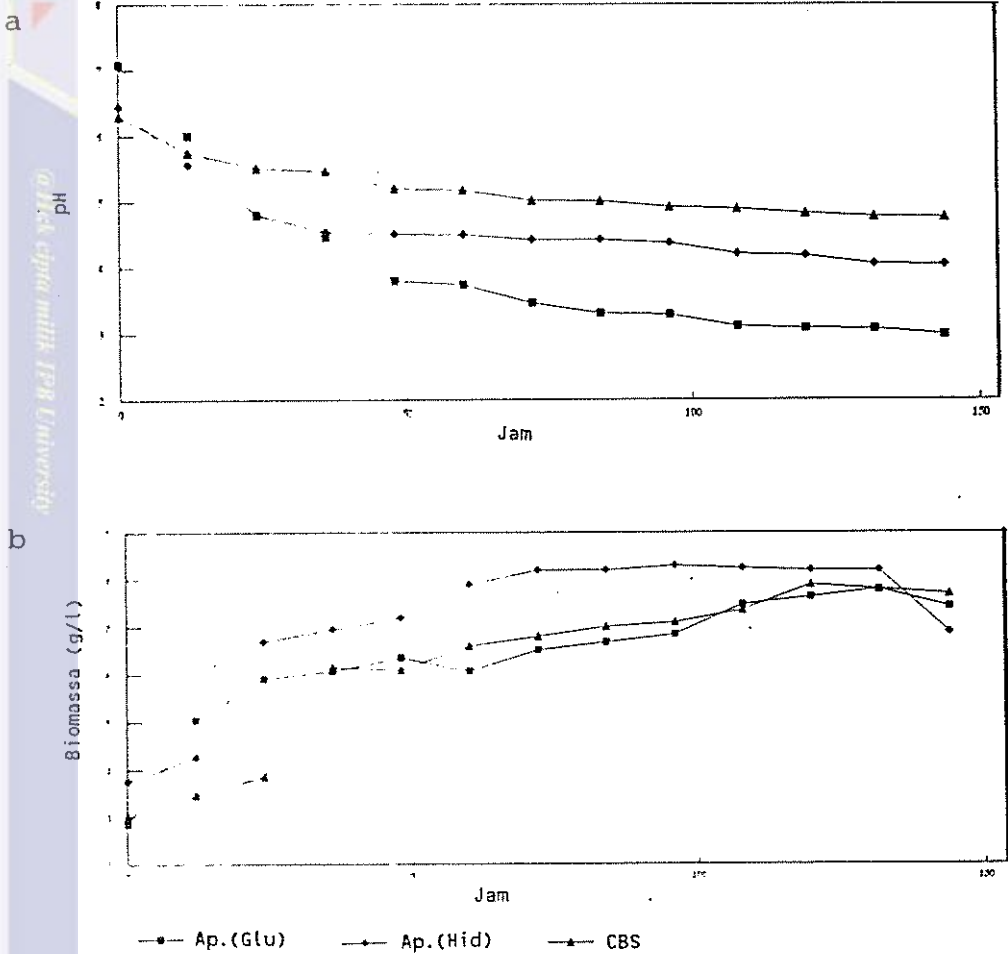
Gambar 15. Grafik hubungan antara $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ dan S/s terhadap waktu fermentasi pertumbuhan *A. pullulans*: a. isolat lokal pada substrat glukosa ;b. isolat lokal pada substrat hidrolisat onggok; c. CBS-CY-PP-14 pada substrat hidrolisat.

medium pertumbuhannya. Dengan demikian jenis sumber karbon yang dipasok akan sangat mempengaruhi pertumbuhan kapang *A. pullulans* tersebut.

A. pullulans mempunyai enzim-enzim yang dapat memanfaatkan glukosa, maltosa, galaktosa, sukrosa, pentosa, manosa, rafinosa dan trehalosa sebagai medium pertumbuhannya (Shipman dan Fan, 1978), dan Shin et al. (1989) menyatakan bahwa dalam biosintesis pululan, *A. pullulans* dapat menghasilkan polisakarida dari substrat glukosa, xilosa, galaktosa, arabinosa, rhamnosa, maltosa, sukrosa dan laktosa.

Perubahan nilai pH akhir kultur seperti terlihat pada Gambar 16. menunjukkan bahwa perubahan nilai pH yang lebih cepat terjadi pada medium dengan sumber karbon glukosa, dimana pH akhir juga menunjukkan nilai yang lebih kecil yaitu 2.99 (Lampiran 7). Hal ini disebabkan karena adanya amonium sulfat sebagai sumber nitrogen. Amonium sulfat dalam keadaan terdisosiasi (NH_4^+), akan bergabung dengan mikroorganisme membentuk sel dalam bentuk R-NH_3^+ , dan meninggalkan ion H^+ di dalam kultur.

A. pullulans merupakan kapang yang bersifat aerobik (Shipman dan Fan, 1978). Dalam upaya untuk tetap dapat hidup, maka *A. pullulans* mendapatkan energi melalui oksidasi piruvat, menghasilkan CO_2 dan air (siklus asam trikarboksilat atau siklus Krebs).



Keterangan :

Ap. (Glu) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa

Ap. (Hid) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat

CBS (Hid) : *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat

Gambar 16. a. Grafik perubahan pH ; b. Grafik perubahan biomassa (Kultivasi pada bioreaktor, konsentrasi 50 g/l, suhu 27°C)

Untuk itu, sumber karbon harus dihidrolisa menjadi karbon rantai dua atau tiga yang akan diumpankan ke dalam siklus trikarboksilat. Pembentukan dan akumulasi asam organik seperti asam laktat, asam asetat dan

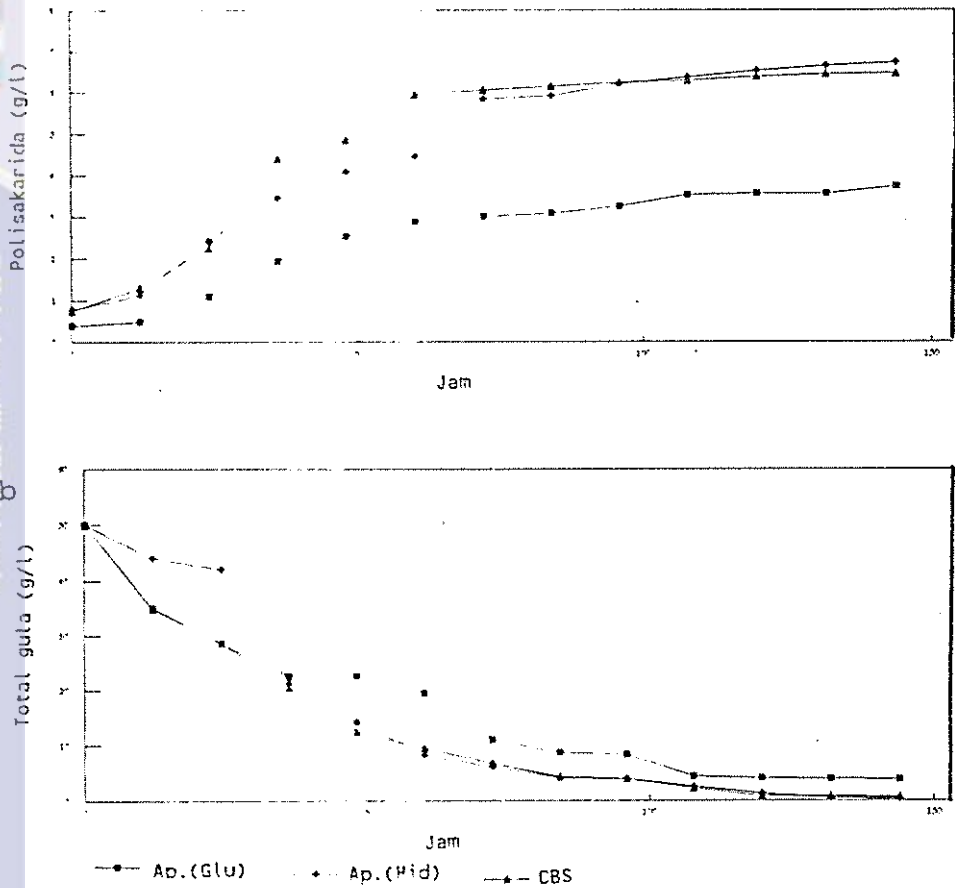
asam piruvat yang terbentuk selama berlangsungnya sintesis sumber karbon dalam siklus trikarboksilat, juga menyebabkan penurunan nilai pH kultur (Wang et al., 1978). Dengan demikian nilai pH akhir yang lebih kecil pada medium glukosa dibandingkan dengan hidrolisat menunjukkan bahwa *A. pullulans* lebih mudah mensintesis sumber karbon homogen daripada sumber karbon heterogen yang digunakan sebagai sumber karbonnya.

Hidrolisat merupakan sumber karbon heterogen yang tidak hanya mengandung komponen glukosa tetapi juga xilosa dan manosa (Hasil penelitian Ratmono, 1994). Hal ini menyebabkan *A. pullulans* akan menghasilkan enzim-enzim yang berbeda untuk dapat menghidrolisa sumber karbon yang akan diumpankan ke dalam siklus trikarboksilat. Glukosa terlebih dulu disintesis oleh mikroorganisme baru kemudian komponen gula yang lain yang terdapat dalam medium sumber karbonnya (Moat dan Foster, 1988). Akan tetapi Ueda et al. (1963) menyatakan bahwa xilosa mempunyai $Y_{p/s}$ yang lebih tinggi dibandingkan dengan glukosa. Hal ini membuktikan nilai μ (laju pertumbuhan spesifik) dari hidrolisat pati onggok yang lebih besar dan fase stasioner lebih lama. Fase stasioner untuk *A. pullulans* pada sumber karbon glukosa terjadi pada $t > 36$ jam, dan pada sumber karbon hidrolisat onggok terjadi pada $t > 48$ jam (Gambar 11).

Dari data hasil penelitian pada Lampiran 7, menunjukkan bahwa perolehan biomassa pada sumber karbon hidrolisat onggok (6.25 g/l) lebih besar jika dibandingkan pada sumber karbon glukosa (5.64 g/l). Hal ini disebabkan karena kandungan xilosa yang terdapat di dalam hidrolisat lebih mudah disintesa dibandingkan dengan glukosa (Ueda et al., 1963).

Sumber karbon yang heterogen juga menyebabkan laju pembentukan produk yang lebih cepat (nilai α pada medium hidrolisat pati onggok yang lebih besar dibanding pada medium glukosa) terlihat pada Tabel 6. Namun hasil rendemen pululan yang lebih besar yang terbentuk pada medium hidrolisat onggok (6.72 g/l) dibandingkan pada medium glukosa yaitu 3.72 g/l (Lampiran 7) disebabkan karena adanya kandungan xilosa dalam hidrolisat.

Sumber karbon yang heterogen ini juga menyebabkan kurva perubahan polisakarida (Gambar 17) yang lebih berfluktuasi jika dibandingkan dengan kurva perubahan polisakarida pada medium glukosa. Hal ini disebabkan karena fenomena pertumbuhan kapang yang terjadi pada medium heterogen. Kapang akan lebih dahulu menghidrolisa komponen sumber karbon yang lebih mudah disintesis baru kemudian komponen sumber karbon lainnya yang terdapat pada medium pertumbuhannya untuk dipasok ke dalam siklus trikarboksilat (Fardiaz, 1988).



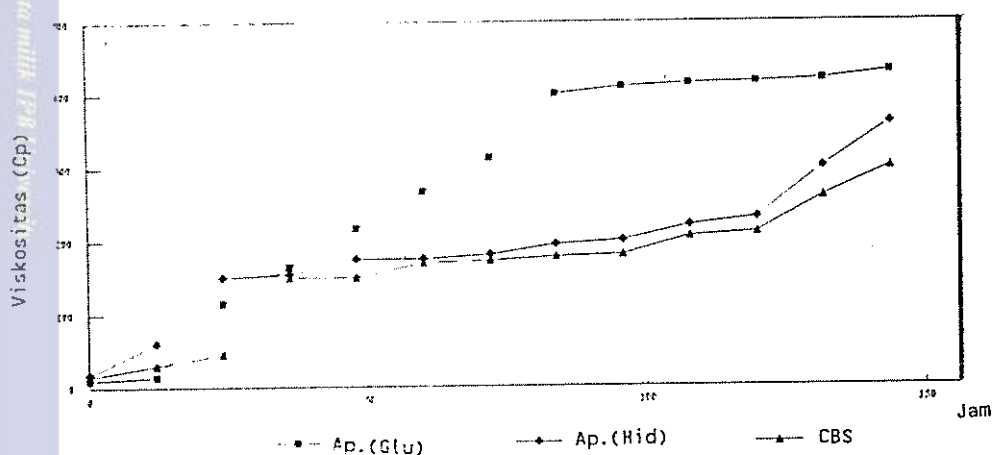
Keterangan :

- Ap. (Glu) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa
- Ap. (Hid) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat pati onggok
- CBS (Hid) : *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat

Gambar 17. a. Grafik perubahan polisakarida ; b. Grafik perubahan total gula sisa (Kultivasi pada bioreaktor, konsentrasi 50 g/l, suhu 27°C)

Jenis sumber karbon ini juga mempengaruhi laju penggunaan substrat. Laju penggunaan substrat pada medium glukosa lebih tinggi dibandingkan dengan medium hidrolisat, terlihat pada nilai r yang lebih besar pada Tabel 6. Hal ini disebabkan karena mikroorganisme akan mengeluarkan energi yang berlebih

dan waktu yang lebih lambat untuk memproduksi enzim-enzim yang berbeda agar dapat mengonsumsi substrat sumber karbon yang heterogen (hidrolisat onggok)



Keterangan :

Ap. (Glu) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon glukosa

Ap. (Hid) : *A. pullulans* isolat lokal pada sumber karbon hidrolisat pati onggok

CBS (Hid) : *A. pullulans* galur CBS-CY-PP-14 pada sumber karbon hidrolisat

Gambar 18. Grafik perubahan viskositas (Kultivasi pada bioreaktor, konsentrasi 50 g/l, suhu 27°C)

(Moat dan Foster, 1988). Akan tetapi total gula sisa pada sumber karbon glukosa lebih besar, yang membuktikan bahwa kandungan xilosa dalam hidrolisat lebih mudah disintesis oleh *A. pullulans* dibandingkan dengan glukosa, sehingga rendemen pululan yang dihasilkan menjadi lebih tinggi. Ueda et al. (1963)

menyatakan bahwa nilai $Y_{p/s}$ (efisiensi konversi substrat menjadi polisakarida) dari sumber karbon xilosa lebih tinggi jika dibandingkan dengan sumber karbon glukosa yaitu 23.8 persen untuk xilosa dan 13.1 persen untuk glukosa.

3. Membandingkan galur CBS-CY-PP-14 dengan isolat lokal

Produksi polisakarida pululan oleh *A. pullulans* sangat dipengaruhi oleh galur mikroorganisme penghasilnya, komposisi medium dan kondisi proses produksi.

Dari tahap penelitian sebelumnya, diperoleh bahwa sumber karbon hidrolisat onggok lebih berpotensi untuk digunakan sebagai sumber karbon dalam pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal. Hal ini dapat diketahui dari nilai rendemen pululan yang dihasilkan (Lampiran 7) dan nilai $Y_{p/s}$ (Gambar 15) yang lebih tinggi.

Dari grafik perubahan nilai pH (Gambar 16), terlihat bahwa isolat lokal dan CBS-CY-PP-14 mempunyai kecenderungan penurunan nilai pH yang sama. Akan tetapi nilai pH akhir kultur dari isolat lokal lebih rendah. Hal ini disebabkan karena perbedaan kemampuan dari mikroorganisme dalam melakukan biosintesis dari senyawa sumber karbon dan nitrogen yang terdapat dalam medium yang sama selama fermentasi.

Laju pertumbuhan spesifik dari isolat lokal

terbukti lebih tinggi (0.059 jam^{-1}) dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 (0.052 jam^{-1}) yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa laju pembentukan produk dari galur CBS-CY-PP-14 lebih rendah jika dibandingkan dengan isolat lokal (Tabel 6). Begitu juga dengan laju penggunaan substrat dari isolat lokal yang lebih tinggi dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14, sehingga menyebabkan total gula sisa dari galur CBS-CY-PP-14 lebih tinggi.

Pada Lampiran 7 terlihat bahwa rendemen puluhan yang dihasilkan oleh *A. pullulans* isolat lokal lebih tinggi (66.72 g/l) dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 (6.45 g/l).

Apabila dibandingkan pengaruh penggunaan jenis sumber karbon (glukosa dan hidrolisat pati onggok) maupun galur (isolat lokal dan CBS-CY-PP-14) yang berbeda, memperlihatkan kecenderungan yang sama dari nilai parameter kinetika, yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Semua nilai parameter β lebih rendah daripada nilai parameter α , begitu juga dengan nilai parameter δ yang lebih rendah daripada nilai parameter τ . Parameter β (tetapan laju pembentukan produk) dan δ (tetapan laju penggunaan substrat) merupakan nilai parameter yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan

Work also with IPR University

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

A. pullulans isolat lokal dapat tumbuh dan berproduksi dengan substrat sumber karbon hidrolisat pati onggok. Pada fermentasi isolat lokal dengan menggunakan substrat glukosa dan hidrolisat pati onggok dihasilkan rendemen pululan yang tertinggi pada konsentrasi substrat 50 g/l, dan kultivasi pada suhu kamar (27-30°C).

Konsentrasi substrat dan suhu yang optimal pada fermentasi *A. pullulans* isolat lokal adalah 50 g/l dan 27°C, baik pada sumber karbon hidrolisat pati onggok maupun pada sumber karbon glukosa. Dengan nilai rendemen pululan sebesar 7.3 g/l pada substrat hidrolisat pati onggok dan 8.64 g/l pada substrat glukosa.

Fase stasioner untuk *A. pullulans* pada sumber karbon glukosa terjadi pada $t > 36$ jam, dan pada sumber karbon hidrolisat terjadi pada $t > 48$ jam.

A. pullulans lebih cepat mengkonsumsi hidrolisat pati onggok ($\mu = 0.059 \text{ jam}^{-1}$) daripada glukosa ($\mu = 0.054 \text{ jam}^{-1}$). Nilai parameter $\alpha = 0.637 \text{ (g/l)p/(g/l)x}$ pada substrat glukosa lebih rendah dari nilai $\beta = 1.159 \text{ (g/l)p(g/l)x}$ pada substrat hidrolisat pati onggok. Nilai parameter $\tau = 10.159 \text{ (g/l)s/(g/l)x}$ pada substrat glukosa lebih rendah dari nilai $\tau = 10.2363 \text{ (g/l)s/(g/l)x jam}$ pada substrat hidrolisat pati onggok.

A. *pullulans* isolat lokal mempunyai kemampuan tumbuh yang lebih tinggi ($\mu = 0.059 \text{ jam}^{-1}$) dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 ($\mu = 0.052 \text{ jam}^{-1}$) pada substrat hidrolisat pati onggok. Isolat lokal juga mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam memproduksi pululan, yang terlihat dari nilai rendemen pululan tertinggi (6.72 g/l), nilai β yang lebih tinggi, yaitu sebesar 0.0021 (g/l)p/(g/l)x jam dibandingkan dengan galur CBS-CY-PP-14 yaitu 0.0008 (g/l)p/(g/l)x jam.

Onggok berpotensi untuk digunakan sebagai sumber karbon dalam pertumbuhan *A. pullulans* isolat lokal.

B. SARAN

Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut terhadap kualitas dari bioplastik pululan yang dihasilkan, selain itu juga perlu dilakukan pengkajian terhadap optimasi aerasi dan agitasi selama proses fermentasi dalam bioreaktor.

Dalam proses produksi bioplastik pululan dengan menggunakan isolat lokal, perlu dilakukan studi optimasi sumber nitrogen dan mineral lain, sehingga dapat menghasilkan rendemen pululan yang lebih tinggi.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang kemungkinan penggunaan model kinetika Monod dalam penentuan parameter kinetika fermentasi dari *A. pullulans* isolat lokal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiba, S., A.E. Humhrey dan N.F. Millis. 1973. Biochemical Engineering. Academic Press, Inc., New York.
- Aman dan Pusponegoro. 1983. Biogas dan Onggok Sebagai Sumber Energi. Teknologi Indonesia. IV(1):37.
- Anonim. 1984. Pembuatan Sirup Glukosa dari Ampas Tapioka. Badan Penelitian dan Pengembangan Industri Semarang, Departemen perindustrian, Semarang.
- Abbas, S., A. Halim, A. Ahmad, dan S.T. Amidarmo. 1985. Limbah Tanaman Ubi Kayu. Di dalam Winarno, Boediman, Silitonga, Soewardi (eds.). Monografi Pertama Limbah Pertanian. Kantor Mentri Muda Urusan Peningkatan Produksi Pangan, Jakarta.
- Auer, D.P.F., dan R.J. Seviour. 1990. Influence of Varying Nitrogen Source on Polysaccharide Production by *Aureobasidium pullulans* in Batch Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 634-644
- Bouveng, H.O., K. Kiessling, B. Lindberg, dan J. McKay. 1962. Polysaccharides Elaborated by *Pullularia pullulans*. Part I. The Neutral Glucan Synthesis from Sucrose Solution. Acta Chem. Scand. 16(3):615-622.
- Bermejo, J.M., J.B. Dominguez, F.M. Goni dan F. Uruburu. 1981. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on The Transition From Yeast-Like Cells to Chlamydospores in *Aureobasidium pullulans*. Antonie van Leeuwenhoek. 47:107-109.
- Boa, J.M. dan A. LeDuy. 1984. Peat Hydrolisate Medium Optimization of Pullulan Production. Appl. Anv. Microbiol. 48 : 26-30.
- BPS. 1993. Buletin Statistik Bulanan Indikator Ekonomi, April 1993. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Clark, D.S., dan R.H. Wallace. Carbohydrate Metabolism of *Pullularia pullulans*. Can. J. Microbiol. 4:43-54.
- Cartley, B.J. 1971a. Utilization of Carbon Source by *pullularia pullulans* for the Elaboration of Extracellular Polysaccharides. Appl. Microbiol. 22 : 541-649.

- _____. 1971b. Role of pH and Nitrogen Limitation in the Elaboration of the Extracellular Polysaccharides Pullulan by *Pullularia pullulans*. Appl. Microbiol. 22 : 650-654.
- _____. 1979. Pullulan Synthesis by *Aureobasidium pullulans*. Di dalam Barkeley, R.C.W., G.W. Gooday dan D.C. Ellwood. (eds). Microbial Polysaccharides and Polysaccharides. Academic Press, London.
- Cole, G.T. dan B. Kendrick. 1981. Biology of Conidial Fungi. Academic Press, New York.
- Cooper, L.A. dan G.M. Gadd. 1984. The Induction of Mycelial Development in *Aureobasidium pullulans* (IMI 45533) by Yeast Extract. Antonie van Leeuwenhoek 50. p 249-260.
- Dziedzic, Z.S. dan M.W. Kearsley. 1984. Glucose Syrups : Science and Technology. Elsevier Applied Science Publisher, Ltd., New York.
- Ciptadi, W. dan R.T.M. Sutamiharja. 1984. Pemanfaatan Limbah Padat Industri Tapioka Sebagai Bahan Makanan Manusia. Makalah Seminar Pada Lokakarya Pemanfaatan Limbah Industri Tapioka.
- Desphande, M.S., V.B. Rale dan J.M. Lynch. 1992. *Aureobasidium pullulans* in Applied Microbiology : A Status Report. Enzym Microb. Tech. Vol 14. pp 514-526.
- Frazier, W.C., dan D.C. Westhoff. 1978. Food Microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Fardiaz, S. 1988. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. Gramedia, Jakarta.
- Gumbira-Sa'id, E. 1987. Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Heald, P.J. dan B. Kristiansen. 1985. Synthesis of Polysaccharides by Yeast-Like forms of *Aureobasidium pullulans*. Biotech. and Bioeng. XXVII : 1516-1519.
- Harjo, S. 1992. Kajian Proses Hilir Produksi Pululan oleh *Pullularia pullulans* dari Substrat Tetes. Skripsi. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Judoamidjodjo, R.M., E.G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.
- Kang, K.S., dan I.W. Cottrel. 1979. Microbial Polysaccharide : Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii* dan *Aureobasidium pullulans* Batch Fermentation. *Biotech. and Bioeng.* XXII : 2321-2342.
- Klimek, J. dan D.F. Ollis. 1980. Extracellular Microbial Polysaccharides : Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii* and *Aureobasidium pullulans* Batch Fermentation. *Biotech. and Bioeng.* XVII:2321-2342.
- Lacroix, C., A. LeDuy, G. Noel dan L. Choplin. 1985. Effect of pH on The Batch Fermentation of Pullulan from Sucrose Medium. *Biotech. and Bioeng.* XXVII: 202-207.
- Leathers, T.D., G.W. Nofsinger, C.P. Kurtzman dan R.J. Bothast. 1988. Pullulan Production by Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol* 3 : 231-239.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrocalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chem.* 31:426-428.
- Mulchandani, A., J.H.T. Luong dan A. LeDuy. 1988. Batch Kinetics of Microbial Polysaccharides Biosynthesis. *Biotech. Bioeng.* 32 : 639-646.
- Moat, A.G., dan J.W. Foster. 1988. *Microbial Physiology*. A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York.
- Neil, Mc.B., B. Kristiansen, dan R.J. Seviour. 1989. Polysaccharides Production and Morphology of *Aureobasidium pullulans* in Continuous Culture. *Biotech. and Bioeng.* XXXIII:1210-1212. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Prentis, S. 1990. *Bioteknologi Suatu Revolusi Industri Yang Baru*. Terjemahan. Erlangga, Jakarta.
- Rehm, H.J., dan G. Reed. 1981. *Biotechnology*. Vol. 1. *Microbiol Fundamentals*. Verlag Chemic., Weinheim.
- Sundhagul, M. 1972. Feasibility Study on Tapioka Waste Recovery. Di dalam W.R. Stanton. *Waste Recovery by Microorganism*. The Ministry of Education Malaysia, Kuala Lumpur.

- Shipman, R.H. dan L.T. Fan. 1978. Bio-Plastic and SCP from Starch and Agricultural Wastes. Process Biochemistry. March.
- Slodki, M.E. dan M.C. Cadmus. 1978. Pullulan. Di dalam Perlman, D. (ed.). Production of Microbial Polysaccharides. Adv. Appl. Microbiol. 23:40-44.
- Sandford, P.A. 1979. Exocellular Microbial Polysaccharides. Di dalam Tipson, R.S. dan D. Horton (eds.). Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Vol 36. Academic Press, New York.
- Sutherland, I.W. 1983. Extracellular Polysaccharides. Di dalam Rehm, H.J. dan G. Reed (eds.). Biotechnology. Verlag-Chemie, Florida.
- Stanbury, P.F. dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, New York.
- Sitorus, F. 1984. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Pemanfaatan Limbah Padat Industri Tapioka. Makalah Pada Lokakarya Pemanfaatan Limbah Padat Industri Tapioka. Bogor, 4-5 September 1984. Pusat Studi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Satiawiharja, B. 1984. Fermentasi Media Padat dan Manfaatnya. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Shin, Y.C., Y.H. Kim, H.S. Lee, S.J. Cho, dan S.M. Byun Si Myung Byun. 1989. Production of Exopolysaccharide Pullulan from Inulin by Mixed Culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. Biotech. Bioeng. 33:129-133.
- Sunarti, T.C. 1989. Pemanfaatan Tetes Sebagai Substrat dalam Pembuatan Pululan dengan Kapang *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* De Barry. Skripsi. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, FATETA, IPB, Bogor.
- Sudjana. 1991. Desain dan Analisis Eksperimen. Tarsito, Bandung.
- Taguchi, R., Y. Kikkuchi, Y. Sakano, dan T. Kobayashi. 1973. Structural Uniformity of Pullulan Produced by Several Strain of *Pullularia pullulans*. Agr. Biol. Chem. 37(7):1583-1588.
- Thenawijaya, M. 1986. Sintesis Enzim-enzim Pemecah Pati Pada Fermentasi *Aspergillus niger* Dengan Suplementasi

Berbagai Limbah Hasil Pertanian. Laporan Kemajuan Penelitian. FATETA-IPB, Bogor.

Ueda, S., K. Fujita, K. Komatsu, dan Z. Nakashima. 1963. Polysaccharides Produced by The Genus *Pullularia* : I. Production of Polysaccharides by Growing Cells. Appl. Microbiol. 11:211-215.

Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey, dan M.D. Lilly. 1978. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, New York.



LAMPIRAN

Hack Cipra (Hack Cipra) adalah kegiatan yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuan

dan keterampilan mahasiswa dalam bidang teknologi informasi dan komunikasi.

Salah satu tujuan dari kegiatan ini adalah untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam bidang teknologi informasi dan komunikasi.

Salah satu tujuan dari kegiatan ini adalah untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam bidang teknologi informasi dan komunikasi.

Lampiran 1. Tabel produksi tapioka dan perkiraan potensi ongkok yang dihasilkan industri besar dan menengah^a

Tahun	Produksi tapioka (1000 ton)	Perkiraan potensi ongkok (1000 ton)
1988	15.471	3094,2
1989	17.117	3423,4
1990	15.830	3166,0
1991	15.954	3190,8
1992	16.318	3263,6

^aBuletin Statistik (April, 1993), BPS.

Lampiran 2. Daftar bahan-bahan kimia yang digunakan

Bahan kimia untuk pemurnian hidrolisat onggok

Arang aktif

Resin penukar ion (resin amberlit)

Bahan kimia sumber nutrisi

Agar Sabouraud

Glukosa

KH_2PO_4

K_2HPO_4

NaCl

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ekstrak khamir

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Akuades

Bahan kimia untuk analisis total gula sisa

NaOH

Asam 3,5 dinitrosalisilat

NaK-Tartarat

Fenol

Na-metabisulfit

HCl

Indikator fenolftalein

Pb-asetat setengah basa

Na_2CO_3

Glukosa

Bahan kimia untuk pengendap pululan

Aseton-absolut 90%

Lampiran 3. Daftar alat-alat yang digunakan

Bioreaktor Biostat M (kapasitas dua liter)

Bioreaktor CSTR

Inkubator goyang (merk Life Time Warranty)

Inkubator suhu ruang (merk Lab-Line Instruments)

Neraca analitik (merk AND Electronic Balance FX-300)

Oven pengering (merk Jouan)

pH meter (merk HANNA Instruments 8519)

Sentrifus (merk Jouan, tipe CR 412)

Otoklaf (merk Hirayama)

Spektrofotometer (merk BBC, UV Vis 911A)

Pompa vakum (merk Millipore, model XX5522050)

Kompresor udara (merk Mitsui)

Viskosimeter (merk Brookfield model LVT)

Gelas piala Gelas ukur

Labu erlenmeyer

Labu takar

Cawan petri

Cawan aluminium

Tabung reaksi

Lup inokulasi

Mikropipet

Termometer

Penangas air

Pembakar bunsen

Lampiran 4. Penentuan Kadar gula Pereduksi dengan metode DNS (Modifikasi Miller, 1959)

Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 10.6 g asam 3,5 dinitrosalisilat dan 19.8 g NaOH ke dalam 1416 ml air, kemudian ditambah dengan 306 g NaK-Tartarat, 7.6 ml fenol yang dicairkan pada suhu 50°C dan 8.3 g Na-metabisulfit.

Larutan ini dicampur secara merata kemudian dilakukan standarisasi dengan cara mengambil pereaksi DNS yang telah dibuat sebanyak 3 ml dan dititrasi dengan HCl 0.1 N dengan indikator fenolftalein. Titrasi ini membutuhkan 5.6 ml HCl 0.1 N dan jika jumlahnya kurang, maka dilakukan penambahan 2 g NaOH untuk setiap kekurangan 0.1 ml HCl 0.1 N.

Sebelum dilakukan pengukuran, bahan yang akan diukur kadar gulanya harus benar-benar jernih. Penjernihan dapat dilakukan dengan penambahan bubuk $\text{Al}(\text{OH})_3$ atau larutan Pb-asetat. Supernatan bebas sel ditetesi dengan larutan Pb-asetat untuk mengendapkan polisakarida, warna dan partikel berukuran besar lainnya sampai warnanya menjadi jernih. Penambahan Pb-asetat dilakukan tetes demi tetes sampai penetesan dari reagensia ini tidak menimbulkan pengkeruhan lagi. Kemudian dilakukan penambahan akuades sampai diperoleh volume yang diinginkan dan selanjutnya disaring.

Filtrat ditampung di dalam labu takar 200 ml. Untuk menghilangkan kelebihan Pb maka ditambahkan larutan Na_2CO_3 anhidrat 8 persen secukupnya. Kedalam labu tersebut ditambahkan akuades sampai tanda tera, dikocok dan disaring.

Pada filtrat yang telah bebas Pb bila ditambahkan Na_2CO_3 akan tetap jernih.

Dalam penentuan kadar gula secara DNS, sampel yang sudah jernih dimasukkan sebanyak 1 ml dalam tabung reaksi. Kedalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 3 ml pereaksi DNS dan ditempatkan dalam air mendidih selama 5 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan sampai mencapai suhu ruang. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi sampel dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Untuk pengukuran blanko digunakan akuades. Kurva standar dibuat dengan menggunakan glukosa standar dengan kisaran 0.05-0.25 mg/ml.

Untuk sampel yang mengandung sedikit glukosa, dapat ditambahkan 0.1 mg glukosa ke dalam masing-masing sampel. Pereaksi DNS sebanyak 3 ml akan bereaksi dengan baik dengan kurang lebih 10 mg glukosa. Dengan demikian, sampel yang pekat harus diencerkan dulu sampai mengandung kurang dari 5 mg glukosa.

Lampiran 5. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi *A. pullulans* isolat lokal dengan beberapa konsentrasi sumber karbon glukosa dan hidrolisat pati onggok

Sumber karbon Glukosa

t(hari)	pH			X(g/l)			P(g/l)			S(g/l)		
	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]
0	7,49	7,45	7,25	1,16	1,4	1,12	0,3	0,24	0,72	25	50	75
1	5,19	5	5,19	2,08	3,88	3,16	0,48	2,92	2,28	15,65	28,61	38,85
2	5,19	4,89	4,99	4,12	9,32	5,12	1,44	3,84	2,44	14,16	25,12	34,98
3	4,94	4,47	4,71	4,72	6,8	7,64	2,41	4,32	3,08	10,75	23,97	23,73
4	4,91	4,41	4,67	4,36	8,56	19,2	3,84	5,12	3,6	7,67	14,07	20,51
5	4,69	4,4	4,15	7,32	16,6	9,24	4,56	6,32	4,64	4,87	12,79	17,32
6	4,65	4,13	4,14	5,32	16,08	10,08	4,76	8,64	5,25	1,79	6,11	16,41

Sumber karbon hidrolisat

t(hari)	pH			X(g/l)			P(g/l)			S(g/l)		
	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]	[25g/l]	[50g/l]	[75g/l]
0	7,27	7,02	5,41	1,84	0,71	1,07	0,29	0,28	0,48	25	50	75
1	4,89	5,42	4,99	4,9	5,7	5,19	1,75	2,3	1,56	14,89	38,38	58,86
2	4,67	5,29	4,97	6,96	10,3	7,31	1,79	4,89	1,86	10,76	37,93	56,73
3	4,65	4,75	4,76	6,67	11,02	19,47	1,82	5,07	2,73	7,02	20,73	42,38
4	4,55	4,67	4,06	9,56	11,56	13,86	1,82	5,93	2,96	4,71	15,54	31,77
5	4,55	4,49	4,04	11,13	7,26	4,45	2,05	6,31	3,24	2,64	11,47	27,19
6	4,53	3,47	3,27	10,51	9,14	4,94	2,11	7,3	4,71	0,82	4,67	27,18

Lampiran 6. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi *A. pullulans* isolat lokal dan galur CBS-CY-PP-14 dengan beberapa konsentrasi sumber karbon glukosa dan hidrolisat pati onggok (suhu 27°C, 50 g/l)

Konsentrasi 25g/l

t(hari)	pH			X(g/l)			P(g/l)			S(g/l)		
	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC
0	7,27	7,22	6,95	1,27	1,84	1,29	0,34	0,29	0,32	25	25	25
1	4,89	4,91	5,55	3,58	4,9	3,76	0,35	1,75	1,07	17,21	14,89	16,55
2	4,67	4,7	4,9	8,19	6,96	3,38	0,37	1,79	1,12	9,42	10,76	15,59
3	4,65	4,67	4,73	7,82	6,67	5	0,37	1,82	1,37	5,85	7,02	14,02
4	4,55	4,45	4,7	8,41	9,56	3,62	0,4	1,82	1,38	4,81	4,71	9,95
5	4,55	4,43	4,5	13,54	11,13	3,32	1,36	2,05	1,46	3,08	2,64	9,2
6	4,53	4,43	4,52	11,45	10,51	3,66	1,34	2,11	2,63	1,73	0,82	5,72

Konsentrasi 50g/l

t(hari)	pH			X(g/l)			P(g/l)			S(g/l)		
	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC
0	7,02	7,02	6,99	1,37	0,71	2,19	0,26	0,28	0,25	50	50	50
1	5,42	5,42	4,91	7,83	5,7	4,49	2,49	2,3	0,96	41,65	38,38	33,01
2	5,29	5,29	4,85	16,04	10,3	5,94	4,94	4,89	0,79	34,07	37,93	26,83
3	4,75	4,75	4,69	8,15	11,02	7,28	5,23	5,07	1,29	26	20,73	25,25
4	4,67	4,67	4,63	8,45	11,56	6,15	4,5	5,93	1,14	23,72	15,54	24,19
5	4,49	4,49	4,4	6,59	7,26	10,86	4,49	6,31	1,79	20,66	11,47	20,22
6	3,47	3,47	4,27	5,76	9,14	4,07	5,28	7,3	1,56	20,01	4,67	19,2

Konsentrasi 75g/l

t(hari)	pH			X(g/l)			P(g/l)			S(g/l)		
	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC	T=24oC	T=27oC	T=30oC
0	5,41	5,41	5,07	3,3	1,07	1,12	0,42	0,48	0,5	75	75	75
1	4,99	4,99	4,99	12,8	5,19	1,32	1,52	1,56	1,01	52,67	58,86	63,91
2	4,97	4,97	4,94	10,07	7,31	3,27	1,74	1,86	1,07	46,41	56,73	56,13
3	4,76	4,76	4,81	8,07	19,47	2,52	1,74	2,73	1,25	37,82	42,38	39,31
4	4,06	4,06	4,67	8,72	13,86	1,97	2,23	2,96	1,34	32,25	31,77	38,01
5	4,04	4,04	4,31	5,39	4,45	5,04	2,33	3,24	1,56	20,79	27,18	37,82
6	3,27	3,27	4,3	11,72	4,94	1,56	2,76	4,71	1,88	17,79	27,18	36,81

Lampiran 7. Hasil pengamatan pH, biomassa (X), polisakarida (P) dan total gula (S) terhadap lama fermentasi (t) pada fermentasi *A. pullulans* isolat lokal dengan beberapa konsentrasi sumber karbon hidrolisat pati onggok

t(jam)	pH			X(g/l)			P(g/l)		
	Ap. (Glu)	Ap. (Hid)	CBS	Ap. (Glu)	Ap. (Hid)	CBS	Ap. (Glu)	Ap. (Hid)	CBS
0	7,08	6,45	6,3	0,85	1,75	1	0,4	0,78	0,75
12	6	5,56	5,75	3,04	2,25	1,45	0,48	1,12	1,28
24	4,8	4,81	5,51	3,91	4,7	1,85	1,08	2,41	2,25
36	4,46	4,54	5,46	4,08	4,95	4,15	1,92	3,44	4,4
48	3,8	4,51	5,2	4,36	5,2	4,1	2,52	4,08	4,85
60	3,74	4,5	5,18	4,08	5,9	4,6	2,88	4,44	5,95
72	3,47	4,43	5,02	4,52	6,2	4,8	2,99	5,84	6,05
84	3,31	4,43	5,01	4,68	6,2	5	3,08	5,92	6,15
96	3,29	4,37	4,92	4,84	6,3	5,1	3,24	6,2	6,24
108	3,12	4,21	4,89	5,48	6,25	5,35	3,52	6,36	6,29
120	3,08	4,18	4,82	5,64	6,2	5,9	3,56	6,52	6,38
132	3,07	4,05	4,78	5,8	6,2	5,8	3,56	6,64	6,44
144	2,99	4,04	4,77	5,44	4,9	5,7	3,72	6,72	6,45

t(jam)	S(g/l)			u(cp)		
	Ap. (Glu)	Ap. (Hid)	CBS	Ap. (Glu)	Ap. (Hid)	CBS
0	50	50	50	10	18	15
12	35,09	44,03	34,88	14,5	60	30
24	28,59	42,03	28,67	115	150	45,5
36	22,53	21,24	20,39	165	155	150
48	22,52	14,16	12,43	217	175	150
60	19,45	8,21	9,46	267	175,5	170
72	11,01	6,14	6,69	313	180	172
84	8,7	4,03	4,21	400	195	178
96	8,34	3,88	3,89	410	200	180
108	4,41	2,56	2,18	415	220	205
120	4,03	1,25	0,78	416	230,5	210
132	3,89	0,37	0,76	420	300	260
144	3,78	0,31	0,67	430	360	300

Lampiran 8. Hasil perhitungan efisiensi konversi substrat menjadi produk ($Y_{p/s}$), efisiensi konversi substrat menjadi biomassa ($Y_{x/s}$) dan kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi gula yang ada dalam substrat

t	Ap.Hid			Ap.Glu			CBS		
	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	dS/s	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	dS/s	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	dS/s
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0.084	0.057	0.119	0.147	0.005	0.298	0.029	0.035	0.302
24	0.370	0.205	0.159	0.143	0.032	0.428	0.039	0.070	0.426
36	0.111	0.092	0.575	0.117	0.055	0.549	0.106	0.123	0.592
48	0.096	0.092	0.717	0.128	0.077	0.549	0.082	0.109	0.751
60	0.099	0.087	0.836	0.106	0.081	0.610	0.088	0.128	0.810
72	0.101	0.115	0.877	0.094	0.066	0.779	0.087	0.122	0.866
84	0.097	0.112	0.919	0.093	0.065	0.826	0.087	0.118	0.916
96	0.099	0.117	0.922	0.096	0.068	0.833	0.088	0.119	0.922
108	0.095	0.118	0.949	0.101	0.068	0.912	0.091	0.116	0.956
120	0.091	0.118	0.975	0.104	0.069	0.919	0.099	0.114	0.984
132	0.089	0.118	0.992	0.107	0.068	0.922	0.097	0.115	0.985
144	0.063	0.119	0.994	0.099	0.072	0.924	0.095	0.115	0.986

Lampiran 9a. Hasil analisis sidik ragam untuk biomassa

Sumber	db	JK	KT	F _{hit}	F.05	F.01
Rata-rata	1	3.05	3.05	4.22	5.32	11.26
Perlakuan	8	2507.58	313.48	433.85	3.44	6.03
A	2	2768.62	884.31	1224.01**	4.46	8.64
B	2	363.07	181.54	251.27**	4.46	8.64
AB	4	375.88	93.97	130.07**	3.84	7.01
Kekeliruan	8	5.78	0.72			
Total	17	2516.41	148.02			

** = berbeda sangat nyata

Lampiran 9b. Uji Duncan untuk biomassa

Perlakuan	Rata-rata	Urutan pada tingkat	
		1%	5%
A3	27.73	A	A
A2	14.67	B	B
A1	3.47	C	C
B3	21.44	A	A
B1	13.61	B	B
B2	10.83	C	C
A3B3	37.31	A	A
A3B2	27.28	B	B
A2B1	20.34	C	C
A2B3	19.71	C	C
A3B1	18.60	C	C
A1B3	7.29	D	D
A2B2	3.97	E	E
A1B1	1.91	E	F
A1B2	1.23	E	F

Catatan: Antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan jika sedikitnya terdapat satu huruf yang sama pada tingkat 1 persen dan 5 persen

Lampiran 10. Hasil analisis sidik ragam untuk polisakarida

Sumber	db	JK	KT	F_{hit}	F.05	F.01
Rata-rata	1	0.29	0.29	2.83	5.32	11.26
Perlakuan	8	2.46	0.31	2.91	3.44	6.03
A	2	0.84	0.42	3.96	4.46	8.64
B	2	0.77	0.38	3.62	4.46	8.64
AB	4	0.86	0.21	2.03	3.84	7.01
Kekeliruan	8	0.85	0.11			
Total	17	3.61	0.21			

Lampiran 11a. Hasil analisis sidik ragam untuk total gula

Sumber	db	JK	KT	F _{hit}	F.05	F.01
Rata-rata	1	0.35	0.35	1.04	5.32	11.26
Perlakuan	8	227.02	28.38	84.79	3.44	6.03
A	2	23.45	11.73	35.04**	4.46	8.64
B	2	129.26	64.63	193.12**	4.46	8.64
AB	4	74.31	18.58	55.51**	3.84	7.01
Kekeliruan	8	2.68	0.33			
Total	17	230.05	13.53			

** = berbeda sangat nyata

Lampiran 11b. Uji Duncan untuk total gula

Perlakuan	Rata-rata	Urutan pada tingkat	
		1%	5%
A1	8.71	A	A
A2	6.52	B	B
A3	6.11	B	B
B1	9.55	A	A
B2	8.41	B	B
B3	3.38	C	C
A1B1	11.66	A	A
A3B1	11.52	A	A
A1B2	11.08	A	A
A2B2	9.06	B	B
A2B1	5.48	C	C
A3B2	5.09	C	C
A2B3	5.02	C	C
A1B3	1.40	CD	D
A3B3	1.73	D	E

Catatan: Antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan jika sedikitnya terdapat satu huruf yang sama pada tingkat 1 persen dan 5 persen

Lampiran 12a. Hasil analisis sidik ragam untuk pH

Sumber	db	JK	KT	F _{hit}	F.05	F.01
Rata-rata	1	3.66	3.66	20.22	5.32	11.26
Perlakuan	8	55.42	6.93	38.27	3.44	6.03
A	2	19.07	9.54	52.68**	4.46	8.64
B	2	19.01	9.50	52.50**	4.46	8.64
AB	4	17.33	4.33	23.94**	3.84	7.01
Kekeliruan	8	1.45	0.81			
Total	17	60.52	3.56			

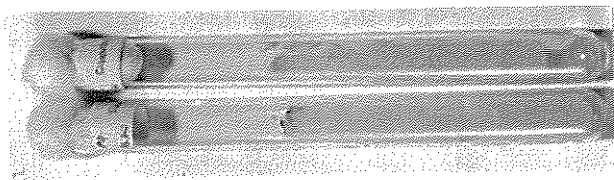
** = berbeda sangat nyata

Lampiran 12b. Uji Duncan untuk pH

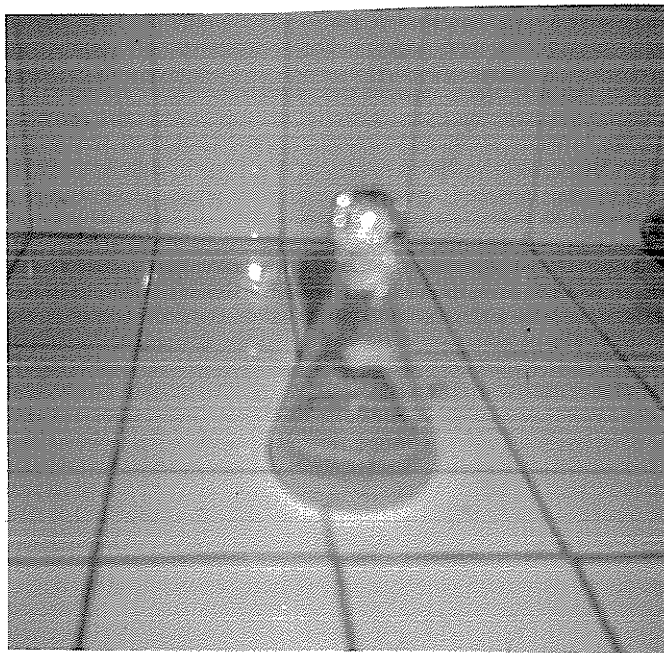
Perlakuan	Rata-rata	Urutan pada tingkat	
		1%	5%
A2	4.25	A	A
A3	2.42	B	B
A1	1.83	B	B
B2	4.18	A	A
B1	2.65	B	B
B3	1.68	C	C
A2B2	6.79	A	A
A2B1	4.58	B	B
A3B2	3.80	B	B
A1B3	2.21	C	C
A3B1	2.02	C	C
A1B2	1.94	C	C
A3B3	1.45	C	C
A2B3	1.38	C	C
A1B1	1.25	C	C

Catatan: Antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan jika sedikitnya terdapat satu huruf yang sama pada tingkat 1 persen dan 5 persen

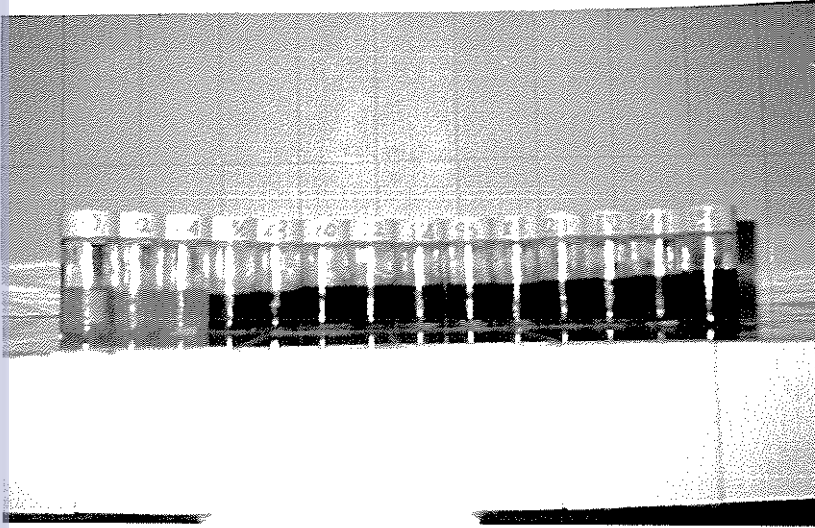
Lampiran 13a. *A. pullulans* isolat lokal yang ditumbuhkan pada agar Sabouraud



Lampiran 13b. *A. pullulans* di dalam medium propagasi



Lampiran 14a. Kultur fermentasi *A. pullulans* pada jam ke-0 sampai jam ke-144 (fermentasi berlangsung dalam bioreaktor)



Lampiran 14b. Produk polisakarida pululan kering

