

## PERBANDINGAN SIFAT FISIKAWI SELULOSA BAKTERI YANG DIPRODUKSI ISOLAT KRE-12 DENGAN METODE FERMENTASI STATIS DAN PENGGOJOGAN

### Comparisons of Physical Properties of Bacterial Cellulose Produced by Strain KRE-12 in Static and Shaking Fermentations

Sarkono<sup>1\*</sup>, SukartiMoeljopawiro<sup>2</sup>, BambangSetiaji<sup>3</sup>, LangkahSembiring<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas MIPA Universitas Mataram, NTB

<sup>2</sup>Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*Telp: +6281328076610, E-mail: [sarkonobiologi@gmail.com](mailto:sarkonobiologi@gmail.com)

**Abstract-** Cellulose production in bacteria is influenced by the fermentation method, both quantitatively and qualitatively. Bacterial cellulose produced by different fermentation methods were compared based on the dry weight of the cellulose produced. While the physical properties compared using SEM and XRD technique. Production of cellulose in acetic acid bacteria strain KRE-12 with static fermentation method, shaking 50 rpm, shaking 100 rpm and shaking 150 rpm was 0,49; 0,12; 0,13 and 0,10 g/100 ml, respectively. The degree of crystallinity by XRD method in static fermentation method was 91 %, shaking fermentation 100 rpm was 73 % and shaking fermentation 150 rpm was 72%. Static fermentation method produces bacterial cellulose in the sheets form, while shaking fermentation produces fragmented cellulose with predominantly spherical shape. The observation of the surface structure of bacterial cellulose by SEM showed that the static fermentation method generates woven densely of cellulose microfibrils. The change from a static method to shaking fermentation causes the surface structure changes. Some changes have been observed in which woven microfibrils become more loose and form a larger gap between the holecellulose woven microfibrils.

**Keywords :** acetic acid bacteria , bacterial cellulose, static fermentation, shaking.

#### PENDAHULUAN

Selulosa merupakan homopolimer yang tidak bercabang dari residu glukosa yang terhubung dengan ikatan  $\beta$ -1,4glikosidik. Unit berulang pada sintesis polimer ini terdiri dari dua molekul glukosa yang berikatan dimana salah satu molekulnya berotasi 180 derajat terhadap molekul yang lain. Selain dihasilkan oleh tumbuhan, selulosa juga dihasilkan oleh mikrobia, utamanya bakteri. Selulosa yang diproduksi oleh bakteri mempunyai kelebihan dari kemurnian struktur kimianya, berbeda dengan selulosa tumbuhan yang biasanya berasosiasi dengan lignin dan hemiselulosa (Brown Jret *et al.*, 1976). Sifat unik selulosa bakteri terutama kemurniannya telah menarik banyak peneliti untuk menerapkan selulosa bakteri pada berbagai aplikasi seperti pembuatan kertas (Nishi *et al.*, 1990), membran

(Shibashaki *et al.*, 1993; Iguchi *et al.*, 2000), industri makanan (Miranda *et al.*, 1965) dan sebagai biomaterial untuk aplikasi pengobatan (Cienchanska, 2004). Selain kemurniannya, selulosa bakteri memiliki indeks kristanilitas, derajat polimerisasi, daya renggang, dan daya serap air tinggi (Shoda & Sugana, 2005; Chawla *et al.*, 2009).

Menurut Swissa *et al.* (1980), beberapa spesies bakteri yang termasuk kelompok bakteri asam asetat dapat membentuk selulosa, namun selama ini yang paling banyak dipelajari adalah *Acetobacter xylinum* (direklasifikasi sebagai *Gluconacetobacter xylinus*, Yamada *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2000), sehingga digunakan sebagai organisme model dalam mempelajari bakteri penghasil selulosa. Strain anggota genus *Gluconacetobacter* dan *Acetobacter* memiliki kemampuan menghasilkan selulosa beragam dan paling



banyak dipelajari karena kuantitas dan kualitas selulosa yang dihasilkannya (Bielecki *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2009).

Produksi selulosa oleh bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu strain bakteri, metode fermentasi (Sarkono *et al.*, 2012), medium pertumbuhan, kondisi lingkungan, dan pembentukan produk sampingan (Chawla *et al.*, 2009). Produksi selulosa pada bakteri dipengaruhi oleh kemampuan strain bakteri dan metode produksi yang digunakan. Metode produksi selulosa yang biasa digunakan dalam skala industri yaitu metode produksi statis (Lee, 1999) dan agitatif (Tsuchida & Yoshinaga, 1997; Lee, 1999). Menurut Lee (1999) dan (Tsuchida & Yoshinaga, 1997) metode fermentasi statis dalam skala industri terbukti produksinya sangat rendah karena terbentuknya asam glukonik. Sementara itu, fermentasi agitatif dapat menurunkan produksi selulosa karena berkaitan erat dengan dihasilkannya mutan negatif (Lee & Zhao, 1999; Lee, 1999; Tantratian *et al.*, 2005; Cheng & Catchmark, 2009). Metode fermentasi atau kondisi kultur juga sangat berpengaruh terhadap morfologi makroskopik selulosa bakteri yang dihasilkan (Watanabe *et al.*, 1998; Yamanaka *et al.*, 2000), sedangkan perbedaan morfologi selulosa statis dan agitatif berkontribusi terhadap variasi derajat kristalinitas dan perbedaan ukuran kristalinitas (Watanabe *et al.*, 1998). Sehingga dalam upaya peningkatan produktivitas selulosa pada bakteri, perlu diperhatikan aspek kuantitatif dan kualitatifnya. Aspek kualitatif yang perlu diperhatikan diantaranya adalah karakter fisikokimiawi selulosa yang dihasilkan karena berhubungan langsung dengan potensinya sebagai biomaterial atau bahan baku dalam industri.

## **METODE PENELITIAN**

### **Mikrobia**

Isolat bakteri KRE-12 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan menghasilkan selulosa, diisolasi dari inokulum nata pada sentra industri nata de coco di Bantul Yogyakarta, Indonesia. Kemampuan produksi selulosa isolat ini adalah sebesar  $1.32 \pm 0.06$  g/100 ml pada medium produksi berbasis air kelapa dan  $0.22 \pm 0,02$  g/100 ml pada medium standar Hestrin Schramm (HS).

### **Media dan kondisi kultur**

Isolat KRE-12 ditumbuhkan pada medium standar HS cair yang tersusun dari D-glukosa 2.0%, Pepton 0.5%, Yeast extract 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.27% dan asam sitrat 0.115%. Medium produksi yang digunakan adalah media dasar air kelapa dengan suplementasi sumber karbon 5%, sumber nitrogen 0,5% dan asam asetat glacial untuk mengkondisikan keasaman medium.

### **Produksi dan pemanenan selulosa bakteri**

Penelitian ini menggunakan medium produksi berbahan dasar air kelapa dengan penambah sumber karbon gula pasir 5%, sumber nitrogen ammonium sulfat 0,5% dan pH 5 dalam skala produksi 100 ml. Untuk mengkondisikan pH digunakan asam asetat glasial. Sterilisasi medium dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Selanjutnya media medium produksi diinokulasi dengan starter sebanyak 10% kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari dengan metode fermentasi statis dan penggojogan.

Pemanenan selulosa bakteri dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Ishihara *et al.* (2002), yaitu gel selulosa bakteri dipanen dan dibersihkan dengan air dingin untuk membersihkan sisa medium, selanjutnya direbus dalam air mendidih selama kurang



lebih 15 menit agar lebih bersih. Setelah itu dicuci dengan air mengalir, dikeringanginkan dan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam dan selanjutnya ditimbang sebagai berat kering selulosa.

### Struktur permukaan selulosa bakteri dengan SEM

Pengamatan struktur permukaan selulosa bakteri pada masing-masing perlakuan digunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Sampel film selulosa bakteri dikeringkan sampai kandungan air nol. Selanjutnya diiris kecil sekitar 0,5 cm<sup>2</sup> dan ditempatkan dalam *specimen holder* dan dilapisi dengan logam emas setebal 200 Å, kemudian diamati dengan instrumen SEM JEOL tipe JSM-6360LA. Gambar diambil dengan kekuatan tegangan 30 kv dan perbesaran 10.000 kali.

### Pengukuran kristalinitas dengan X-ray difraktometri (XRD).

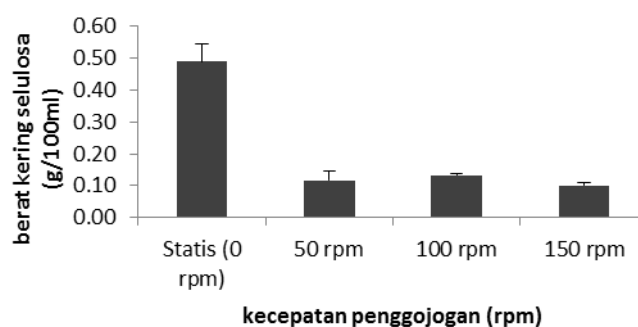
Sampel film tipis selulosa bakteri dipreparasi berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Kai dan Keshk (1999). Difraktogram dari sampel direkam pada temperatur ruang dengan SHIMADZU seri XRD-7000 Maxima-X menggunakan radiasi Ni-filtered CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ). Tegangan dan arus yang dipakai masing-masing 40 Kv dan 30 mA. Data difraksi diambil pada *scan*

*range* sudut  $2\theta = 5$  sampai 30 derajat, *scan mode* kontinyu, *scan speed* 4 derajat per menit dan *sampling pitch* 0,02 derajat. Kristalinitas dihitung dari data intensitas difraksi menggunakan metode Segal *et al.* (1959), dimana indeks kristalinitas (Cr.I.) =  $(I_{002} - I_{am}) / I_{002}$ ;  $I_{002}$  adalah intensitas maksimum dari difraksi kisi-kisi, sedangkan  $I_{am}$  adalah intensitas pada sudut  $2\theta = 18^\circ$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi selulosa bakteri pada isolat KRE-12

Produktivitas selulosa pada isolat KRE-12 sangat dipengaruhi oleh metode fermentasi yang digunakan (gambar 1). Produksi tertinggi dicapai pada metode fermentasi statis dengan produksi selulosa sebesar 0,49±0.06 g/100 ml, kemudian menurun pada metode fermentasi penggojokan dengan kecepatan 50 rpm dengan produksi selulosa sebesar 0,12±0.03 g/100 ml, naik pada kecepatan penggojokan 100 rpm dengan produksi selulosa sebesar 0,13±0.01 g/100 ml, dan menurun lagi pada kecepatan 150 rpm dengan produksi selulosa sebesar 0,10±0.01 g/100 ml. Pada perlakuan penggojokan, isolat KRE-12 menunjukkan penurunan produksi yang tajam. Hal ini menjelaskan bahwa produksi selulosa pada strain ini lebih optimum dilakukan pada kondisi fermentasi statis.



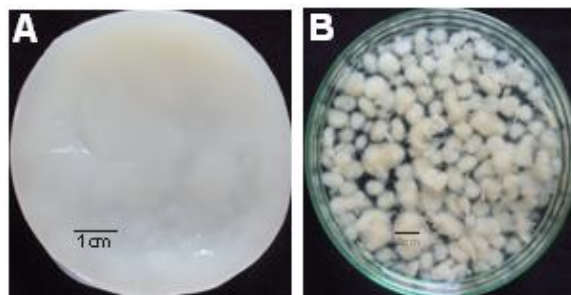
Gambar 1. Produksi selulosa bakteri pada isolat KRE-12 dengan metode fermentasi statis dan penggojokan

Produksi selulosa bakteri tidak hanya bergantung kepada jenis mikroorganisme yang digunakan, tetapi juga dipengaruhi oleh metode produksi yang dipakai. Selama ini dikenal ada dua metode produksi selulosa bakteri, yaitu metode fermentasi statis dan metode fermentasi agitatif. Meskipun metode agitatif meningkatkan difusi oksigen dalam media fermentasi, proses ini dapat menyebabkan munculnya mutan yang kehilangan kemampuan untuk memproduksi selulosa, sehingga menyebabkan penurunan produksi selulosa secara keseluruhan (Yeo *et al.*, 2004).

#### **Morfologi selulosa bakteri**

Produksi selulosa bakteri dengan metode fermentasi statis dan penggojogan menghasilkan selulosa bakteri dengan bentuk morfologi dan karakter yang berbeda. Selulosa yang dihasilkan dengan metode fermentasi statis dalam penelitian

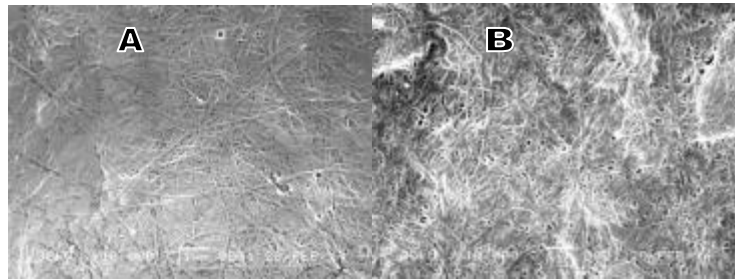
ini berupa lembaran selulosa yang tebal, sedangkan fermentasi penggojogan menghasilkan selulosa bakteri yang berupa pecahan-pecahan selulosa dengan dominasi berbentuk bulat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa perlakuan agitasi menghasilkan selulosa berbentuk bulat (Czaja *et al.*, 2004; Suwannapinunt *et al.*, 2007). Menurut Bielecki *et al.* (2001), pada kultur stasioner/ statis akan terbentuk lembaran selulosa berbentuk seperti tikar dan bertekstur seperti gelatin di permukaan media biakan cair, di dalamnya mengandung sel-sel bakteri yang terperangkap dalam jaringan serat selulosa. Pada kondisi kultur agitasi, pelikel lembaran tidak terbentuk dan selulosa berbentuk butiran yang tidak teratur dan juga dapat berbentuk untaian serat.



Gambar 2. Morfologi selulosa bakteri yang dihasilkan oleh strain KE 12 (A) Lembaran selulosa dari filamen statis (B) butiran selulosa berbentuk bulat dari fermentasi penggojogan

Hasil pengamatan struktur permukaan selulosa bakteri dengan SEM memperlihatkan bahwa selulosa membentuk anyaman pita mikrofibril. Pada metode fermentasi statis terlihat anyaman mikrofibril yang padat. Perubahan metode fermentasi dari statis menjadi penggojogan

menyebabkan struktur permukaan mengalami perubahan, diantaranya adalah terjadinya perenggangan anyaman mikrofibril selulosa dan terbentuknya celah lubang yang lebih besar diantara anyaman mikrofibril selulosa, seperti terlihat pada Gambar 3.

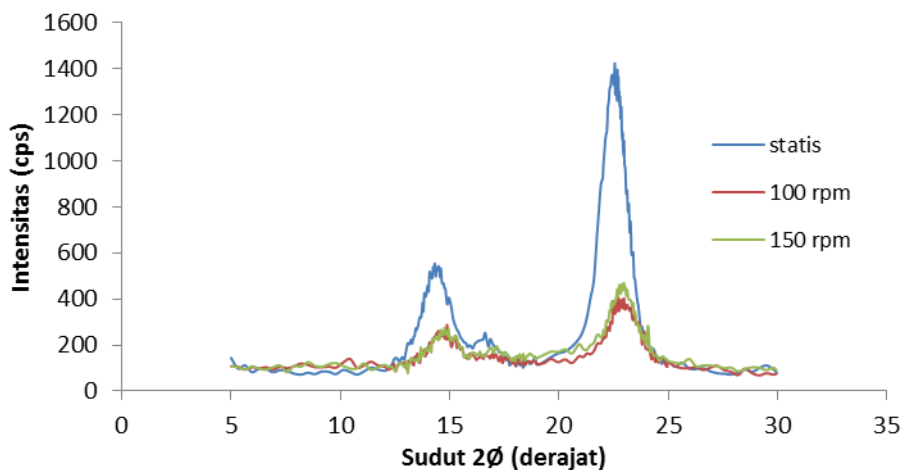


Gambar3. Struktur permukaan selulosa bakteri hasil fermentasi pada isolat KRE-12 (a) fermentasi statis; (b) fermentasi penggojokan

Merenggangnya mikrofilbril selulosa pada perlakuan metode fermentasi penggojokan dapat difahami karena penggojokan yang diberikan selama proses fermentasi sangat mengganggu

terbentuknya anyaman mikrofilbril menjadi anyaman yang teratur. Penggojokan menyebabkan pita selulosa merenggang dan terbentuknya lubang – lubang yang lebih besar

#### Indeks kristalinitas selulosa bakteri



Gambar4. Perbandingan pola difraksi sinar X pada produk selulosa bakteri isolat KRE-12 pada metode fermentasi statis dan penggojokan.

Indeks kristalinitas selulosa bakteri yang diproduksi dengan metode fermentasi berbeda dipresentasikan pada gambar 4. Pola difraksi sinar-X dari selulosa bakteri dengan metode fermentasi statis memperlihatkan tiga puncak terkuat pada sudut  $2\theta$ :  $22,56^\circ$ ;  $14,32^\circ$ ; dan  $16,62^\circ$  dengan indeks kristalinitas yaitu 91%. Sedangkan perlakuan metode fermentasi penggojokan 100 rpm memperlihatkan tiga puncak terkuat pada sudut  $2\theta$ :  $22,72^\circ$ ;  $23,12^\circ$ ,

dan  $23,36^\circ$  dengan indeks kristalinitas sebesar 73%. Pada perlakuan metode fermentasi penggojokan 150 rpm tiga puncak terkuat diperlihatkan pada sudut  $2\theta$ :  $22,98^\circ$ ;  $22,90^\circ$ ; dan  $22,94^\circ$  dengan indeks kristalinitas 72%.

Metode fermentasi statis menghasilkan indeks kristalinitas selulosa lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi penggojokan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh



Watanabe *et al.* (1998) dan Moon *et al.* (2006) bahwa selulosa bakteri yang diproduksi dengan metode fermentasi statis menghasilkan indeks kristalinitas lebih tinggi bila dibandingkan dengan agitasi. Proses agitasi atau penggojokan selama fermentasi menyebabkan ikatan hidrogen antara mikrofibril berkurang dan berakibat terhadap panjang mikrofibril yang terbentuk. Berkurangnya ikatan hidrogen antara mikrofibril ini akan berakibat terhadap rendahnya indeks kristalinitas (Moon *et al.*, 2006). Semakin tinggi indeks kristalinitas maka semakin tinggi kekuatan tarik serat (Liu *et al.*, 2006; Jonjankiat *et al.*, 2011).

#### KESIMPULAN

Produktivitas dan karakteristik selulosa yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam asetat KRE-12 dipengaruhi oleh metode fermentasi yang digunakan. Metode fermentasi penggojokan menyebabkan penurunan jumlah produksi dan indeks kristalinitas selulosa yang dihasilkan. Metode fermentasi statis menghasilkan selulosa bakteri yang berbentuk lembaran, sedangkan fermentasi penggojokan menghasilkan selulosa yang terpecah-pecah dengan bentuk dominan bulat. Fermentasi penggojokan menyebabkan anyaman mikrofibril selulosa menjadi lebih longgar dan membentuk celah lubang yang lebih besar diantara anyaman mikrofibril selulosa.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui pemberian Beasiswa Tesis Disertasi, sesuai dengan Nota Perjanjian nomor: PRJ-371/LPDP/2013.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bielecki, S, Krystynowicz A., Turkiewicz, M.&Kalinowska, H. 2005. Bacterial cellulose, In Steinbuchel A and Y. Doi (Eds.) **Biotechnology of Biopolymers**,. Willey-VCH, Weinheim, Vol. 1, pp 381–434.
- Brown Jr, RM. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21<sup>st</sup> century? *Journal of Polymer Science. Part A. Polymer Chemistry*,**42**: 487–495.
- Brown, R.M. Jr., J.H.Willison& C.L. Richardson. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacterxylinum*: Visualization of the site of synthesis & direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **73**: 4565-4569.
- Chawla, P.R., Bajaj, I. B., Survase, S. A.&Singhal, R. S. 2009. Microbial Cellulose: Fermentative Production & Applications. *Food Technology and Biotechnology*.**47**(2) 107–124.
- Cheng, K. &Cathmark, M. J. 2009.Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacterxylinum*and analysis of material property.*Cellulose* **16**:1033-1045.
- Cienchanska, D. 2004. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications, *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, **12**: 69-72.
- Czaja, D, Romanovicz, D.& Brown, Jr, R.M. 2004. Structural investigationof microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, *Cellulose*, **11**:403-411.
- Iguchi, M., 2000. Review Bacterial Cellulose-A Masterpiece of Nature's Arts. *Journal of Material Science*, **35**.
- Ishihara, M, Matsunaga, M., Hayashi, N, &Tisler, V., 2002, Utilisaton of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose, *Enzyme and Microbial Technology*, **31**: 986-991.
- Jonjankiat, S., Thawin, W. & Waranyou, S. 2011. Improvement of poly(vinyl alcohol) adhesives with cellulose microfibre from sugarcane bagasse. *Iranian Polymer Journa*,**120**(4): 305-317.
- Lee, C. H. 1999. Reduced production by microbial cellulose caused by aggregation of *Acetobacterxylinum*under shaking culture conditions. *Applied &chemistry*,**3**(2): 92-95.
- Liu, CF., Ren, JL., Xu, F., Liu, JJ., Sun, JJ. & Sun, RC. 2006. Isolation and Characterization of Cellulose Obtained From Ultrasonic



- Irradiated Sugarcane Bagasse. *Journal Agriculture and food Chemistry*. 54 (16): 5742-5749.
- Miranda, B.T., Miranda, S.R., Chan, L.P.&Saqueton, E.R. 1965. Some studies on nata. *National Applied Science Bulletin* (University of Philippines),**19**: 67-79.
- Moon, S.H., Park, J.M., Chun, H.Y. & Kim, S.J. 2006. Comparisons of Physical Properties of Bacterial Celluloses Produced in Different Culture Conditions Using Saccharified Food wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11: 26-31.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N.& Iguchi, M. 1990. The structure and mechanical properties of sheet prepared from bacterial cellulose. *Journal of Material Science*, **24**: 3141-3145.
- Sarkono, Moeljopawiro, S., Setiaji, B. & Sembiring, L. 2012. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by SLK-1 strain in coconut water based medium. The Proceedings of 9<sup>th</sup> National Seminar on Biological Education, Surakarta June 7<sup>th</sup>, 2012.
- Segal, L., J. Creely, Martin, A.& Conrad, C. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using diffractometer. *Textile Research Journal*, **29**: 786-794.
- Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F.&Usuda, M. 1993. Bacterial Cellulose Membrane as Separation Medium. *Journal of Applied Polymer Science*, **50**: 965-969.
- Shoda, M. & Sugano, Y. 2005. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **10**: 1-8.
- Suwannapinunt, N., Burakorn, J. & Thaenthanee, S. 2007. Effect of culture conditions on bacterial cellulose (BC) production from *A. xylinum* TISTR976 and physical properties of BC parchment paper. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 14 (4): 357-365.
- Swissa, M., Y. Aloni, H. Weinhouse & M. Benziman. 1980. Intermediary Step in *Acetobacterxylinum* Cellulose Synthesis Studies with Whole Cells and Cell Free Preparation of the Wild Type and A Celluloses Mutant. *Journal of Bacteriology*, **143**:1142-1150
- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P. & Phunsri, A. 2005. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* TISTR 975. *Journal of Science and Research Chulalongkorn University*. **30** (2): 179-186.
- Tsuchida, T. & Yoshinaga, F. 1997. Production of Bacterial Cellulose by Agitation Culture Systems. *Pure and Applied Chemistry*, **69**(11): 2453-2458.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. & Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, **5**: 187-200.
- Yamada, Y., K. Hoshino & T. Ishikawa. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **61**: 1244-1251.
- Yamada, Y., K. Katsura, H. Kawasaki, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura & K. Komagata. 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 823-829.
- Yamanaka, S., Ishihara, M. & Sugiyama, J. 2000. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, **7**: 213-225.
- Yeo, H.S., Lee, O.S., Lee, I.S., Kim, H.S., Yu, T. S. & Jeong, Y.J., 2004, *Gluconacetobacter persimmoni* ssp. nov., isolated from Korean traditional persimmon vinegar, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2): 276-283.

