

PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA (SB) SECARA FERMENTASI
PERMUKAAN STATIK OLEH *Acetobacter xylinum* 0416

SURYANI BINTI KAMARUDIN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI KEJURUTERAAN DAN ALAM BINA
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI

2012

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

25 November 2012

SURYANI BINTI KAMARUDIN
P 38416

PENGHARGAAN

Dengan Nama Allah Yang Maha Pemurah Lagi Maha Penyayang.

Syukur Alhamdulillah dipanjatkan ke hadrat Allah S.W.T di atas rahmat dan kebesaranNya kerana menganugerahkan kepada saya kesihatan yang baik, masa yang cukup dan kemampuan berfikir untuk menyempurnakan kajian ini dalam bentuk sebegini rupa. Terima kasih yang tidak terhingga ditujukan kepada penyelia utama Prof. Madya Dr. Mohd. Sahaid bin Haji Kalil atas bantuan, bimbingan, teguran dan nasihat yang berguna sepanjang kajian ini. Terima kasih juga ditujukan kepada ketiga-tiga penyelia bersama saya iaitu Prof. Dr. Wan Mohtar Wan Yusoff, Prof. Dr. Che Husna Azhari dan Prof. Ir. Dr. Mohd. Sobri bin Takriff dengan kepakaran masing-masing yang banyak membantu menguatkan lagi semangat saya untuk menyiapkan kajian ini.

Sekalung penghargaan kepada Pemeriksa Dalam Tesis, Prof. Dr. Siti Kartom Kamarudin dan Pemeriksa Luar Tesis, Prof. Dr. Azlina Che Harun di atas kesudian meluangkan masa menyemak dan memberi teguran serta komen yang membina dalam menghasilkan sebuah penulisan tesis yang baik.

Penghargaan yang tidak terhingga diucapkan kepada suami iaitu Faizalamiri bin Abu Bakar di atas pengorbanan masa dan tenaga dalam menyiapkan tesis ini. Tidak dilupakan kepada anak-anak, Insyirah Fatini dan Firas Zakwan yang memberi semangat dan kekuatan dalam menghadapi saat-saat kesukaran dalam penyelidikan ini. Penghargaan juga ditujukan kepada kedua ayah dan ibu di atas pengorbanan yang tidak berpenghujung seterusnya kepada seluruh kaum keluarga yang sentiasa mendoakan kesejahteraan dan kekuatan sepanjang pembelajaran saya di UKM.

Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada Dr. Ehsan Ali di atas bantuan menyiapkan manuskrip dan komen yang membina. Begitu juga dengan Pembantu Pegawai Sains, En. Wan Mohd. Nazir Wan Taha dalam membantu menyiapkan analisis sampel serta pembantu penyelidik UPM iaitu Norhasliza Hasan, Mustapha Akil, Wan Fadli Wan Hassan dan Wan Zulaikha Wan Hamidon di atas bantuan menyiapkan kajian ini.

Akhir kata saya berharap semoga hasil kerja yang telah saya lakukan ini diberkati oleh-Nya dan bermanfaat kepada semua.

ABSTRAK

Selulosa bakteria (SB) ialah nano biopolimer berpotensi dan boleh diaplikasi dalam pelbagai bidang. Namun begitu kepekatan, yil dan produktiviti SB yang rendah serta kos bahan mentah yang mahal menghadkan penghasilannya. Kualiti SB juga tidak konsisten dari segi integriti dan strukturnya, kesan daripada perawatan alkali sodium hidroksida yang digunakan. Data pencirian SB agak sukar diperolehi membataskan kajian lanjut ke atas biopolimer ini serta kaedah menentukan kepekatan SB, jisim sel dan berat air memerlukan masa dan kos yang tinggi. Objektif utama kajian ini adalah untuk membangunkan medium penghasilan SB yang murah dan tinggi produktiviti daripada air kelapa sebagai sumber karbon utama. Objektif lain ialah menentukan komposisi sampel SB natif, menentukan parameter luas permukaan dan pH awalan medium bagi kultur permukaan statik, membangunkan proses perawatan SB menggunakan larutan alkali sodium hidroksida (NaOH) dan menentukan pencirian produk SB. Strain yang digunakan ialah *Acetobacter xylinum* 0416, diperolehi dan diselenggarakan oleh MARDI. Hasil kajian mendapati CWHSM statik berpotensi sebagai medium penghasil SB efektif dengan produktiviti maksimum, $0.043 \text{ g/L.hari}^{-1}$, berat kering SB maksimum ialah 0.343 g/L iaitu 1.43 kali lebih tinggi berbanding kultur goncang. Pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak}), masa mengganda (t_d) dan yil tertinggi masing-masing ialah 0.380 hari^{-1} , 1.82 hari dan $0.127 \text{ g SB/g gula keseluruhan}$. Nisbah luas permukaan kepada isipadu medium, $L/I=0.84$ memberikan penghasilan SB maksimum, 0.358 g/L untuk masa fermentasi melebihi lima hari. Penghasilan SB maksimum dan produktiviti maksimum diperolehi pada pH awalan 5.0 dengan 0.348 g/L dan $0.058 \text{ g/L.hari}^{-1}$. Proses perawatan SB dengan penambahan unit operasi rendaman daripada kaedah kedua (KD) terbukti berkesan bagi menyingkirkan keseluruhan larutan sodium hidroksida daripada SB agar kualitinya konsisten dari segi integriti dan struktur. SB daripada CWHSM mempunyai sifat pengkristalan paling tinggi, susunan pelikel paling padat, mempunyai tenaga elastik tersimpan paling tinggi ($44\ 470 \text{ MPa}$) seterusnya bersifat stabil terhadap suhu dan perintang haba yang terbaik. Indeks pengkristalan tertinggi daripada CWHSM ($\sim 100\%$) menunjukkan bahawa biopolimer ini perintang kepada tindakan enzim. Jarak satah dalaman (jarak d) terbesar diperolehi daripada CM dengan $d_1(110) = 6.20$; $d_2(110) = 5.37$ dan $d_3(200) = 3.94$ dengan isipadu kristal terbesar (9.97 nm) yang maksimum pada satah 110. Saiz kristal SB adalah di antara $4.65\text{-}9.97 \text{ nm}$. SB dalam kajian ini adalah selulosa I_α -kaya dalam kategori alga-bakteria dan berstruktur sistem triklinik. Keistimewaan kajian ini ialah kualiti SB yang terhasil akan konsisten dari segi integriti dan strukturnya, medium penghasilan yang murah dan produktif dapat dibangunkan daripada sisa agro, satu kaedah pengukuran berat kering SB yang cepat telah diperolehi dan data pencirian SB yang spesifik berpanduan medium penghasilan telah dapat dihasilkan. Kesimpulan daripada keseluruhan kajian ini ialah biopolimer baru yang kompetitif, mesra alam, murah dan berinovatif bersumberkan bahan mentah tempatan iaitu air kelapa telah berjaya diperolehi.

PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE (BC) USING STATIC SURFACE FERMENTATION BY *Acetobacter xylinum* 0416

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a potential nano-biopolymer and can be applied in various fields. However, low BC concentration, yield and productivity as well as the expensive cost of raw materials limit its production. The BC quality also inconsistent in its integrity and structure, effects of sodium hydroxide from alkaline treatment. The limited BC characterization data and complicated procedure to determine BC concentration and cell weight, restrict us to expand the research. The main objective of this study was to develop a cheaper and high productivity of BC production medium from coconut water as a main carbon source. Other objectives were to determine the composition of native BC sample, determine the parameters of the surface area and initial pH medium for static surface culture, develop BC treatment process using alkaline solution sodium hydroxide (NaOH) and determine the characterization of BC products. Strain used was *Acetobacter xylinum* 0416, obtained and maintained by MARDI. The study found that CWHSM static potential as an effective BC production medium with maximum productivity of 0.043 g/L.day⁻¹. The maximum BC dry weight was obtained in CWHSM static (0.343 g/L), which was 1.43 times higher than agitated culture. The maximum specific growth rate (μ_{max}), doubling time (t_d) and the highest yield were 0.380 days⁻¹, 1.82 days and 0.127 g BC/g total sugar, respectively. Surface area to volume ratio of medium, L/I=0.84 gave maximum BC concentration with 0.358 g/L for the fermentation time exceeding five days. Maximum BC production and maximum productivity was obtained at initial pH 5.0 with 0.348 g/L and 0.058 g/L.day⁻¹. BC treatment process with addition of immersion operation unit in second method (KD) has proven effective to remove all sodium hydroxide solution from BC and ensure its integrity and structure. BC from CWHSM has maximum crystallization properties, the densest pellicle network, maximum storage modulus (44 470 MPa) and give the highest thermal stability and good heat resistance. The highest crystallization index in CWHSM (~100%) indicates that this biopolymer has high resistance with degradation. The largest internal plane (d -spacing) was obtained by CM with $d_1(110) = 6.20$; $d_2(110) = 5.37$ and $d_3(200) = 3.94$, with the largest crystal volume at 110 plane (9.97 nm). BC crystal size range was in between 4.65-9.97 nm. BC from this study was categorized as I_α -rich of algae-bacteria and triclinic structure. Advantages and benefits from this study were the SB quality was consistent in structure and integrity, cheap and productive production medium was developed from agro-waste, effective procedure to measure BC dry weight was achieved and specific BC characterization data based on production medium was successfully developed. Conclusion of the overall study is a new competitive, environmental friendly, cheap and innovative nano-biopolymer, sourced from the local coconut water was successfully achieved from this study.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI SINGKATAN	xvi
SENARAI FORMULA MOLEKUL KIMIA	xvii
SENARAI SIMBOL	xviii

BAB I	PENDAHULUAN	
1.1	Latar Belakang Kajian	1
1.2	Permasalahan dan Rasional Kajian	3
1.3	Objektif Kajian	4
1.4	Skop Kajian	5
1.5	Garis Kasar Tesis	6
BAB II	KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1	Pengenalan kepada Selulosa Bakteria	8
	2.1.1 Sejarah Penghasilan	9
	2.1.2 Struktur Fizikal, Kimia dan Perbandingan dengan Selulosa Natif	11
2.2	Bakteria Penghasil Selulosa	13
2.3	Sintesis Selulosa Bakteria oleh <i>Acetobacter xylinum</i>	15
	2.3.1 Biosintesis Selulosa Bakteria	15
	2.3.2 Biokimia bagi Biosintesis Selulosa Bakteria	17
2.4	Faktor Mempengaruhi Penghasilan Selulosa Bakteria	18
	2.4.1 Mod Fermentasi Permukaan Statik dan Fermentasi Dinamik	19
	2.4.2 Pembangunan Medium Penghasilan	21

2.5	Penuaian dan Perawatan Pelikel Selulosa Bakteria	32
2.6	Sifat Selulosa Bakteria	34
2.7	Aplikasi Selulosa Bakteria	37
2.8	Penghasilan Selulosa Bakteria di Peringkat Industri	42
2.9	Pencirian Selulosa Bakteria	46
2.9.1	Morfologi	46
2.9.2	Analisis Mekanikal Dinamik (DMA)	48
2.9.3	Kalorimetri Pengimbas Pembezaan (DSC)	49
2.9.4	Pembelauan Sinar-X (XRD)	50

BAB III METODOLOGI KAJIAN

3.1	Pengenalan	54
3.2	Mikroorganisma	54
3.2.1	Penyediaan Medium Agar	55
3.2.2	Pewarnaan Gram	57
3.3	Bahan dan Peralatan Eksperimen	59
3.4	Fermentasi Selulosa Bakteria	60
3.4.1	Medium Penyelenggaraan	60
3.4.2	Medium Fermentasi	61
3.5	Penuaian Selulosa Bakteria	63
3.6	Kaedah Analisis	64
3.6.1	Analisis Karbohidrat	64
3.6.2	Berat Kering Selulosa Bakteria	64
3.6.3	pH Medium	64
3.6.4	Ketebalan Selulosa Bakteria Basah	64
3.6.5	Analisis Asid Glukonik	65

BAB IV PEMILIHAN MEDIUM PENGHASILAN DAN PENENTUAN KOMPOSISI SELULOSA BAKTERIA

4.1	Pengenalan dan Strategi Kajian	66
4.2	Keputusan dan Perbincangan	71
4.2.1	Kesan Formulasi Medium terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria	71
4.2.2	Kajian Penentuan Komposisi Selulosa Bakteria	76
4.3	Kesimpulan	77

BAB V	PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA DALAM CWHSM	
5.1	Pengenalan dan Strategi Kajian	79
5.2	Keputusan dan Perbincangan	81
5.2.1	Kesan Kultur Permukaan Statik dan Goncang Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria	81
5.2.2	Kesan Luas Permukaan Medium Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria	91
5.2.3	Kesan pH Awalan Medium Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria	96
5.3	Kesimpulan	100
BAB VI	PEMBANGUNAN PROSES PERAWATAN SELULOSA BAKTERIA	
6.1	Pengenalan dan Strategi Kajian	102
6.2	Keputusan dan Perbincangan	105
6.2.1	Kajian Berat Kering Selulosa Bakteria dalam Kaedah Satu (KS) dan Kaedah Dua (KD)	105
6.2.2	Kajian Morfologi dan Unsur Selulosa Bakteria	111
6.3	Kesimpulan	116
BAB VII	PENCIRIAN PRODUK SELULOSA BAKTERIA	
7.1	Pengenalan dan Strategi Kajian	117
7.2	Keputusan dan Perbincangan	121
7.2.1	Kalorimetri Pengimbas Pembezaan (DSC)	121
7.2.2	Analisis Mekanikal Dinamik (DMA)	124
7.2.3	Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM)	130
7.2.4	Pembelauan Sinar-X (XRD)	137
7.3	Kesimpulan	142
BAB VIII	KESIMPULAN DAN CADANGAN	
8.1	Kesimpulan	143
8.2	Cadangan Kajian Lanjutan	145
RUJUKAN		146

LAMPIRAN

A	Viabiliti Strain <i>Acetobacter xylinum</i> 0416 Terhadap Masa Penyimpanan	160
B	Menentukan Kinetik Pertumbuhan <i>Acetobacter xylinum</i> 0416	161
C	Kesan Selulosa Bakteria Mentah Terhadap Fermentasi	162
D	Kadar Pertumbuhan Spesifik Maksimum (μ_{mak}) dan Masa Penggandaan (t_d) bagi Strain <i>Acetobacter xylinum</i> 0416 dalam CWHSM	165



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
1.1	Senarai produk sintetik dan harga	3
2.1	Sumber karbon dan penghasilan selulosa bakteria	23
2.2	Ciri-ciri fermentasi selulosa dalam kultur kelompok oleh <i>A. xylinum</i> BRC5 pada pH berbeza	29
2.3	Kesan tahap DO ke atas penghasilan selulosa dalam kultur suap-balik <i>A. xylinum</i> BRC5	30
2.4	Perbandingan proses penuaian selulosa bakteria dari 1995-2009	33
2.5	Ringkasan sifat selulosa bakteria	36
2.6	Senarai produk yang boleh dihasilkan daripada selulosa bakteria	39
2.7	Penghasilan SB di peringkat industri	43
3.1	Komposisi medium agar	55
3.2	Bahan kimia dan peralatan yang digunakan dalam kajian ini	59
3.3	Komposisi medium penyelenggaraan	61
3.4	Komposisi medium air kelapa-HS (CWHSM)	61
3.5	Komposisi medium kompleks (CM)	62
3.6	Komposisi medium Hestrin-Schramm (HSM)	62
4.1	Analisis air kelapa matang	67
4.2	Perbezaan kandungan karbohidrat dalam air kelapa matang	68
4.3	Ringkasan kaedah pengiraan komposisi sampel SB	69
5.1	Perincian luas permukaan dan isipadu medium	80
5.2	Kadar pertumbuhan spesifik maksimum dan masa penggandaan bagi CWHSM	90
6.1	Perbandingan kualiti SB yang dirawat secara KS (diguna oleh kebanyakan penyelidik) dan KD (cadangan kajian ini)	109
6.2	Kuantiti kandungan unsur dalam sampel oleh EDX	114
7.1	Ringkasan data yang diperolehi daripada DSC untuk sampel SB daripada medium berbeza	122
7.2	Nilai modulus penyimpanan pada suhu 128 °C	125

7.3	Nilai modulus kehilangan dan tan delta pada suhu 128 °C	126
7.4	Aktiviti SB daripada 3 medium	129
7.5	Data fermentasi SB pada hari ke-10	137
7.6	Data sifat kristalografik bagi sampel SB	138



SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
1.1	Struktur molekul rantai β ,1-4 glukosa yang membentuk selulosa	1
1.2	Carta alir kajian	7
2.1	Ikatan hidrogen secara (a) rantai dalaman dan (b) rantai luaran	12
2.2	Model peraturan biosintesis selulosa dalam <i>A. xylinum</i>	18
2.3	Laluan metabolisme karbon dalam <i>A. xylinum</i>	22
2.4	Profil penghasilan selulosa dalam kultur suap balik menggunakan medium CSL yang mengandungi 20 g/L glukosa. Sebagai tambahan, 40 g/L glukosa telah ditambahkan pada 2.22 g/L.jam dan kepekatan DO dikawal pada 10% ketepuan semasa kultur suap-balik	31
2.5	Mikrobal selulosa kering yang dibentuk seperti bentuk sarung tangan semasa biosintesis selulosa <i>in situ</i>	35
2.6	Proses fermentasi dua peringkat untuk penghasilan selulosa oleh <i>A. aceti</i>	45
3.1	Strain <i>Acetobacter xylinum</i> atau inokulum nata	54
3.2	Kajian makroskopik koloni bakteria dalam plat agar	56
3.3	Kajian mikroskopik imej koloni bakteria berbentuk bulat	56
3.4	Kajian mikroskopik imej pinggiran koloni bakteria bentuk beralun	56
3.5	Corak coretan piring sebaran bagi mendapatkan sel tunggal	57
3.6	Kit ujian pewarnaan gram	57
3.7	Mikrograf menunjukkan sel berbentuk rod dengan gram negatif	58
3.8	Prosedur penuaian selulosa bakteria	63
4.1	Sampel SB	69
4.2	Penghasilan SB dalam medium penghasilan berbeza	71
4.3	Model laluan metabolik bagi selulosa bakteria	72
4.4	Profil pH bagi medium penghasilan SB	73
4.5	Jumlah sel yang terperangkap dalam SB	74
4.6	Produktiviti SB dalam medium berbeza	75

4.7	Purata peratusan komposisi sampel SB natif dalam keadaan basah	77
5.1	Perbandingan berat kering SB dalam kultur permukaan statik dan gancang	82
5.2	Perbandingan pH medium dan berat kering SB dalam kultur permukaan statik dan gancang	83
5.3	Profil pH dan kepekatan asid organik dalam kultur (A) permukaan statik dan (B) gancang	84
5.4	Perubahan kepekatan asid laktik dan glukonik dalam kultur permukaan statik	85
5.5	Perubahan kepekatan asid laktik dan glukonik dalam kultur gancang	86
5.6	Perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat dalam kultur permukaan statik	87
5.7	Perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat dalam kultur gancang	88
5.8	Profil kepekatan karbohidrat bagi kultur permukaan statik dan gancang dalam CWHSM	89
5.9	Yil SB dalam kultur permukaan statik dan gancang bagi CWHSM	91
5.10	Perkaitan nisbah luas permukaan kepada isipadu (L/I) terhadap penghasilan SB	92
5.11	Nilai pH medium bagi nisbah L/I yang berbeza	93
5.12	Perkaitan kepekatan asid organik dan berat kering SB bagi nisbah (A) $L/I=0.12$ (B) $L/I=0.84$ dan (C) $L/I=1.4$	94
5.13	Perkaitan kepekatan karbohidrat dan berat kering SB bagi nisbah (A) $L/I=0.12$ (B) $L/I=0.84$ dan (C) $L/I=1.4$	95
5.14	Berat kering SB dalam pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi	97
5.15	Nilai pH medium bagi setiap pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi	98
5.16	Nilai produktiviti SB bagi pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi	99
5.17	Kepekatan asid glukonik pada pH awalan berbeza	100
6.1	Gambarajah skematik menunjukkan sel berada di dalam jaringan SB (kanan), mikrogram sel dalam jaringan SB (kiri)	103
6.2	Prosedur yang digunakan dalam KS dan KD	104

6.3	Berat kering SB dalam KS dengan pH awalan (A) 4, (B) 5 dan (C) 6	106
6.4	Berat kering SB dalam KD dengan pH awalan (A) 4, (B) 5 dan (C) 6	107
6.5	Kepingan SB kering pada minggu ke-3 penyimpanan yang dirawat secara KS	110
6.6	Kepingan SB kering pada minggu ke-3 penyimpanan yang dirawat secara KD	110
6.7	Imej sampel SB tanpa rawatan	111
6.8	Mikrograf SB yang dirawat secara KS	112
6.9	Mikrograf SB yang dirawat secara KD	112
6.10	Pelikel selulosa sebelum rawatan alkali (kiri), selepas rawatan alkali (kanan) pada pembesaran x70 000	113
6.11	Pengiraan dimensi pelikel SB oleh SEM secara automatik	114
6.12	Spektrum kajian unsur oleh EDX untuk SB tanpa rawat (A), SB secara KS (B) dan SB secara KD (C)	115
7.1	Histogram DSC untuk SB daripada CWHSM	123
7.2	Histogram DSC untuk SB daripada CM	123
7.3	Histogram DSC untuk SB daripada HSM	124
7.4	Modulus Penyimpanan atau Modulus Elastik, E' SB daripada 3 medium	125
7.5	Modulus Kehilangan, E'' SB daripada 3 medium	126
7.6	Nilai Tan Delta, $\tan \delta$ SB daripada 3 medium	127
7.7	Spektrum SB daripada CWHSM	128
7.8	Spektrum SB daripada CM	128
7.9	Spektrum SB daripada HSM	129
7.10	Profil tan delta bagi SB daripada tiga medium berbeza	130
7.11	Mikrograf SB dalam CWHSM pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi	132
7.12	Mikrograf SB dalam CM pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi	133
7.13	Mikrograf SB dalam HSM pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi	134
7.14	Diameter liang bagi SB berbanding masa fermentasi	135
7.15	Diameter pelikel bagi SB berbanding masa fermentasi	136
7.16	Mikrograf SB pada hari ke-10 dalam CWHSM dengan dimensi	136

7.17	Spektra difraktogram sinar-X oleh sampel SB dalam (a) CWHSM (b) CM dan (c) HSM	139
7.18	Perbandingan profil penyerakan sinar-X bagi sampel SB dalam medium penghasilan berbeza	140
7.19	Nilai jarak- d bagi sampel SB	141
7.20	Saiz kristal bagi sampel SB	142



SENARAI SINGKATAN

SB	Selulosa Bakteria
CMC	karboksimetil selulosa
UDPG	uridin difosfoglukosa
TCA	asid trikarboksilik
DO	oksigen terlarut
BASYC®	<i>Bacterial Synthesised Cellulose</i>
PEG	polietilena glikol
ATP	adinosin trifosfat
ICI	Imperial Chemical Industry
DMA	Analisis Mekanikal Dinamik
PEO	polietelin oksida
DSC	Kalorimetri Pengimbasan Pembezaan
XRD	Pembelauan Sinar-X
MARDI	Institut Pembangunan dan Penyelidikan Pertanian Malaysia
HSM	medium Hestrin-Schramm
CM	medium kompleks
CWHSM	medium air kelapa Hestrin-Schramm
CI	indeks pengkristalan
SEM	Mikroskop Pengimbas Elektron
PET	polietilena teraftalat
HPLC	kromatografi cecair tekanan tinggi
NOC	<i>nematic ordered cellulose</i>
PDE-A	fosfodiesterases A
PDE-B	fosfodiesterases B
BFCB	bioreaktor filem cakera berputar
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide fosfat
NADPH	glutamat sintase
CSL	<i>corn steep liquor</i>
KS	kaedah satu
KD	kaedah dua

SENARAI FORMULA MOLEKUL KIMIA

H_3PO_4	asid fosforik
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ammonium sulfat
Na_2HPO_4	sodium hidrogen fosfat
KOH	kalium hidroksida
K_2CO_3	kalium karbonat
Na_2CO_3	sodium karbonat
H_2SO_4	asid sulfurik
CO_2	karbon dioksida



SENARAI SIMBOL

mL/min	mililiter per minit
cm ²	centimeter persegi
nm	nanometer
μm	mikrometer
g/L	gram per liter
mL/min	mililiter per minit
mg/L	milligram per liter
mol/L	mol per liter
L/I	luas per isipadu
mW	miliwatt
Da	Dalton
°C	darjah Celsius
kV	kilovolt
mA	miliampere
μ	mikro
M	molariti
N	normaliti
Y	yil
E'	modulus penyimpanan
E''	modulus kehilangan
E^*	modulus dinamik kompleks
T_g	suhu peralihan kaca
T_c	suhu pengkristalan
T_m	suhu kristal mencair
I_α	fasa kristal I alfa
I_β	fasa kristal I beta
Å	Amstrom, unit panjang gelombang radiasi elektromagnet
μ_{mak}	kadar pertumbuhan spesifik maksimum
t_d	masa penggandaan
GPa	gigapaskal
MPa	megapaskal

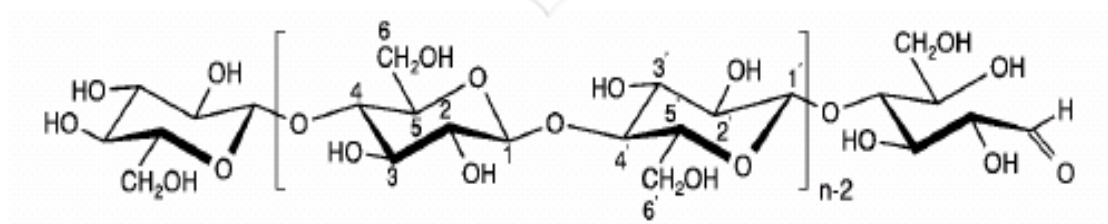
$\tan \delta$	tan delta
rpm	pusingan per minit (round per minute)
cps	kiraan per saat (count per second)
pK_a	pemalar penceraian asid (acid dissociation constant)
vvm	isipadu per isipadu per minit (volume per volume per minute)
Ca^{2+}	ion kalsium
C	karbon
N	nitrogen
O	oksigen
Mg	magnesium
Na	sodium
n	integer bagi peringkat pantulan
λ	panjang gelombang bagi tuju sinar-X
θ	sudut bagi sinar tuju, sudut Bragg
d	jarak satah dalaman bagi kristal
D	saiz kristal yang bersudut tepat kepada satah
k	nombor Scherrer = 0.94
I_{200}	intensiti maksima bagi pembelauan kekisi 200 pada $2\theta = 22.5^\circ$
I_{am}	adalah intensiti minimum mewakili kandungan amorfus pada $2\theta = 18^\circ$
B	lebar penuh pada separuh ketinggian, unit radians

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG KAJIAN

Selulosa (β -1,4-glukan) merupakan biopolimer yang paling banyak terdapat di alam ini dan boleh diperolehi daripada tumbuhan, alga, kulat dan bakteria (Nakai et al. 1999). Ia biasanya wujud sebagai struktur komponen yang bercantum dengan polimer lain pada dinding sel tumbuhan seperti pektin, lignin dan arabinan. Organisma penghasil selulosa ialah alga dan beberapa haiwan peringkat rendah (*Tunicata*), beberapa spesis bakteria dari gen *Rhizobium*, *Agrobacterium* dan *Alcaligenes*. Terdapat beberapa spesis bakteria yang mempunyai taksonomi yang menyamai gen *Acetobacter xylinum* (bakteria asid asetik) yang dapat mensintesis selulosa sebagai fiber secara ekstra-selular (Vandamme et al. 1998). Rajah 1.1 menunjukkan rantaian lurus bagi molekul biopolimer ringkas yang dihubungkan pada posisi β -1,4 yang membentuk selulosa.



Rajah 1.1 Struktur molekul rantaian β ,1-4 glukan yang membentuk selulosa

Sumber: Brown 2004

Acetobacter xylinum merupakan bakteria gram negatif yang mampu menghasilkan selulosa bakteria (SB) secara efektif kerana berupaya memisahkan antara sintesis fibril mikro selulosa dengan pembentukan dinding sel (Sphigel et al. 1998). Enzim untuk penghasilan selulosa dalam *A. xylinum* hadir di atas membran sitoplasmik dan SB pula diperolehi di bahagian luar sel. Selulosa merupakan agregat rangkaian glukosa yang tersusun dalam kedudukan spesifik untuk wujud sebagai kristal (Saxena & Brown 2001). Bakteria *A. xylinum* menghasilkan selulosa yang tulen. Satu sel tunggal mampu untuk melakukan pempolimeran glukosa sehingga 200,000 per saat kepada rantaian β -1,4-glukan. Proses penulenan selulosa tumbuhan seperti penulenan kapas dan kertas akan mengurangkan panjang rantaian polimer tersebut. SB tidak memerlukan pemprosesan lanjutan untuk membuang polimer yang tidak dikehendaki atau sebarang bendasing seperti lignin dan hemiselulosa. SB masih mengekalkan pempolimeran pada keadaan asalnya tanpa pengurangan dalam rantaian tersebut (Nishi et al. 1990).

Penghasilan SB telah mendapat perhatian meluas semenjak penemuan pelbagai aplikasinya dalam industri. Antaranya ialah industri pulpa dan kertas (Keshk & Sameshima 2005). SB mempunyai kekuatan mekanikal yang tinggi dan mudah didegradasi secara biologi apabila dibandingkan dengan selulosa daripada tumbuhan atau polimer sintetik. Ia juga boleh ditulenkan dengan mudah berbanding selulosa daripada kayu kerana bebas daripada lignin. SB mempunyai kapasiti penyimpanan air yang tinggi, sesuai untuk pelbagai tujuan inovatif seperti agen pemukal makanan, alatan radio dan diafragma, membran, pembalut perubatan, pengganti kepada salur darah dan kulit tiruan. Oleh kerana itulah, SB menjadi biopolimer yang amat berguna dan bersifat mesra alam. Kebaikan kaedah sistem bakteria untuk menghasilkan selulosa ialah pertumbuhan bakteria adalah cepat di bawah keadaan terkawal serta dapat menghasilkan SB daripada pelbagai sumber karbon seperti glukosa, etanol, sukrosa dan gliserol.

1.2 PERMASALAHAN KAJIAN

Permasalahan kajian ini ialah kepekatan, yil dan produktiviti SB yang rendah yang ditunjukkan dengan yil SB yang diperolehi oleh Toda et al. (1997) bagi kultur permukaan statik daripada pelbagai substrat iaitu 0.1 g SB/ g fruktosa, 0.1 g SB/g sukrosa, 0.1 g SB/g mannitol, 0.05 g SB/g glukosa dan 0.05 g SB/g gliserol. Kajian berskala makmal ini dijalankan dalam kelalang kon 100 mL dengan isipadu medium 30 mL. Di samping itu, kos penghasilan SB yang tinggi menjadikan kos produk juga tinggi. Daripada kajian pasaran yang dibuat untuk produk sintetik yang digunakan sebagai pembalut luka terbakar, diabetik dan ulser seperti dalam Jadual 1.1 membuktikan harga produk yang tinggi di pasaran antarabangsa.

Jadual 1.1 Senarai produk sintetik dan harga

Produk	Syarikat	Kos Produk	Kegunaan
Epicel	Genzyme Biosurgery	RM71.80/cm ²	Luka terbakar
Alloderm	LifeCell Incorporation	RM40.30/cm ²	Luka terbakar
Apligraf	Organogenesis Incorporation	RM97.30/cm ²	Luka kronik, Ulser diabetik
TransCyte	Smith & Nephew Inc.	RM53.95/cm ²	Luka terbakar
TransCyte	Smith & Nephew Inc.	RM49.00/cm ²	Luka terbakar, Ulser kaki diabetik
Dermagraft	Smith & Nephew Inc.	RM40.00/cm ²	Luka kronik Ulser kaki diabetik
Biobrane	Smith & Nephew Inc.	RM3.40/cm ²	Luka terbakar
Integra	Integra Life Sciences Inc.	RM22.80/cm ²	Luka terbakar

Nota: 1USD = RM3.8

Sumber: Czaja et al. 2006

Keshk dan Sameshima (2006a) menyatakan bahawa proses penghasilan SB adalah mahal dan salah satu cara untuk mengurangkan kos tersebut ialah dengan menggunakan substrat daripada sumber semulajadi yang lebih murah. Rasional kajian ini adalah menentukan reka bentuk medium untuk penghasilan SB bersumberkan bahan semulajadi seperti air kelapa tua bagi meminimumkan kos dan meningkatkan kepekatan, yil dan produktiviti SB yang dihasilkan oleh *A. xylinum* 0416.

Permasalahan kedua ialah kualiti SB yang tidak konsisten disebabkan oleh kesan proses perawatan yang dijalankan. Kaedah perawatan alkali seperti sodium hidroksida mampu menyingkirkan sel yang terperangkap di antara jaringan pelikel SB. Namun begitu, prosedur perawatan yang digunakan perlulah mengambilkira kualiti produk SB yang akan diperolehi. Rasional kajian ini ialah untuk menentukan satu kaedah perawatan yang sesuai agar kualiti SB konsisten dari segi integriti dan struktur, supaya boleh diaplikasi untuk pelbagai tujuan inovatif.

Permasalahan yang ketiga ialah kekurangan data pencirian SB yang spesifik daripada medium penghasilan berbeza. Rasional kajian ini adalah untuk menentukan ciri spesifik SB daripada medium penghasilan berbeza. Maklumat ini akan menjadi panduan berguna untuk penyelidikan SB pada masa depan.

Permasalahan keempat ialah kaedah menentukan kepekatan SB, jisim sel *A. xylinum* 0416 yang terperangkap dan berat air, yang lambat dan memerlukan kos yang tinggi. Proses untuk mendapatkan berat kering SB adalah dengan mendidihkan sampel SB dalam larutan sodium hidroksida (NaOH) bagi melarutkan sel *A. xylinum*, manakala sampel SB perlu didegradasi menggunakan enzim selulase sebelum jisim sel yang terperangkap dapat dikira. Kedua-dua kaedah ini memerlukan masa yang panjang dan kos yang tinggi. Di samping itu, penentuan jisim sel menyebabkan produk SB telah didegradasi dan tidak dapat digunakan untuk aplikasi inovatif. Rasional kajian ini adalah untuk membangunkan kaedah mengira kepekatan SB dan jisim sel yang efektif dari segi kos dan masa, berpandukan kepada berat basah sampel SB. Daripada data ini, kandungan sampel boleh dianggarkan dengan cepat tanpa perlu menjalani proses perawatan dan degradasi seterusnya membantu penyelidik membuat rumusan yang efisien.

1.3 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif kajian ini ialah:

- Menentukan reka bentuk medium untuk meningkatkan kepekatan, yil dan produktiviti SB serta meminimumkan kos

- Menentukan satu kaedah perawatan yang sesuai bagi menjamin kualiti SB dari segi integriti dan struktur
- Menentukan korelasi ciri spesifik SB dalam medium berbeza
- Membangunkan kaedah pengiraan kepekatan SB dan jisim sel yang efektif dari segi kos dan masa dalam medium berbeza

1.4 SKOP KAJIAN

Skop kajian ini ialah menjalankan fermentasi SB secara fermentasi permukaan statik oleh strain *Acetobacter xylinum* 0416. Strain ini diperolehi dan diselenggarakan oleh MARDI mengikut prosedur yang telah ditetapkan. Penentuan reka bentuk medium penghasilan SB memfokuskan kepada penggunaan substrat air kelapa daripada bahan buangan pertanian. Satu kajian perbandingan melibatkan medium tertakrif iaitu HSM dan medium bersumberkan substrat air kelapa iaitu CWHSM dan CM, dilakukan untuk mendapatkan medium paling berpotensi untuk menghasilkan SB. Penggunaan substrat daripada bahan buangan pertanian tempatan dijangka dapat meminimumkan kos di samping memelihara alam sekitar. Parameter fermentasi yang dikaji ialah perbandingan antara kultur permukaan statik dan kultur goncang, luas permukaan dan pH awalan medium.

Pembangunan kaedah perawatan SB menjurus kepada penambahbaikan prosedur rawatan alkali sodium hidroksida (NaOH) dan membandingkan dengan kaedah yang digunakan sejak 15 tahun sebelumnya. Keperluan kepada kaedah perawatan SB yang efisien amat penting agar kualiti SB konsisten dari segi integriti dan struktur sama ada untuk penyimpanan dan aplikasi berpotensi. Mikroskop Pengimbas Elektron '*Scanning Electron Microscope*' (SEM) dan Dispersi Tenaga Sinar-X '*Energy Dispersive X-ray*' (EDX) akan digunakan untuk objektif ini.

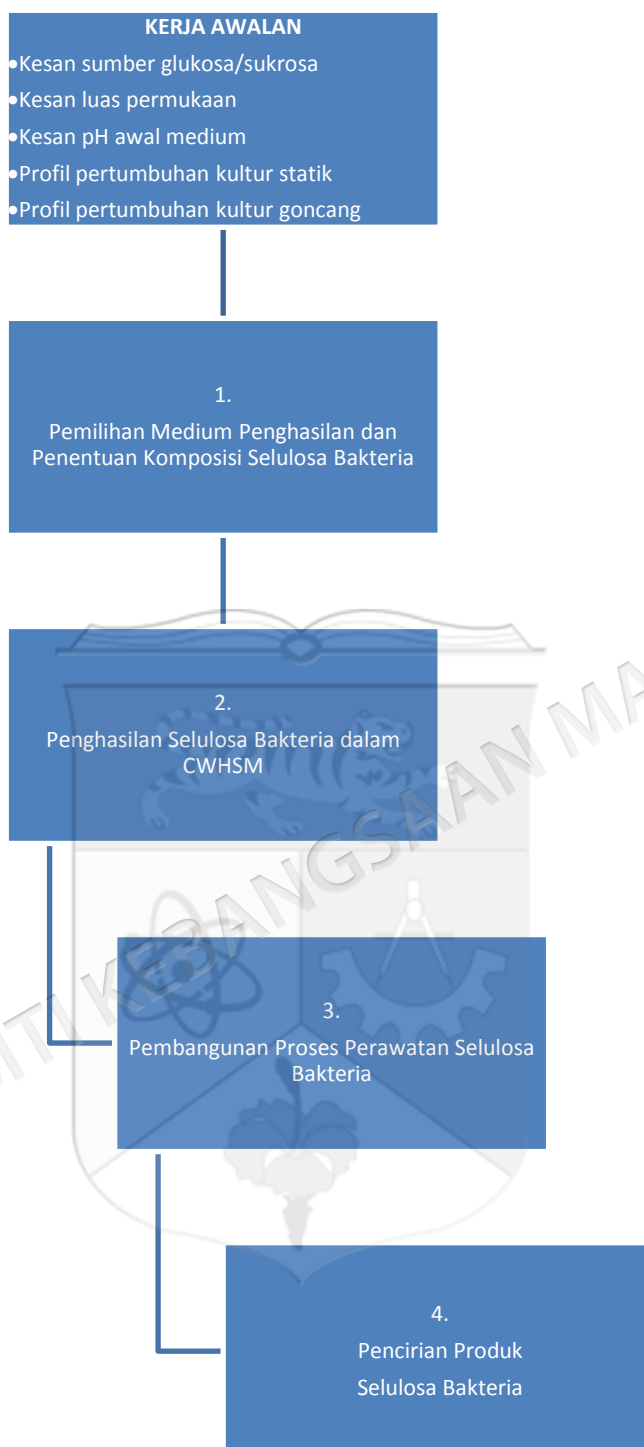
Ciri spesifik SB yang dikaji ialah morfologi, sifat termal, sifat mekanikal dan sifat kristalografik. Nilai komersil SB perlu diketahui untuk menentukan kesesuaian bidang aplikasi. Kajian morfologi menggunakan mikrograf SEM, membantu memberikan dimensi dan susunan pelikel seterusnya kapasiti memegang air oleh SB. Analisis peralatan DMA dan DSC pula akan memberikan nilai suhu peralihan kaca

'glass transition', suhu kristal mencair '*crystalline melting temperature*' dan suhu penguraian '*decomposition temperatures*'. Sifat kristalografik pula dianalisis menggunakan peralatan Pembelauan Sinar-X (XRD). Kajian ini akan menentukan Indeks Pengkristalan (CrI) menggunakan kaedah Segal et al. (1959), saiz kristal menggunakan formula Scherrer, dan jarak antara satah dalaman kristalografik '*d-spacing*' menggunakan Bragg's Law. Pencirian produk SB daripada medium penghasilan berbeza akan dibanding dan dikaji.

Kaedah pengiraan kepekatan SB dan jisim sel dalam sampel SB natif dijalankan bagi menentukan kepekatan SB, jisim sel *A. xylinum* yang terperangkap dalam pelikel dan berat air berpandukan berat basah sampel. Enam jenis sampel SB daripada CWHSM statik, CWHSM goncang, CM statik, CM goncang, HSM statik dan HSM goncang dikaji dalam objektif ini.

1.5 GARIS KASAR TESIS

Garis kasar tesis ini dimulakan dengan Bab I iaitu Pengenalan. Bab ini menjelaskan tentang latar belakang, permasalahan, rasional, objektif dan skop kajian. Bab II ialah Kajian Kepustakaan yang mengandungi laporan berkaitan kajian daripada penyelidik terdahulu. Seterusnya metodologi umum dijelaskan dalam Bab III iaitu Metodologi Kajian. Empat tajuk utama telah dijadikan bab hasil kajian seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1.2. Setiap bab hasil kajian mengandungi metodologi khusus untuk bab berkenaan, keputusan dan perbincangan serta kesimpulan. Bab IV ialah Pemilihan Medium Penghasilan dan Penentuan Komposisi Selulosa Bakteria. Bab V ialah Penghasilan Selulosa Bakteria dalam CWHSM. Bab VI ialah Pembangunan Proses Perawatan Selulosa Bakteria dan Bab VII ialah Pencirian Produk Selulosa Bakteria. Bab VIII Kesimpulan dan Cadangan merumuskan keseluruhan kesimpulan daripada kajian ini serta cadangan penambahbaikan pada masa akan datang. Tesis ini diakhiri dengan Rujukan dan Lampiran.



Rajah 1.2 Carta alir kajian

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 PENGENALAN KEPADA SELULOSA BAKTERIA

Tikar selulosa yang berkaitan dengan penghasilan cuka, teh *Kombucha* dan *Nata de Coco* telah dikenali sedekad lalu dan dikategorikan sebagai metabolik sekunder bagi bakteria *Acetobacter xylinum*. Sejarah penemuan selulosa bakteria ialah hasil daripada bakteria *Bacterium aceti* yang menghasilkan satu jisim pepejal yang telah dirujuk sebagai ‘tumbuhan cuka’ atau ‘ibu’. Bahan tersebut didapati sukar untuk koyak, dan teksturnya seperti tisu haiwan. Komponen tersebut kemudiannya dikenalpasti sebagai selulosa dan bakteria yang menghasilkannya ialah *Bacterium xylinum*.

Bakteria tersebut telah dirujuk kepada beberapa nama termasuk *Acetobacterium xylinum* dan *Bacterium xylinodes*. Kemudiannya ia telah dirujuk sebagai *Acetobacter xylinum* (Krieg & Holt 1984), dan ini menjadi nama rasminya berpandukan kepada kod dan singkatan bakteria antarabangsa. *A. xylinum* berupaya menghasilkan jaringan selulosa secara fermentasi permukaan dari pelbagai substrat. Walaupun selulosa terhasil secara ekstra-selular (Aschner & Hestrin 1946), mekanisme penghasilannya adalah sama seperti intra-selular dengan enzim aktif hadir di luar permukaan bakteria (Hestrin & Schramm 1954). Ini telah menjelaskan bahawa sel *A. xylinum* mampu membuat pempolimeran sehingga lebih dari 200,000 molekul glukosa per saat kepada rantai β -1,4-glukan.

2.1.1 Sejarah Penghasilan

Kajian pertama pembentukan selulosa dalam bakteria telah dilaporkan oleh Adrian Brown pada tahun 1886. Beliau mendapati satu jaringan gel seperti tikar terbentuk di permukaan rot semasa fermentasi cuka. Analisis lanjut mendapati bahan tersebut adalah selulosa. Beliau menamakan organisma yang berperanan ke atas pembentukan filem selulosa ini sebagai *Acetobacter xylinum*. 'Xylinum' dalam konteks ini bermaksud kapas. Semenjak itu beberapa kumpulan telah mengkaji organisma ini untuk mempelajari penghasilan selulosa dalam sistem hidup. Hestrin et al. (1947) merupakan kumpulan pertama yang memberikan penjelasan secara terperinci tentang sintesis selulosa oleh *Acetobacter xylinum*. Siri jurnal yang diterbitkan sekitar tahun 1950an melaporkan bahawa kumpulan penyelidik dari Israel telah mengkaji faktor yang mempengaruhi penghasilan selulosa (Schramm & Hestrin 1954b), substrat dan perencat dalam penghasilan selulosa (Schramm et al. 1957a), sistem enzim dan produk perantara yang terlibat dalam penghasilan selulosa (Schramm & Hestrin 1957a; Gromet-Elhanan & Hestrin 1962).

Pada masa yang sama, penyelidik dari Filipina telah melaporkan kaedah penyediaan 'Nata' daripada air kelapa yang diperam dan daripada parutan nenas. Sehingga 1967, identiti organisma yang berperanan sebagai pembentuk 'Nata de Coco' dan 'Nata de Pina' (Lapas et al. 1967; Saturnino 1967) telah dikenalpasti sebagai *Acetobacter xylinum* dan Nata ini merupakan selulosa bakteria yang tulen. Proses pengoptimuman penghasilan Nata (Alaban 1962; Lapas et al. 1967) serta pemilihan dan pemencilan strain untuk penghasilan selulosa yang tinggi (De Jesus et al. 1971) turut dikaji.

Dekad seterusnya menunjukkan kajian ke atas *Acetobacter xylinum*, dan menjelaskan tentang model yang sempurna untuk biogenesis selulosa. Pengkaji dari Kanada yang diketuai oleh Colvin mengkaji laluan biosintesis lengkap yang melibatkan penghasilan selulosa daripada gula ringkas (Colvin & Leppard 1977). Satu kajian bersama turut melanjutkan projek ini di Norway dan mampu memencilkan mutan selulosa-negatif yang betul bagi *A. xylinum* secara mutagenesis kimia secara

terus (Valla & Kjosbakken 1982). Kebanyakan penemuan tersebut adalah berkisar kepada kajian mikrobiologi dan biokimia bagi biosintesis selulosa oleh *A. xylinum*.

Pada pertengahan 1980-an peranan *A. xylinum* diperluaskan dan menjadi model biosintesis selulosa dan penghasil selulosa secara komersial yang amat berpotensi. Kumpulan pertama merupakan penyelidik daripada Sony Corporation, Ajinomoto dan Institut Penyelidikan Tekstil Jepun. Mereka telah berjaya mengaitkan ciri fizikal selulosa bakteria dan mengaplikasikannya untuk menghasilkan bahan berkekuatan tinggi (Iguchi et al. 1986 U.S. Patent 4,742,164). Kumpulan kedua terdiri daripada saintis daripada Weyerhaeuser dan Cetus Corporation yang memfokuskan kepada penghasilan selulosa bakteria menggunakan fermenter tangki dalam berpengaduk oleh strain *A. xylinum* (Brown 1988 U.S. Patent 4,863,565). Pada akhir 1980-an beberapa aplikasi telah dilaporkan dalam literasi paten dan prospek pengkomersilan selulosa bakteria telah dikaji dengan terperinci (White & Brown 1989; Yamanaka et al. 1989).

Kajian dekad ini pula kebanyakannya menjurus kepada aplikasi berpotensi selulosa bakteria (Cannon & Anderson 1991; Ross et al. 1991). Teknologi yang sedang berkembang, cabaran dan prospek penyelidikan turut dibincangkan (Brown 1992). Kajian terkini memfokuskan kepada meningkatkan pencirian selulosa bakteria sebagai biobahan (Brown 1991; Yamanaka & Watanabe 1994). Terdapat juga kajian melibatkan faktor penting yang mempengaruhi penghasilan selulosa oleh *A. xylinum* (Masaoka et al. 1993; Embuscado et al. 1994a; Geyer et al. 1994b). Penghasilan selulosa berskala besar di luar makmal dan rekabentuk fermenter alternatif juga turut dilaporkan (Okiyama et al. 1992). Kegunaan selulosa bakteria kini turut diterima umum dan aplikasi bermula dari bahan tambahan bagi makanan dan agen pelekatan kertas kepada membran pemisahan (Shibazaki et al. 1993; Watanabe et al. 1993; Okiyama et al. 1993b; Ammon et al. 1995). Cadangan untuk mengubah selulosa semasa sintesisnya telah dikaji oleh beberapa kumpulan penyelidik baru (Hackney et al. 1994; Shirai et al. 1994; Takai 1994) dalam menghasilkan novel matriks selulosa. Selain itu, pengubahsuaian produk selepas fermentasi dan terbitannya dijangka dapat memperluaskan aplikasi selulosa yang dihasilkan daripada mikrob ini (Geyer et al. 1994a).

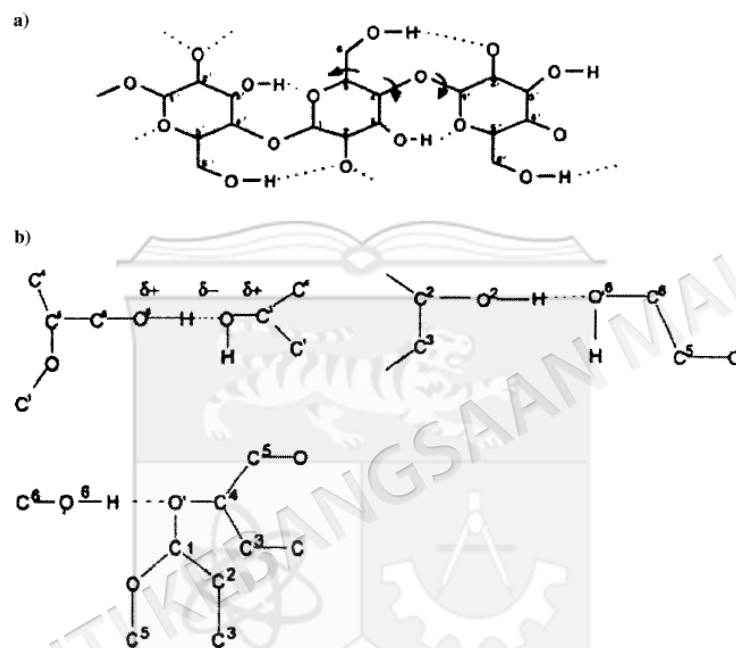
Daripada penemuan tentang fermentasi cuka, *A. xylinum* bukan sahaja menjadi perantara utama dalam menjelaskan sintesis selulosa dalam sistem hidup tetapi berpotensi sebagai sumber utama selulosa selain tumbuhan dan kapas. Selulosa bakteria telah mula dikenali sebagai biopolimer industri yang utama dengan pelbagai aplikasi bermula daripada makanan dan bahan tambah kertas kepada bahan berkekuatan tinggi dan membran komposit. Dengan keupayaannya diubahsuai semasa sintesis, selulosa bakteria yang menepati permintaan dengan fungsi baru akan dapat dihasilkan dan meluaskan kegunaannya.

2.1.2 Struktur Fizikal, Kimia dan Perbandingan dengan Selulosa Natif

Selulosa adalah polimer lurus yang mengandungi unit-unit D-anhidroglukopiranosose (unit glukosa) yang disambungkan bersama oleh ikatan β -1,4-glikosidik (satu unit 1,4- β -D glukosa). Bielecki et al. (2002) menyatakan bahawa apabila satu molekul selulosa itu bersambung sepenuhnya, ia membentuk satu riben mendatar kumpulan hidroksil dan berupaya membentuk kedua-dua ikatan hidrogen secara rantai dalaman (inter) dan rantai luaran (intra) seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.1. Permukaan riben tersebut mengandungi terutamanya atom hidrogen yang disambungkan secara terus kepada atom karbon dan bersifat hidrofobik. Kedua-dua ciri struktur molekul selulosa berperanan untuk menyokong struktur molekul dan menentukan sifat kimia dan fizikal.

Sifat dan fungsi selulosa ditentukan terutamanya oleh pengumpulan molekul secara kristal secara semulajadi. Fibril selulosa mempunyai sifat tidak larut dan tidak elastik yang tinggi. Jaringan β -1,4 memberikan sifat keras dan kaku, molekul seperti riben yang sesuai membentuk fibril secara ikatan hidrogen. Sintesis selulosa oleh *A. xylinum* secara pempolimeran kepada fibril mikro panjang di luar dinding sel dan ia merupakan komponen kimia yang sama seperti selulosa tumbuhan peringkat tinggi. Bentuk kristalografik selulosa jenis ini dikenalpasti sebagai selulosa I atau selulosa natif bersifat unik kerana fibril mikro wujud bersama rantaian glukosa yang disambung selari. Selulosa II terbentuk apabila selulosa I dilarutkan dan termendap atau dirawat menggunakan alkali tepu dan dibasuh dengan air semasa proses penggilapan. Kajian pembelauan oleh Nevell (1985) menyatakan bahawa selulosa II seperti kapas yang digilap dan selulosa jana semula, membentuk rantaian anti-selari glukosa secara

berdekatan dan lebih stabil secara termodinamik. Proses penggilapan akan menukarkan selulosa I kepada selulosa II tanpa melarutkan bahan tersebut. Mekanisma ini menjelaskan bahawa penukaran susunan selari kepada anti-selari adalah proses penyusunan semula struktur supra-molekul secara tidak langsung. Ini telah meragui selulosa I adalah meta-stabil secara termodinamik dan organisma hidup mengawal pengkristalan dalam keadaan sel yang tidak mengganda (Nevell 1985).



Rajah 2.1 Ikatan hidrogen secara (a) rantai dalaman dan (b) rantai luaran

Sumber: Bielecki et al. 2002

Fibril mikro menerangkan tentang struktur fibril paling nipis yang hanya boleh dilihat melalui mikroskop elektron. Fibril mikro selulosa natif berlaku dalam spektrum yang berdimensi daripada 1 ke 25 nm lebar (bersamaan dengan 10-250 rantaian) dan daripada 1 ke 9 μm panjang mengandungi 2,000 ke 18,000 lebih selulosa (Ross et al. 1991). Secara umumnya walaupun kelebaran fibril mikro setiap organisma berbeza-beza, tetapi agak sekata pada peringkat pertumbuhan bagi spesis yang tertentu (Haigler 1985). Fungsi dan kedudukan fibril mikro adalah berlainan untuk setiap sistem hidup. Dalam tumbuhan, fibril selulosa memenuhi bahagian menegak bagi matriks dinding sel polisakarida kompleks manakala dalam *A. xylinum*, fibril selulosa adalah lengai secara

metabolik, tulen dan terbentuk secara ekstra-selular untuk kegunaan ekologi (Cannon & Anderson 1991).

2.2 BAKTERIA PENGHASIL SELULOSA

Spesis *Acetobacter xylinum* merupakan salah satu daripada prokariot yang mensintesis polissakarida iaitu selulosa dalam kuantiti yang tinggi. Ia terbentuk di luar sel dalam keadaan jaringan fibril yang longgar. Dalam kultur cecair, organisma ini membentuk pelikel selulosa kental yang meliputi sel serta mencapai ketebalan sehingga beberapa sentimeter (Steiner et al. 1987).

Acetobacter ialah bakteria gram-negatif berbentuk rod dengan struktur lapisan terdiri daripada satu lapisan luaran membran lipopolisakarida, lapisan pertengahan peptidoglikan dan membran plasma. Sama seperti gram-negatif yang lain, rekahan pembekuan dalam *A. xylinum* paling banyak terjadi di membran lipopolisakarida (Zaar 1979). *A. xylinum* biasanya dipencilkan daripada buah yang rosak seperti epal. *A. xylinum* adalah bakteria tanah aerobik dalam famili bakteria yang menapai karbohidrat kepada cuka (*A. aceti*). Ia adalah bakteria luar biasa kerana mensintesis dan merembeskan fibril selulosa sebagai sebahagian daripada proses metabolisme glukosa. Sub-unit glukosa akan membentuk fibril mikro selulosa yang keluar melalui lubang yang terdapat pada dinding sel bakteria tersebut (Skinner & Cannon 2000).

Acetobacter dikenalpasti sebagai bakteria ungu yang paling maju berbanding bakteria yang lain. Organisma bukan fotosintetik ini boleh menggunakan pelbagai substrat dan menukarkannya kepada selulosa tulen (Brown et al. 1976). *A. xylinum* merupakan bakteria penghasil selulosa semulajadi yang paling prolifrik. Satu sel tunggal secara tipikal boleh menukarkan sehingga 10^8 molekul glukosa kepada selulosa setiap jam. Satu sel tunggal *Acetobacter* mempunyai satu barisan lubang lurus yang mana daripadanya gumpalan rangkaian polimer glukosa terhasil dalam bentuk bebenang. Seratus daripada lubang tersebut boleh menghasilkan kabel komposit polimer glukosa yang dihasilkan sebagai reben. Analisis masa untuk setiap sel *Acetobacter* yang menghimpun reben selulosa ternyata satu aktiviti yang cepat. Setiap sel bertindak sebagai satu pemutar nano, menghasilkan fibril sub-mikroskopik pukal.

Serentak dengan itu juga jaringan fibril menghasilkan membran gelatin yang dikenali sebagai pelikel. Selepas itu membran selulosa tulen dan sel akan terperangkap di antaranya. Ia boleh dibersihkan dan dikeringkan dan produk ini boleh digunakan untuk pelbagai aplikasi baru yang menarik.

A. xylinum merupakan bakteria penghasil selulosa yang hebat kerana ia mampu menghasilkan dua jenis himpunan selulosa dengan struktur kristal berbeza iaitu selulosa I dan selulosa II, bergantung kepada keadaan pertumbuhannya. Dalam medium Hestrin-Schramm (HS) pada suhu 28 °C, sel bakteria menghasilkan selulosa berbentuk reben yang terhimpun selari kepada paksi panjang sel tersebut. Himpunan reben ini terputar mengarah ke kanan dan mengandungi kristal selulosa I alfa (α) dan I beta (β). Kristal selulosa I alfa lebih dominan dengan 64 peratus berbanding I beta (Hirai et al. 2004).

A. xylinum mampu menghasilkan selulosa daripada pelbagai substrat murah termasuk dextros (glukosa), sukrosa, fruktosa, gula terubah, etanol dan gliserol (White & Brown 1989). Sumber karbon organik yang pelbagai ini memberikan fleksibiliti terhadap lokasi penghasilan selulosa bakteria. Sebagai contoh, industri pertanian seperti tanaman tebu dan kelapa yang banyak telah menghasilkan bahan buangan yang murah dan menjadikan Filipina mampu mengkomersilkan produk *nata* sehingga menjadi faktor ekonomi utama. Fleksibiliti dalam penggunaan pelbagai substrat fermentasi selulosa berupaya menghalang kebergantungan kepada satu substrat tertentu sahaja.

Kadar biosintesis selulosa bagi *A. xylinum* adalah 40 kali lebih cepat berbanding kapas (Brown 1991). Namun begitu, kelemahan ialah sumber karbon bagi penghasilan selulosa dalam *A. xylinum* perlu dibekalkan dalam bentuk glukosa atau sumber organik lain, sementara kapas menerbitkan karbonnya daripada karbon dioksida secara fotosintesis. Kecekapan penukaran bagi karbon kepada selulosa adalah pada kadar 10-40 peratus sahaja menjadikan selulosa bakteria agak sukar untuk bersaing dengan kapas dan tumbuhan dari segi ekonomi.

2.3 SINTESIS SELULOSA BAKTERIA OLEH *ACETOBACTER XYLINUM*

A. xylinum juga melakukan metabolisme produk lain selain selulosa. Kehadiran enzim glikosiltransferase akan menghasilkan polisakarida asetan. Walau bagaimanapun, semua laluan metabolik memfokuskan kepada penghasilan selulosa dan mengabaikan penghasilan polisakarida yang lain. Oleh kerana matrik selulosa bakteria ini lebih ringan daripada air, menjadikannya berperanan sebagai agen pengapung bagi memudahkan sel mendapat bekalan oksigen yang menjadi elemen penting bagi organisma aerobik (Hestrin & Schramm 1954). Matrik selulosa bakteria juga dapat mencegah sel daripada sinaran cahaya ultra ungu semasa tumbuh di atas buah-buahan yang masak, menghalang pesaing daripada sampai kepada nutrien di bawah pelikel, menambahkan pengkolonian bagi pepejal atau brot, dan menghalang lembapan (Williams & Cannon 1989). Pelikel selulosa terbentuk pada antara muka udara dan cecair apabila tumbuh di atas brot (Borzani & De Souza 1995). Apabila pelikel tumbuh ia menolak medium ke bawah, dan kristal selulosa yang baru akan mendominasi di atas permukaan pelikel dan kinetik dihadkan oleh oksigen. Apabila pelikel menebal, kinetik dihadkan pula oleh serapan substrat melalui pelikel.

2.3.1 Biosintesis Selulosa Bakteria

Bungay et al. (1997) telah melaporkan bahawa *A. xylinum*, bakteria gram negatif berbentuk rod dan berada di bawah famili *Acetobacteraceae*. Dalam kultur statik, sel menghasilkan selulosa sebagai metabolit sekunder secara ekstra-selular yang dihimpun dalam satu tikar selulosik tebal yang dikenali sebagai pelikel. Pelikel biasanya menutupi permukaan medium yang terdedah kepada udara. Selulosa memerangkap sel yang berada berhampiran permukaan medium di mana bekalan oksigen adalah berlebihan (Schramm & Hestrin 1954b). Sebanyak 50 peratus substrat karbon yang dibekalkan mungkin diserap ke dalam selulosa untuk menghasilkan pelikel. Bakteria akan hidup dan menghasilkan selulosa daripada pelbagai substrat dan tanpa aktiviti selulase. Masa penggandaan bagi *A. xylinum* dalam kultur statik adalah antara 8-10 jam manakala 4-6 jam untuk kultur bergoncang (Cannon & Anderson 1991).

Berpanduan kepada mikroskop elektron, setiap sel mensintesis reben fibril mikro selulosa yang tangen kepada permukaan sel. Reben dicantumkan dan kemudiannya mengarah selari dengan paksi sel secara memanjang. Reben tersebut terdiri daripada fibril mikro yang banyak dan dihubungkan secara mendatar antara molekul dengan ikatan-H. Pempolimeran secara terus dan pengkristalan selulosa menjadikan pergerakan sel berputar di atas paksi membujur apabila reben menjadi cukup panjang untuk berinteraksi dengan reben yang lain. Daripada pengamatan visual, pelikel gel selulosa ini sangat hidrofilik dan terbentuk pada antara muka udara cecair. Zon paling aktif bagi sintesis selulosa adalah pada permukaan atas pelikel yang terdedah kepada udara dan sel yang lebih tua akan dimampatkan ke dalam matrik reben, memberhentikan sintesis reben dan akhirnya mati.

Hesse & Tetsuo (2005) menyatakan bahawa *A. xylinum* adalah berbentuk rod, aerobik dan bakteria gram-negatif, menghasilkan serat nano selulosa dengan ketebalan 40-50 nm. Bahan ini dinamakan 'reben selulosa bakteria' yang akhirnya bercantum menjadi bahan seperti gelatin berwarna putih atau pelikel di atas permukaan kultur cecair statik. Selulosa natif ini mengandungi beberapa set rantai selari unit β -1,4-D-glukopiranosose yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen di antara molekul. Struktur gentian dengan satu nisbah bahagian kristal akan terbentuk, menunjukkan satu kompleksiti yang luas dan kepelbagaian dalam susunan molekul. Pembentukan struktur gentian selulosa bakteria dan pelikel boleh dikawal dengan mengubah komponen nutrien dalam medium dan keadaan pengeringan (Klemm et al. 2001).

Brown et al. (1976) melaporkan pergerakan *Acetobacter* dan hubungannya dengan biosintesis selulosa dalam medium HS (Hestrin & Schramm 1954). Mereka menyatakan bahawa kadar pergerakan sel adalah pada 2.0 mm per min pada 25 °C disebabkan oleh daya balikan yang terhasil daripada rembesan kristal fibril mikro selulosa oleh bakteria. Rembesan fibril mikro ini adalah berorientasi sama dengan pergerakan bakteria. Satu persediaan filem tiruan yang mempunyai trek molekul yang dinamakan sebagai '*nematic ordered cellulose*' (NOC) telah diperolehi (Togawa & Kondo 1999; Kondo et al. 2001). Pengarang juga telah mencadangkan bahawa orientasi trek molekul selulosa boleh digunakan sebagai templat kepada pembinaan bahan teratur tiga dimensi pada skala nano. Kondo et al. (2002) telah mendapati

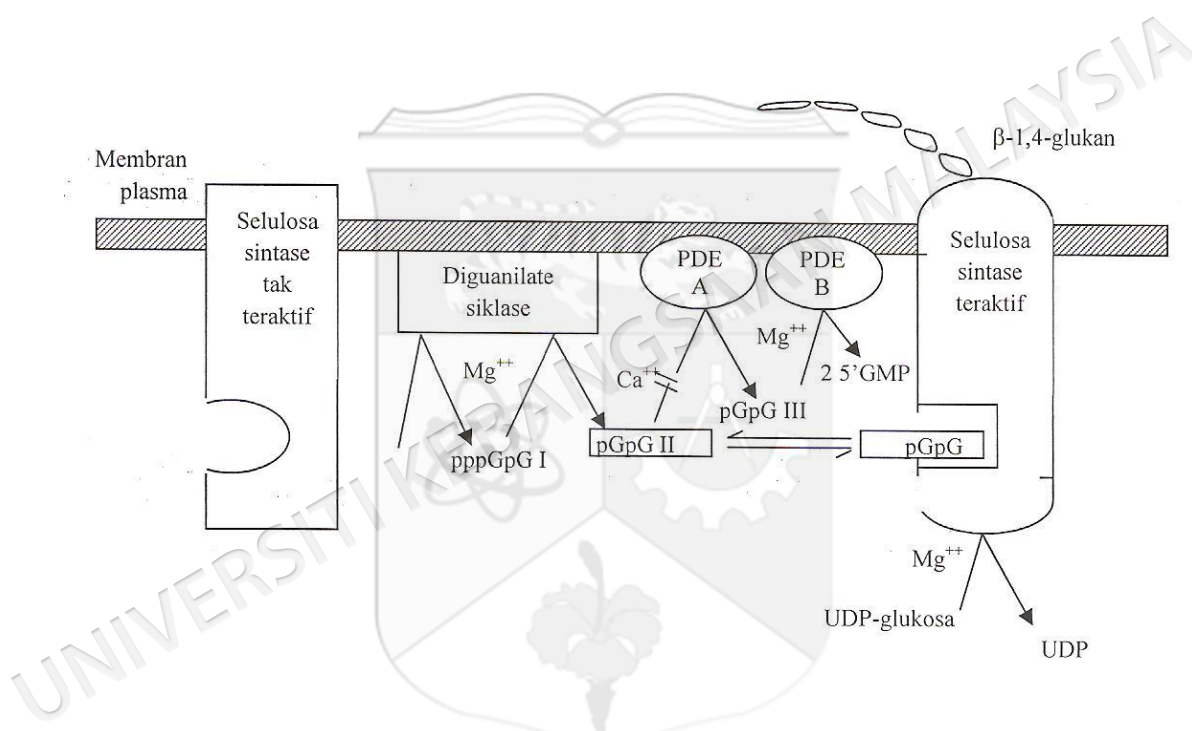
bahawa kadar pergerakan bagi sel NQ-5 untuk NOC adalah 4.5 mm per min pada 24 °C. Keputusan *A. xylinum* di atas telah dicapai menggunakan D-glukosa untuk biosintesis selulosa bakteria.

2.3.2 Biokimia bagi Biosintesis Selulosa Bakteria

Keseluruhan proses biokimia yang terlibat dalam sintesis selulosa bakteria masih belum difahami sepenuhnya. Terdapat kesukaran dalam mengasai sintesis selulosa *in vitro* dan penulenan enzim yang terlibat dalam proses tersebut. Bakteria *A. xylinum* memainkan peranan yang amat penting dalam membantu ahli biokimia memahami sintesis selulosa bakteria secara menyeluruh. Fakta yang mengatakan *A. xylinum* boleh menggunakan pelbagai substrat untuk biosintesis selulosa menyukarkan lagi keadaan. Laporan awal tentang julat substrat untuk penghasilan selulosa dan kesan perencat (Schramm et al. 1957b) menjadi asas kepada kajian biokimia. Beberapa eksperimen (Gromet-Elhanan & Hestrin 1962) menunjukkan bahawa *A. xylinum* juga mampu untuk menukarkan asid sitrik perantara kepada selulosa. Cadangan yang menyatakan bahawa pelbagai substrat tersebut terlibat secara metabolik sama ada dengan pentose atau kitaran asid sitrik menjelaskan bahawa sintesis selulosa diikat untuk metabolisme pengoksidaan. Walau bagaimanapun, pembentukan selulosa oleh *A. xylinum* boleh berlaku secara bebas dengan sintesis protein (Webb & Colvin 1967).

Rajah 2.2 menunjukkan sintesis selulosa dalam *A. xylinum*. Uridine difosfoglukosa (UDPG) diperolehi daripada glukosa-1-fosfat melalui aktiviti UDP-glukosa pirofosforilase digunakan untuk tindakbalas pempolimeran β -1,4-glukan (Ross et al. 1990). Aktiviti enzim tersebut tidak dipengaruhi oleh kehadiran glukosa atau fruktosa dalam medium kultur *Acetoabacter*, tetapi memberikan perubahan ketara kepada aktiviti enzim dalam strain penghasil dan bukan penghasil selulosa, lebih kurang seratus kali lebih aktif dalam penghasil selulosa (Tonouchi et al. 1996). Semasa tindakbalas, kitar asid diguanilik (c-di-GMP) bertindak sebagai satu elemen kunci pengatur. Ia berfungsi sebagai pengaktif alosterik bagi membran menghad selulosa sintase (UDP-glukosa: 1,4-/1-D-glukosiltransferase). Dengan ketiadaan c-di-GMP, selulosa sintase menjadi tidak aktif.

Pengaktif melekat secara terus kepada enzim dalam satu cara terbalik pada bahagian pengatur. Cara ini berbeza daripada katalitik atau bahagian lekatan substrat (Ross et al. 1991). Sintesis c-di-GMP dimungkinkan oleh diguanilate ciclase, daripada dua molekul GTP secara perantaraan lurus pppGpG. Aktiviti selulosa sintase diberhentikan oleh tindakan dua enzim, c-di-GMP fosfodiesterases A dan B (PDE-A dan PDE-B). PDE-A mengikat c-di-GMP untuk membentuk pGpG, yang kemudiannya diuraikan dengan cepat untuk menghasilkan dua molekul 5'GMP. Aktiviti PDE-A direncatkan secara selektif oleh ion Ca^{2+} (Ross et al. 1987; Benziman et al. 1989; Ross et al. 1991; Volman et al. 1995).



Rajah 2.2 Model peraturan biosintesis selulosa dalam *A. xylinum*

Sumber: Diolah daripada Ross et al. 1987

2.4 FAKTOR MEMPENGARUHI PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA

Mengenalpasti dan mencirikan faktor berbeza yang mempengaruhi penghasilan selulosa bakteria adalah penting untuk proses pengoptimuman. Faktor kritikal yang memberi kesan langsung terhadap penghasilan selulosa oleh *A. xylinum* boleh dibahagikan kepada dua iaitu komponen fermentasi dan keadaan operasi. Termasuk di dalam kumpulan pertama ialah strain organisma yang digunakan, komposisi medium

iaitu sumber karbon yang digunakan sebagai substrat dan sumber nitrogen atau unsur yang digunakan untuk memperkayakan medium. Kehadiran selulosa terbitan seperti CMC boleh mempengaruhi kadar penghasilan selulosa, bergantung kepada jenis selulosa yang disintesis. Faktor keadaan operasi pula ialah pH, oksigen, suhu, kepekatan relatif bagi substrat dan kaedah pengkulturan serta rekabentuk reaktor yang digunakan. Setiap keadaan ini bukan sahaja memberikan kesan kepada kadar penghasilan selulosa tetapi juga mempengaruhi ciri-ciri kimia dan fizikal produk selulosa yang dihasilkan.

2.4.1 Mod Fermentasi Permukaan Statik dan Fermentasi Dinamik

Penghasilan selulosa bakteria secara fermentasi permukaan statik telah berjaya diperbaiki dengan penghasilan sehingga 28 g/L manakala secara tenggelam dan berpengaduk ialah 9 g/L (Vandamme et al. 1998). Kadar tersebut diperolehi dengan memilih mutasi strain, mengoptimalkan komposisi medium dan mengawal parameter fermentasi kimia dan fizikal. Apabila bakteria asid asetik tumbuh dalam kultur statik dan dieramkan, selulosa akan dihasilkan dan membentuk satu lapisan tebal pelikel putih yang menyerupai kulit pada antara muka udara cecair kultur tersebut. Semasa pertumbuhan dan penghasilan selulosa, sel bakteria akan terperangkap secara berperingkat dalam pelikel. Secara umumnya telah memberikan satu hipotesis bahawa sintesis selulosa dan mekanisme penghasilannya oleh spesis *Acetobacter* yang bersifat aerobik tegar membantu sel untuk terapung dan berada di permukaan yang kaya dengan oksigen (Schramm & Hestrin 1954b). Masaoka et al. (1993) telah mengesahkan secara eksperimen bahawa hanya sel yang berada hampir dengan permukaan antara muka udara cecair yang mampu menghasilkan selulosa. Walau bagaimanapun, kajian terhadap penghasilan selulosa oleh *Acetobacter pasteurianus* di atas membran silikon mendedahkan bahawa penghasilan selulosa boleh juga berlaku di atas membran sintetik telap oksigen yang diletakkan di bahagian bawah turus kultur (Yoshino et al. 1996). Apabila membran yang digunakan tidak telap oksigen atau terlalu tebal, tiada penghasilan selulosa bakteria atau kadar penghasilan menurun.

Penyelidik lain turut mengoptimalkan proses fermentasi dua peringkat dengan peringkat pertama adalah pertumbuhan sel dalam kultur berpengaduk manakala

peringkat kedua adalah penghasilan selulosa dalam kultur permukaan statik (Okiyama et al. 1992). Bagi pandangan di peringkat industri, kultur tenggelam berpengaduk adalah lebih sesuai kerana penukaran oksigen lebih bermakna dan tidak perlu mengapungkan sel ke permukaan untuk mendapatkan oksigen. Namun begitu, pendekatan ini menyebabkan produktiviti selulosa bakteria telah jatuh dengan mendadak. Perhatian telah memfokuskan kepada pembangunan teknologi fermentasi untuk mengatasi limitasi dalam penghasilan selulosa berskala besar dan fermentasi tenggelam. Lebih daripada itu, media fermentasi spesifik telah dibangunkan untuk meningkatkan penghasilan selulosa terutamanya dengan menggunakan strain penghasil selulosa yang efisien.

Hwang et al. (1999) telah melaporkan bahawa produktiviti selulosa akan menurun dalam kultur bergoncang. Salah satu daripada alasannya ialah wujudnya ketidakstabilan genetik bagi strain penghasil selulosa dan pertumbuhan berlebihan secara berkala bagi strain bukan penghasil selulosa. Oleh kerana *Acetobacter* merupakan bakteria aerobik tegar, penghasilan selulosa oleh *Acetobacter* berlaku pada antara muka udara cecair. Diketahui bahawa strain *Acetobacter* berupaya menjadi bukan penghasil selulosa dalam keadaan bergoncang pada kepekatan oksigen terlarut yang tinggi dan menghadkan jumlah selulosa yang dihasilkan. Oleh itu, produktiviti yang tinggi selulosa per unit isipadu bagi fermentasi bergoncang belum lagi dinyatakan dalam mana-mana laporan. Masalah lain bagi kultur kelompok adalah keupayaan *Acetobacter* untuk menukarkan glukosa kepada asid glukonik. Penghasilan asid glukonik akan menggunakan glukosa daripada medium yang sepatutnya digunakan untuk menghasilkan selulosa.

Proses dua peringkat melibatkan fermentor angkut udara untuk penggalak penghasilan sel dan satu dulang kultur statik untuk penghasilan selulosa juga telah dilaporkan oleh syarikat Jepun (Okiyama et al. 1992). Pemprosesan menggunakan mikrob secara kultur statik tidak popular dalam industri. Walau bagaimanapun, proses pengadukan untuk penghasilan selulosa bakteria adalah tidak efisien kerana pengadukan menghalang penghasilan pelikel (Schramm & Hestrin 1954b). Oleh kerana itu ahli sains daripada Weyerhaeuser and Cetus Corporation telah memfokuskan kepada penghasilan selulosa bakteria daripada strain khas *A. xylinum*

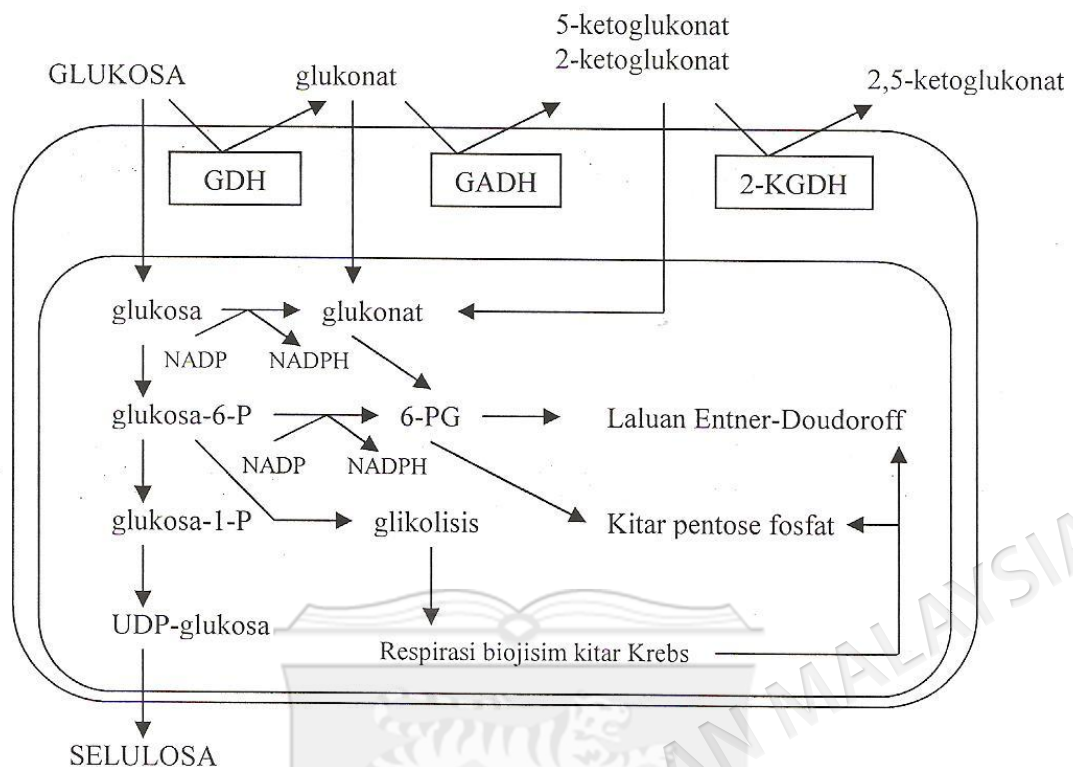
(Brown 1988 U.S. Patent 4,863,565). Pada tahun 1995, Kelco telah membeli perniagaan tersebut daripada Weyerhaeuser. Kultur tenggelam ini menghasilkan brot selulosa bakteria yang separuh kering dinamakan '*Cellulon*' dan penggunaannya juga terhad.

Bungay et al. (1997) telah membandingkan penghasilan selulosa dalam kultur statik dan sistem cakera berputar. Berat basah dan ketebalan filem telah meningkat dengan masa. Data untuk berat kering selulosa menunjukkan bahawa penghasilan selulosa adalah tinggi pada empat hari pertama untuk bioreaktor filem cakera berputar (BFCB) berbanding kultur statik. Perbandingan penghasilan selulosa pada halaju putaran yang dikaji adalah dalam julat 6-24 rpm. Penghasilan selulosa optimum untuk cakera yang berdiameter 12.5 cm adalah pada halaju 12-16 rpm.

2.4.2 Pembangunan Medium Penghasilan

a) Substrat

Vandamme et al. (1998) telah mengkaji sumber karbon daripada glukosa, fruktosa dan asid asetik sebagai sumber tenaga, digabungkan dengan satu kawalan pH yang tepat dan takat oksigen terlarut, menunjukkan yil bagi selulosa meningkat dengan baik. Rajah 2.3 menunjukkan operasi laluan amfibolik utama oleh bakteria *A. xylinum*, kitaran pentos fosfat untuk pengoksidaan karbohidrat dan kitar Krebb untuk pengoksidaan asid organik (Ross et al. 1991). Ketiadaan atau terlalu sedikit fosfofruktokinase melemahkan aktiviti glikolitik dan glukosa tidak boleh dimetabolisme secara anaerobik. Walau bagaimanapun Tonouchi et al. (1996) menyatakan bahawa aktiviti fosfofruktokinase terdapat dalam sub-spesis *Acetobacter xylinum* iaitu *sucrofermentans* BPR2001. Penyelidik ini juga turut mengkaji beberapa aktiviti enzim yang terlibat secara spesifik dalam sintesis selulosa. Glukoneogenesis boleh terjadi daripada oxaloacetate oleh piruvat dengan peranan enzim oxaloacetate decarboxylase dan piruvat fosfat dikinase.



Rajah 2.3 Laluan metabolisme karbon dalam *A. xylinum*

Sumber: Diolah daripada De Wulf et al. 1996

Penghasilan selulosa menggunakan substrat berbeza turut dilaporkan oleh Hwang et al. (1999). Antara substrat tersebut ialah glukosa, etanol, asetat, succinat dan L-malate. Objektif kajian adalah untuk menentukan jumlah hari yang diperlukan oleh setiap substrat untuk menghasilkan pelikel selulosa dengan ketebalan 3 mm. Kajian mendapati substrat glukosa mampu menghasilkan 3 mm selulosa dalam masa paling singkat iaitu 2 hari, ini diikuti 3 hari oleh 3 lagi substrat iaitu etanol, asetat dan L-malate. Succinat cuma mampu menghasilkan 3 mm selulosa bakteria pada hari yang ketujuh. Daripada kajian ini menunjukkan bahawa glukosa merupakan substrat yang paling sesuai untuk menghasilkan selulosa maksima dalam masa yang singkat dan meningkatkan produktiviti penghasilan selulosa bakteria.

Hong & Qiu (2007) menyatakan bahawa penghasilan selulosa bakteria boleh dilakukan oleh glukosa, sukrosa, fruktosa, gliserol, mannitol dan arabitol sebagai sumber karbon. Jika dibandingkan antara sumber karbon tersebut, mannitol dan

fruktosa merupakan sumber karbon yang lebih baik (Ross et al. 1991; Masaoka et al. 1993; Oikawa et al. 1995a; Oikawa et al. 1995b; Shoda & Sugano 2005). Namun begitu, disebabkan kos manitol dan fruktosa yang tinggi dan yil yang rendah menghadkan penghasilan selulosa bakteria di peringkat industri dan untuk pengkomersilan aplikasinya. Oleh itu, perlu ada pendekatan baru berkaitan sumber karbon yang digunakan untuk menghasilkan selulosa bakteria dengan yil yang tinggi.

Jadual 2.1 Sumber karbon dan penghasilan selulosa bakteria

Sumber Karbon	Penghasilan SB (g)	Keadaan fermentasi	Rujukan
D-Glukosa	0.069 ± 0.013	Suhu 30 °C, 160 rpm (1 hari), kemudian fermentasi pada 30 °C pada inkubator statik selama 8-23 hari.	Hong dan Qiu (2007)
D-Mannosa	0.033 ± 0.013		
Glukosa-mannosa (Nisbah Molar 1:1.6)	0.041 ± 0.001		

Hwang et al. (1999) telah melaporkan kesan kepekatan glukosa awal ke atas pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa dalam CLS medium untuk kultur kelompok. Telah didapati bahawa yil selulosa yang terhasil adalah berkadar langsung dengan kepekatan glukosa dalam medium. Apabila kepekatan glukosa awal kurang daripada 20 g/L, pekali yil untuk selulosa ($Y_{p/s}$) berada pada satu pemalar 0.21. Walau bagaimanapun, pekali yil selulosa yang rendah, $Y_{p/s}=0.13$, diperolehi pada kepekatan glukosa awal 40 g/L. Sebaliknya yil asetan meningkat dengan pertambahan kepekatan glukosa awal. Keputusan ini mencadangkan bahawa pengurangan yil selulosa pada kepekatan glukosa yang tinggi mungkin dapat menerangkan kepada peningkatan metabolisme glukosa kepada asid glukonik kepada asetan.

Masaoka et al. (1993) melaporkan bahawa yil selulosa dipengaruhi oleh jumlah glukosa yang digunakan iaitu berkurang dengan peningkatan kepekatan glukosa awal. Telah ditunjukkan bahawa kepekatan glukosa yang tinggi menyumbang kepada yil selulosa yang rendah. Dicadangkan bagi kultur kelompok perlulah dimulakan dengan satu nilai kepekatan glukosa awal yang rendah. Walau bagaimanapun, untuk mendapatkan kepekatan selulosa yang tinggi, glukosa mestilah dibekalkan kepada

kultur kelompok secara selangar atau berperingkat pada satu kadar yang boleh mengawal pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa.

Bungay et al. (1997) telah mengkaji kepekatan substrat awal dalam bioreaktor filem cakera berputar. Keputusan menunjukkan bahawa untuk masa lima hari pengkulturan, kepekatan glukosa awalan pada 2.5 peratus berat sudah berupaya untuk menyokong pertumbuhan filem dalam bioreaktor filem cakera berputar. Kelima-lima bioreaktor menghasilkan filem pada ketebalan yang sama serentak, kecuali kepekatan glukosa awalan 0.5 peratus berat yang mempunyai filem lebih nipis selepas dua hari pengkulturan.

b) Komposisi Medium

Ratusan strain di bawah gen *Acetobacter* boleh menghasilkan selulosa, dan pemencilan strain terbaik bagi penghasilan selulosa biasanya menjadi langkah pertama dalam prosedur pengoptimuman. Strain *Acetobacter xylinum* boleh menghasilkan gel selulosa pada ketebalan 5-7 cm boleh dikategorikan sebagai penghasil-lebih (Cannon & Anderson 1991). Nata inokulum yang biasanya digunakan dalam penghasilan *Nata de Coco* di Filipina dikatakan berada di bawah kelas strain *A. xylinum* ini (Embuscado et al. 1994a; 1994b). Secara jelas adalah satu kelebihan menggunakan strain yang dikenali sebagai penghasil-lebih selulosa walaupun pencirian strain *A. xylinum* kini adalah amat terhad.

Beberapa strain *A. xylinum* telah dikenalpasti memberikan ciri yang dikehendaki seperti berupaya menghasilkan selulosa pada kadar lebih cepat menggunakan substrat spesifik. Satu spesis tersebut iaitu *A. xylinum* KU-1 boleh menghasilkan selulosa daripada D-manitol pada kadar tiga kali lebih cepat berbanding glukosa di bawah keadaan yang sama (Oikawa et al. 1995b). Strain lain dengan penghasilan asid glukonik dan keto-glukonik yang rendah turut dilaporkan. Berkemungkinan strain *Acetobacter xylinum* yang dibina genetiknya dan mempunyai semua keupayaan yang dikehendaki akan dapat dihasilkan di masa depan.

Telah diketahui bahawa *A. xylinum* berupaya untuk mensintesisakan selulosa daripada pelbagai substrat, tetapi terdapat laporan yang mengkonflikkan tentang jenis sumber karbon yang memberikan kadar penghasilan terbaik. Dalam kajian lain (Masaoka et al. 1993), glukosa memberikan yil selulosa paling tinggi berbanding sumber karbon yang lain. Kajian oleh Embuscado et al. (1994b) menyatakan fruktosa menjadi pilihan sumber karbon terbaik yang mampu menghasilkan tujuh kali lebih banyak selulosa berbanding glukosa. Perbezaan keputusan ini adalah kerana perbezaan jenis strain yang digunakan pada setiap kajian tersebut. Walau bagaimanapun, telah dilaporkan bahawa sel yang hidup dalam fruktosa cenderung untuk menghasilkan asid yang rendah semasa fermentasi seperti yang ditunjukkan oleh pH akhir medium, jika dibandingkan dengan sel yang hidup dalam substrat glukosa. Akhirnya, strain yang paling ekonomi dan kesannya ke atas keseluruhan fermentasi (contohnya strain jenis *A. xylinum*) akan menentukan jenis gula yang digunakan.

Terdapat beberapa kajian tentang kesan sumber nitrogen ke atas penghasilan selulosa. Laporan terperinci pula hanya tentang perbandingan sumber organik seperti ekstrak yis dan sumber nitrogen bukan-organik seperti ammonium sulfat bersama strain penghasil-lebih selulosa iaitu *A. xylinum* seperti yang dilaporkan oleh Embuscado et al. (1994a). Berpandukan kepada laporan tersebut, penghasilan selulosa digalakkan dengan penggunaan sumber organik. Kombinasi pepton dan ekstrak yis memberikan yil paling tinggi. Kehadiran unsur yang tidak dikenalpasti dalam sumber organik dan tidak wujud dalam sumber bukan-organik sintetik, menyumbang kepada perbezaan ini.

Kajian lain yang membandingkan penggunaan media sintetik dan tidak tertakrif (Cannon & Anderson 1991) juga telah menyokong hipotesis ini. Medium tidak tertakrif yang mengandungi ekstrak yis dan pepton menghasilkan dua kali ganda selulosa berbanding medium sintetik dengan ammonium klorida menjadi sumber nitrogen utama. Jika mana-mana komposisi dalam medium sintetik dikeluarkan, tiada pertumbuhan sel berlaku, dan ini menunjukkan betapa pentingnya peranan unsur surih tersebut.

Komponen lain medium yang memberikan kesan penting ke atas penghasilan selulosa adalah kehadiran penggalak sama ada semasa pertumbuhan atau biosintesis. Telah diketahui bahawa sintesis selulosa dalam *A. xylinum* merupakan proses berganda yang melibatkan dua peringkat iaitu pempolimeran dan pengkristalan (Benziman et al. 1980). Penambahan komponen seperti terbitan selulosa CMC atau pewarna seperti *calcoflour* adalah untuk mempercepatkan salah satu atau kedua-dua peringkat ini (Brown 1992). Di samping mempengaruhi kadar penghasilan, kehadiran aditif polimer dalam medium juga boleh mengubah produk selulosa yang terhasil (Brown 1990; Shirai et al. 1994; Takai 1994) dan bahan selulosa baru telah dihasilkan dengan cara ini.

c) Nilai pH Awalan Medium

Kawalan pH secara dalaman dalam kultur permukaan statik boleh dicapai dengan pemilihan nisbah fruktosa, glukosa dan asid asetik yang betul dan jitu. Penggalak kepada sintesis selulosa ialah uridin difosfoglukosa (UDP-glukosa) seperti dalam Rajah 2.3 dan penghasilan selulosa bakteria secara umumnya dibentuk oleh sumber karbon glukosa atau sukrosa untuk pertumbuhan dan pembentukan polisakarida. Substrat karbon yang boleh menghasilkan selulosa termasuklah manitol (Oikawa et al. 1995b), fruktosa (Toyosaki et al. 1995), sukrosa (Embuscado et al. 1994a), arabitol (Oikawa et al. 1995a) dan gliserol (Masaoka et al. 1993).

Kepentingan komposisi medium terutamanya jenis sumber karbon yang digunakan menjadi lebih jelas sekiranya mempertimbangkan metabolisme karbohidrat bagi *A. xylinum* seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.3. Glukosa juga berperanan sebagai sumber tenaga dan penggalak penghasilan selulosa. Glukosa akan ditukarkan secara aktif oleh enzim dehidrogenase terikat membran *Acetobacter* kepada asid keto-glukonik. Keadaan ini bukan saja merendahkan yil selulosa keseluruhannya tetapi turut merendahkan pH medium kepada tahap bawah optima untuk viabiliti sel dan sintesis selulosa.

Keputusan ini menyimpulkan bahawa penggunaan kepekatan glukosa awal yang tinggi dengan anggapan dapat menghasilkan selulosa yang banyak adalah tidak

benar. Ini kerana, glukosa yang berlebihan telah ditukarkan kepada asid keto-glukonik yang secara langsung turut merendahkan pH (Masaoka et al. 1993). Oleh kerana itulah kawalan pH dalam proses fermentasi perlu dilakukan, tetapi agak sukar diaplikasikan pada kultur permukaan statik.

Satu pendekatan alternatif adalah dengan kawalan pH medium *in situ* menggunakan asid asetik sebagai substrat sampingan untuk strain *Acetobacter* sp. LMG 1518. Rasionalnya ialah *Acetobacter* spp boleh mengoksidakan asid asetik kepada karbon dioksida dan air, yang mana memberikan ATP ekstra dan julat pH yang diperlukan. Walaupun asid asetik itu sendiri tidak membantu kepada pembentukan selulosa secara langsung tetapi asid asetik penghasil ATP akan menjimatkan glukosa di mana secara umumnya digunakan juga untuk sintesis ATP, seterusnya menjadikan lebih glukosa dapat ditukarkan kepada selulosa. Menariknya, katabolisme asid asetik ini secara serentak turut meningkatkan pH. Keadaan ini dapat mengatasi penurunan pH oleh pembentukan asid keto-glukonik (pK_a asid asetik = 4.75).

Menggabungkan fruktosa (70 g/L), glukosa (35 g/L) dan asid asetik (7.5 g/L) dalam kultur permukaan statik memberikan kenaikan penghasilan selulosa kepada 28.4 g/L dengan produktiviti selulosa $6.7 \text{ g/L.hari}^{-1}$ (Joris & Vandamme 1993). Nilai pH awalan medium 5.5 adalah paling sesuai untuk sintesis selulosa dan nilainya ditetapkan sepanjang fermentasi, mengilustrasikan kebaikan kapasiti penimbal asid asetik. Ia turut menurunkan penghasilan asid keto-glukonik. Rekabentuk media begini atau pun yang menyerupainya akan memperbaiki penghasilan selulosa dalam kultur permukaan statik. Pelikel selulosa yang dihasilkan oleh strain LMG 1518 adalah mudah untuk dituai kerana ia bebas daripada sel bakteria dan kering. Fiber selulosa ini telah dikategorikan secara darjah pempolimeran 793 ± 9 , dengan jisim molekul $142,730 \pm 1660 \text{ Da}$. Respon kepada kaedah statik permukaan ini menjadikan Embuscado et al. (1994a) menjangkakan yil 13.24 g/L (keputusan eksperimen: 12.67 g/L) menggunakan 24.8 g/L fruktosa, 76.5 g/L sukrosa, pH 4.49 dan suhu inkubator 29.3°C dan strain *A. xylinum* dalam kultur tidak berpengaduk. Matsuoka et al. (1993) telah mengkaji stimulasi penghasilan selulosa dengan menambahkan laktat ke dalam medium. Mereka menjelaskan bahawa kesan positif ini adalah daripada peningkatan

kitar TCA dan penghasilan tenaga secara tindakbalas pengoksidaan daripada laktat kepada piruvat.

Gromet-Elhanan dan Hestrin (1962) melaporkan bahawa pertumbuhan sel *A. xylinum* mengalami perencatan pada pH melebihi 7.0 dan pH kurang daripada 3.5. Oleh itu, sel *A. xylinum* stabil pada pH 3.5-7.0. Dengan penggunaan substrat penghasil asid seperti glukosa, telah menunjukkan pertumbuhan yang optimum apabila pH awalan medium berada di antara 5.0-7.0. Dengan penggunaan substrat penghasil alkali pula seperti jenis garam asid organik, telah meningkatkan pH sehingga melebihi 7.0 dan melewati pertumbuhan sel (melebihi 60 hari) dengan pH awalan 4.0. Hwang et al. (1999) menyatakan bahawa kenaikan tahap pH juga berlaku semasa pertumbuhan dalam medium yang mengandungi fruktosa atau etanol sebagai sumber karbon. Namun begitu, nilai pH dapat dikawal dalam had yang dikehendaki dengan menentukan pH awalan pada 5.0. Yang et al. (1998) telah melaporkan bahawa, apabila strain *A. xylinum* BRCS dihidupkan di dalam fermenter menggunakan sumber karbon glukosa, kebanyakan glukosa ditukarkan kepada asid glukonik. Oleh itu, asid glukonik akan bertambah dalam brot yang menghasilkan selulosa tersebut.

Hwang et al. (1999) melaporkan bahawa pengabaian penggunaan sumber karbon memberikan produktiviti keseluruhan selulosa yang rendah. Fasa lemban dalam kultur kelompok perlu dikurangkan untuk menggalakkan produktiviti keseluruhan selulosa. Kajian lanjut mendapati bahawa perubahan pH semasa fermentasi strain BRCS amat penting untuk mengurangkan masa lemban tersebut. Telah didapati bahawa pertukaran glukosa kepada asid organik telah merendahkan pH medium untuk kultur kelompok. Oleh kerana pH kultur akan memberi kesan yang besar kepada penghasilan selulosa, kawalan pH adalah amat diperlukan.

Telah ditunjukkan dalam Jadual 2.2 oleh Hwang et al. (1999) bahawa pola fermentasi untuk kultur yang dikawal pH dan tanpa kawalan adalah sama. Walaupun kadar penghasilan asid glukonik oleh strain BRCS bergantung kepada pH kultur, jumlah maksima asid glukonik yang terkumpul pada setiap pH adalah hampir sama. Telah dilaporkan bahawa kadar penghasilan asid glukonik yang paling tinggi adalah pada pH 4.0 dan kadar penghasilan asid glukonik tersebut berkurang dengan

bertambahnya nilai pH. Yil selulosa paling tinggi dicapai pada pH 5.0 walaupun fasa lemban adalah lebih panjang berbanding pH 4.0. Masa fermentasi keseluruhan untuk pH 4.0 adalah kurang kerana fasa lemban adalah singkat jika dibanding dengan pH yang lain. Keputusan ini mencadangkan bahawa pH kultur mungkin memberi kesan kepada sistem pengoksidaan glukosa untuk strain BRCS.

Jadual 2.2 Ciri-ciri fermentasi selulosa dalam kultur kelompok oleh *xylinum* BRC5 pada pH berbeza

Parameter	pH pengkulturan		
	4.0	5.0	6.0
Fasa lemban (lag)	0-8	0-22	0-35.5
Fasa penghasilan asid glukonik (jam)	8-18	22-30	35.5-49.5
Fasa pertumbuhan sel/penghasilan selulosa (jam)	18-38	30-43	29.5-71
Masa fermentasi total (jam)	38	43	71
Jisim sel akhir (g/L)	2.08	3.42	3.49
Kepekatan selulosa akhir (g/L)	2.99	4.10	2.97
Pekali yil (g-selulosa/g-glukosa)	0.150	0.205	0.0149
Produktiviti selulosa keseluruhan (g/L.jam ⁻¹)	0.079	0.095	0.042

Sumber: Hwang et al. 1999

Telah disimpulkan bahawa pH optimum untuk metabolisme glukosa kepada asid glukonik adalah 4.0 tetapi pH 5.0 adalah lebih sesuai untuk pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa. Oleh itu dijangkakan dengan mengubah pH semasa pertumbuhan dalam medium glukosa boleh mengurangkan masa pertumbuhan keseluruhan dan meningkatkan yil selulosa. Oleh itu, pH awalan medium adalah pada 4.0 untuk menukarkan glukosa kepada asid glukonik dan kemudiannya pH tersebut dinaikkan kepada 5.0 atau 5.5 dengan penambahan isipadu tertentu larutan ammonium hidroksida 2N. Keputusan yang diperolehi adalah berbeza dengan jangkaan yil. Penukaran pH kepada 5.0 dan 5.5 menjadikan yil selulosa masing-masing kepada 3.57 g/L dan 3.29 g/L. Keputusan ini ternyata lebih rendah daripada medium pada pH 5.0 yang malar. Mereka telah menjangkakan wujudnya tekanan pH ke atas sel. Untuk menghilangkan kesan tersebut, pH medium dibiarkan naik secara semulajadi dengan penggunaan asid glukonik oleh sel. Selepas pH mencapai takat kawalan (5.0, 5.5, 6.0), pH medium dikawal secara automatik sekali lagi. Penukaran pH secara semulajadi daripada 4.0 kepada 5.5 memberikan yil terbaik iaitu 5.89 g/L selulosa,

yang mana 1.4 kali lebih tinggi daripada medium pH malar 5.0 iaitu 4.1 g/L (Hwang et al. 1999).

d) Kandungan Oksigen Terlarut

Kouda et al. (1997a) telah melaporkan bahawa kadar penghasilan dan yil selulosa adalah berkadar terus dengan kadar pemindahan oksigen dan pekali pemindahan oksigen. Kawalan oksigen terlarut dalam kultur suap-balik telah dikaji dengan jumlah keseluruhan glukosa yang ditambah ke dalam fermenter daripada masa pertumbuhan $t=30$ jam kepada $t=48$ jam adalah 40 g/L. Kepekatan selulosa mencapai maksimum iaitu 10.7 g/L pada $t=40$ jam. Dengan memanjangkan masa fermentasi, kepekatan selulosa dan jisim sel meningkat agak perlahan disebabkan oleh limitasi oksigen walaupun glukosa telah di tambah secara berterusan ke dalam fermenter. Pertambahan kepekatan selulosa adalah 0.7 g/L sahaja jika dibandingkan dengan medium kultur suap-balik pada 20 g/L glukosa. Oleh itu kawalan oksigen terlarut (DO) telah dilakukan untuk julat 2-15% ketepuan dengan data ditunjukkan dalam Jadual 2.3. Kepekatan selulosa maksimum telah diperolehi dalam kultur suap-balik apabila DO dikawal pada 10% ketepuan. Kaedah ini telah meningkatkan 1.5 kali kepekatan selulosa jika dibandingkan dengan kultur DO yang terhad.

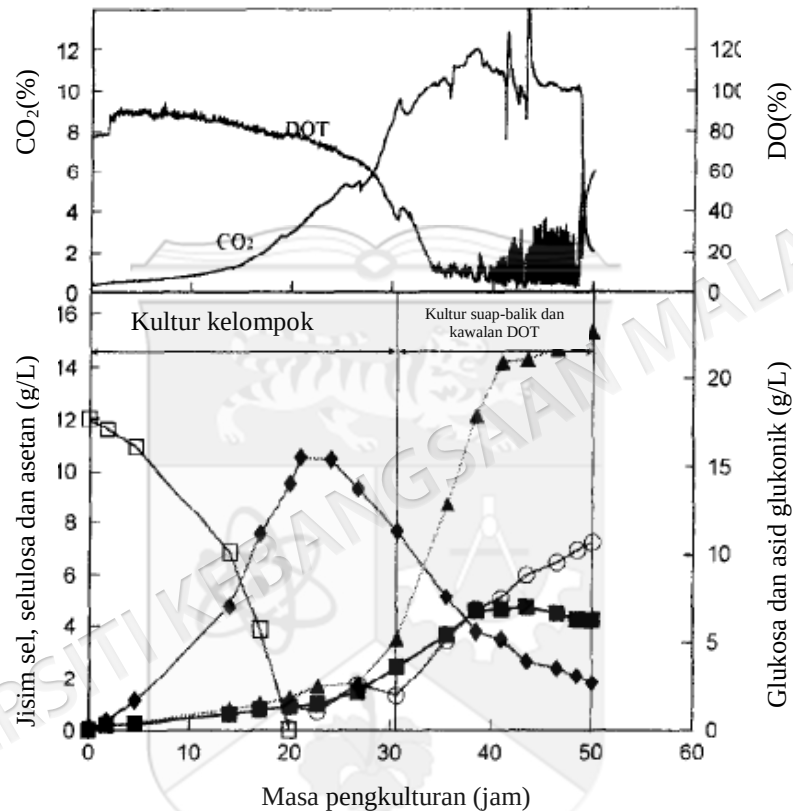
Jadual 2.3 Kesan tahap DO ke atas penghasilan selulosa dalam kultur suap-balik *A. xylinum* BRC5

Parameter	Tanpa kawalan	DO (% ketepuan)			
		2	7	10	15
Jisim sel akhir (g/L)	4.51	4.51	4.59	4.68	3.57
Kepekatan selulosa akhir (g/L)	10.7	10.2	14.56	15.3	14.5
Pekali yil (g-selulosa/g-glukosa)	0.178	0.170	0.24	0.26	0.24
Produktiviti selulosa keseluruhan (g/L.jam ⁻¹)	0.228	0.224	0.294	0.306	0.322

Sumber: Hwang et al. 1999

Rajah 2.4 mewakili keputusan apabila DO ditetapkan pada 10% ketepuan semasa kultur suap-balik. Pada peringkat permulaan pertumbuhan, hanya udara yang dibekalkan kepada fermenter. DO telah menurun secara berkala semasa pertumbuhan

sel dan pada awal fasa kultur suap-balik mencapai takat ketepuan udara 10%. Kemudian DO dibiarkan malar sepanjang pengkulturan dengan mengawal kadar alir oksigen secara 'on-off'. Telah dilaporkan bahawa penghasilan selulosa secara cepat telah diperhatikan sehingga masa 40 jam. Selepas itu, kepekatan selulosa telah meningkat dengan perlahan dan mencapai 15.3 g/L pada akhir kultur suap-balik iaitu pada $t=50$ jam.



Rajah 2.4 Profil penghasilan selulosa dalam kultur suap balik menggunakan medium CSL yang mengandungi 20 g/L glukosa. Sebagai tambahan, 40 g/L glukosa telah ditambahkan pada $2.22 \text{ g/L.jam}^{-1}$ dan kepekatan DO dikawal pada 10% ketepuan semasa kultur suap-balik. Simbol: segiempat tertutup, jisim sel; segitiga tertutup, selulosa; bulat tertutup, asetan; segiempat terbuka, glukosa; berlian tertutup, asid glukonik.

Sumber: Diolah daripada Hwang et al. 1999

2.5 PENUAIAN DAN PERAWATAN PELIKEL SELULOSA BAKTERIA

Satu model selangar penuaian selulosa telah direkabentuk dan dibina pada skala makmal menfokuskan kepada produktiviti selulosa. Dulang cetek telah digunakan untuk meminimumkan keperluan terhadap medium. Filamen selulosa bakteria telah dituai menggunakan pemutar pada kadar 35 mm/jam. Selepas 3 hari pertumbuhan secara statik, pelikel boleh diambil dan dikepilkan kepada mekanisma pemutar termasuklah melalukan filamen ke dalam satu pembersih yang mengandungi akuas sodium dodesil sulfat. Kebaikannya ialah selulosa boleh dituai secara selangar sekiranya medium segar ditambahkan setiap 12 jam (Sakairi et al. 1998). Pelikel yang diperolehi daripada kaldu kultur telah dirawat menggunakan 0.2 N larutan alkali sodium hidroksida (NaOH), dengan mendidihkannya secara berasingan selama 30 minit dan membilas sebanyak 4-5 kali dengan air suling sehingga pH air basuhan tersebut menjadi neutral. Bahan tersebut dikeringkan dalam ketuhar pada 50 °C di atas kertas penapis selama 10-12 jam.

Kaedah perawatan berupaya menentukan ketulenan selulosa bakteria yang dihasilkan daripada proses fermentasi. Untuk mengkaji kesan perawatan alkali ke atas selulosa bakteria, analisa ke atas berat bagi selulosa dengan perawatan dan tanpa rawatan perlu dilakukan. Perbezaan berat di antara selulosa kering natif dan selulosa kering dengan rawatan alkali telah dikira. Namun begitu semua membran selulosa yang digunakan hendaklah pada ketebalan yang sama iaitu (0.1 mm) dan disediakan daripada kelompok yang sama untuk memastikan keselarasannya (George et al. 2005). Kehilangan berat dengan rawatan alkali telah diperolehi sekitar 15-20%, yang mewakili kehilangan kandungan protein dan asid nukleik. Penganggaran protein dengan kaedah spektrofotometer dan Lowry telah menunjukkan bahawa membran selulosa natif mengandungi 14-18% protein dan 1-1.25% asid nukleik. Analisa lanjut bagi membran yang dirawat telah menunjukkan bahawa protein dan asid nukleik telah dapat dibuang sepenuhnya dengan rawatan alkali ini. Telah diketahui bahawa protein dan asid nukleik deoksiribo '*deoxyribo*' boleh mengalami hidrolisis dengan larutan alkali pada suhu didih dan telah menunjukkan bahawa rawatan kimia adalah berkesan untuk menghasilkan selulosa tulen.

Selulosa merupakan polimer yang banyak terdapat pada biojisim tumbuhan. Proses untuk memperkaya komponen selulosa biasanya menggunakan tenaga intensif dan pelarut toksik dan mengkakis. Untuk mengatasi masalah ini, selulosa bakteria dicadangkan sebagai pengganti yang sesuai bagi selulosa tumbuhan dalam industri berskala besar dan aplikasi berkualiti. Rawatan menggunakan alkali lemah dikenali menjadi satu kelebihan dalam penstabilan terma dan memperbaiki sifat-sifat mekanikal terma yang lain. Ini memungkinan untuk mengkaji kesan rawatan kimia ke atas suhu peralihan kaca '*glass transition*', suhu kristal mencair '*crystalline melting temperature*', pengkristalan pukal '*bulk crystallization*' dan suhu penguraian '*decomposition temperatures*'. Daripada data yang diperolehi dapat disimpulkan bahawa membran selulosa daripada perawatan alkali boleh diaplikasikan dalam penyelidikan asas sama seperti industri di mana kestabilan terma, sifat-sifat mekanikal dan struktur yang hebat menjadi satu keutamaan.

Jadual 2.4 menunjukkan langkah-langkah yang sering dilakukan dalam penuaian selulosa bakteria dari tahun 1995 hingga 2009. Prosedur asas yang terlibat ialah pertamanya rawatan dengan larutan alkali sodium hidroksida (NaOH) dari pelbagai kepekatan (0.1-0.5 M, 0.1-1 N, 0.1-4.0%). Langkah kedua ialah membilas dengan air suling, air nyah-ion dan air paip. Teknik bilasan berbeza-beza dengan dua atau tiga kali atau sehingga pH air bilasan menjadi neutral. Langkah terakhir ialah mengering dalam pelbagai suhu dari serendah 60 °C sehingga mencapai 121 °C. Di samping itu, langkah tambahan turut dilaporkan dari tahun ke tahun.

Jadual 2.4 Perbandingan proses penuaian selulosa bakteria dari 1995-2009

Tahun	Prosedur yang digunakan	Prosedur tambahan	Rujukan
1995-1999	1. Dirawat dengan NaOH (4%, 1 N, 0.1%, 1%, 0.1 N) 2. Basuh / bilas (ekstensif, air mengalir, 2-3 kali) 3. Keringkan (80 °C, 115 °C, < 60 °C)	♦ Rendam dalam larutan NaOCL untuk mengurai bendasing protein (Budhiono et al. 1999) ♦ Menggunakan asid asetik untuk meneutralkan alkali (Toda et al. 1997)	Sakairi et al. 1998, Toda et al. 1997, Budhiono et al. 1999, Yoshino et al. 1996, Kouda et al. 1997a, Hwang et al. 1999.

bersambung...

...sambungan

2000-2004	1. Dirawat dengan NaOH (2%, 1 N, 0.1%, 0.5 M, 0.1 N) 2. Basuh / bilas (air mengalir, 3 kali) 3. Keringkan (80 °C, 105 °C, 121 °C)	◆ Dineutralkan dengan H₂SO₄ cair (Thompson & Hamilton 2000) ◆ Menggunakan peluntur rumah sehingga putih sempurna - perlu direndam semalaman untuk mengeluarkan baki peluntur (Serafica et al. 2002)	Thompson & Hamilton 2000, Bae et al. 2004, Serafica et al. 2002.
2005-2009	1. Dirawat dengan NaOH (1 N, 0.5 N, 0.3 M, 1 M, 0.1 mol/L) 2. Basuh/bilas (air mengalir, 3 kali, sehingga pH neutral) 3. Keringkan (70 °C, 105 °C)	◆ Basuh dengan asid asetik selepas dirawat dengan NaOH (Seto et al. 2006) ◆ Menggunakan phosphorous pentoxide dan asid nitrik 90% dan selulosa bakteria dineutralkan dengan larutan sodium karbonat 5% dan direndam dalam alkohol (Choi et al. 2009) ◆ Rendam dalam air nyah-ion selama 48 jam (Gostomski & Schrecker 2005)	Choi et al. 2009, Hong & Qiu 2007, Seto et al. 2006, Setyawati et al. 2007, Suwannapinunt et al. 2007, Gostomski & Schrecker 2005, Jung et al. 2005.

2.6 SIFAT SELULOSA BAKTERIA

Selulosa bakteria yang dihasilkan oleh *A. xylinum* mempunyai sifat unik yang tidak ditemui dalam sumber konvensional seperti tumbuhan. Ia mempunyai ketulen yang tinggi, sifat hidrofilik yang tinggi, sintesis selulosa terbentuk secara terus, stabil dari segi perubahan bentuk dan dimensi membolehkan penyelidikan mencari aplikasi novel untuk biobahan yang baru ini. Selain itu, *A. xylinum* mampu mensintesis selulosa daripada pelbagai substrat, mengawal sifat fizikal selulosa secara langsung semasa penghasilannya dan meningkatkan utilitinya. Selulosa bakteria yang dihasilkan oleh *A. xylinum* adalah selulosa tulen, tanpa sebarang lignin atau bahan lain yang biasanya didapati bersama selulosa dari sumber lain. *A. xylinum* mensintesis riben berselirat, membentuk membran selulosa hidrofilik yang dikenali sebagai pelikel. Hampir semua biojisim sel boleh dibuang daripada pelikel dengan proses pembersihan ringkas menggunakan rawatan alkali. Apabila dibandingkan dengan penyingkiran lignin

daripada kayu, prosedur pembersihan yang ringkas ini memberikan lebih yil kepada produk akhir dengan ketulenan yang lebih tinggi berbanding proses pulpa yang dijalankan ke atas produk selulosa daripada tumbuhan.

Pelikel *Acetobacter* natif yang dalam keadaan lembap mempunyai sifat hidrofilik yang tinggi. Bergantung kepada keadaan sintesis, ia mempunyai kapasiti menyimpan air dalam julat 60 ke 700 kali berat keringnya. Pelikel selulosa yang dikultur secara statik mempunyai berat satu peratus sahaja di mana yang lainnya adalah air (Yamanaka & Watanabe 1994). Alasan untuk sifat ini adalah reben selulosa bercantum secara ekstraselular ke dalam medium cecair dan jaringan tersebut bertindak sebagai perangkap kepada cecair yang banyak. Biosintesis selulosa dalam keadaan hidrofilik adalah sangat penting untuk perawatan dan terbitannya. Cannon dan Anderson (1991) menyatakan bahawa terdapatnya struktur berbentuk liang dan terowong di antara pelikel. Keadaan ini menyebabkan agen pemprosesan atau pewarna dapat meresap dengan mudah. Sifat hidrofilik ini boleh dipertingkatkan dengan menambah bahan hidrofilik (Brown 1990 U.S. Paten 4,942,128) semasa atau selepas sintesis. Oleh kerana selulosa bakteria sangat panjang, reben yang berkait dalam pelikel hidrofilik dapat mengekalkan kelembapan yang tinggi.



Rajah 2.5 Mikrobial selulosa kering yang dibentuk seperti bentuk sarung tangan semasa biosintesis selulosa *in situ*

Sumber: White & Brown 1989

Roberts et al. (1989) melaporkan bahawa filem selulosa boleh dihasilkan dalam pelbagai bentuk mengikut acuan tertentu menggunakan membran telap udara. *A. xylinum* adalah aerobik tegar dan membentuk selulosa pada antara muka udara dan cecair dalam kultur statik. Permukaan yang bersebelah kepada membran bertindak sebagai permukaan antara udara dan cecair di mana sel boleh melekat antara satu sama lain dan membentuk selulosa. Penghasilan sebegini dikenali sebagai tekstil tenunan mikro '*microwoven*' yang menggunakan satu acuan fabrik tidak berjahit berbentuk sarung tangan yang dibentuk *in situ* oleh kultur *Acetobacter* aktif seperti dalam Rajah 2.5.

Jadual 2.5 Ringkasan sifat selulosa bakteria

Kelas Sifat	Perincian
Ketulen	- Hanya biopolimer selulosa yang disintesis - Tiada lignin dan hemiselulosa - Biodegradasi sempurna dan boleh dikitar semula sebagai sumber bahan baru
Kekuatan Mekanikal yang Tinggi	- Kristal selulosa I mempunyai kekuatan tinggi - Kestabilan dimensi yang konsisten - Kekuatan regangan yang tinggi - Ringan - Kekuatannya dapat bertahan lama
Penyerapan Luar Biasa dalam keadaan Lembap	- Keupayaan untuk memegang air - Keserapan yang selektif - Kekuatan lembap yang tinggi
Pengumpulan Membran secara Langsung semasa Biosintesis	- Langkah perantara bagi pembentukan kertas daripada pulpa yang tidak diperlukan - Langkah perantara bagi pengumpulan tekstil daripada benang yang tidak diperlukan - Sangat nipis, sub-mikro, boleh menghimpun membran jernih secara optikal
Orientasi Selulosa semasa Sintesis	- Pembentukan serat dinamik - Membran dikuatkan secara paksi tunggal
Pengubahsuaian secara Langsung Selulosa semasa Pengumpulan	- Melambatkan pengkristalan dengan menambahkan pencelup ke dalam kultur medium - Mengawal sifat fizikal selulosa semasa pengumpulan (berat molekul dan kristal)
Pengubahsuaian Genetik bagi Produk Selulosa	- Sintesis terbitan selulosa secara langsung seperti selulosa asetat dan karboksimetil selulosa - Mengawal kristal selulosa I atau selulosa II

Jadual 2.5 menjelaskan sifat utama selulosa bakteria serta perinciannya. Sifat fizikal produk selulosa dapat dikawal dan diubahsuai semasa proses sintesis. Melalui teknologi ini sifat khusus seperti hidrofilik (Brown 1989) dapat dibina dan komposisi kimia bagi serat selulosa (Shirai et al. 1994) dapat diketahui. Penambahan pewarna 'dye' dan selulosa karboksimetil semasa fermentasi boleh mengubah jenis selulosa yang dihasilkan seterusnya meningkatkan sifat produk (Haigler & Benziman 1982).

Produk selulosa bakteria beserta selulosa karboksimetil yang mempunyai kapasiti memegang air melebihi 1000 kali ganda telah berjaya dihasilkan (Brown 1990 U.S. Patent 4,942,128). Berpandukan kepada projek yang sama, telah dilaporkan bahawa hidrasi semula selulosa terubahsuai-CMC kepada hidrofilik asalnya adalah sempurna walaupun selepas beberapa kitaran pelembapan dan pengeringan. Kawalan keadaan kultur seperti ketumpatan sel, komposisi medium, rekabentuk reaktor, dan keadaan fizikal boleh membantu memanipulasikan kepejalan, kekuatan dan kelenturan bagi produk selulosa yang dihasilkan. Darjah pempolimeran dan pengkristalan bagi selulosa bakteria juga mampu dijana dengan pemahaman dan pengetahuan terhadap biosintesis selulosa bakteria.

2.7 APLIKASI SELULOSA BAKTERIA

Selulosa bakteria yang dihasilkan oleh spesis *Acetobacter* mempunyai sifat unik dan dijangkakan menjadi satu komoditi biokimia baru yang mempunyai aplikasi yang menyeluruh sekiranya proses penghasilan biojisim dapat dipertingkatkan sama ada secara teknologi fermentasi tenggelam atau statik. Untuk mendapatkan proses penghasilan selulosa bakteria yang ekonomi, amat perlu satu penyelidikan lanjut tentang asas genetik dan metabolik sintesis selulosa bakteria yang efisien, seperti pembinaan strain *Acetobacter* sama ada mutan atau rekombinan. Produktiviti selulosa bakteria dapat dipertingkatkan dengan penambahan kitosan larut air kepada medium Hestrin-Schramm dan penambahan dalam kuantiti yang sedikit endo-glukanase ke dalam kultur penghasil (Tonouchi et al. 1996). Oikawa et al. (1995a) menjelaskan bahawa penghasil selulosa, *A. xylinum* KU-1 menghasilkan bersama endo-glukanase dalam kaldu kultur penghasil selulosa.

Selulosa bakteria mempunyai julat aplikasi yang pelbagai berdasarkan kepada ketulenannya yang tinggi dan sifat kimia fiziknya yang istimewa. Ringkasan aplikasi selulosa bakteria dalam pelbagai bidang ditunjukkan dalam Jadual 2.6. Aplikasi pertama selulosa bakteria yang telah dikomersilkan dengan jayanya adalah produk makanan dari Filipina iaitu *Nata de coco*. Penjualan produk tersebut melebihi \$28 juta dicapai pada tahun 1993. Ia digunakan dengan meluas sebagai makanan pencuci mulut di Jepun. Aplikasi kepada makanan yang diproses seperti minuman coklat berkalori rendah, perasa adunan, dan ais krim telah diperluaskan (Okiyama et al. 1993b). Walaupun aplikasi selulosa bakteria dalam industri makanan amat luas, aplikasi di bidang bukan makanan yang lebih dominan.

Dalam dekad ini, penyelidik lebih memfokuskan kepada kelebihan yang boleh dieksploitasi daripada sifat unik selulosa bakteria. Akhirnya beberapa aplikasi industri di luar industri makanan telah dilaporkan. Produk paling laris dan telah dipasarkan adalah diafragma akustik untuk pembesar suara audio yang dibangunkan oleh Syarikat Sony, Jepun. Bahan selulosa bakteria yang diubahsuai selepas proses penghasilannya ini dikategorikan mempunyai halaju sonik tinggi dan kehilangan dalam tinggi menjadikannya sempurna untuk menjana bunyi yang lebih tinggi dan jelas (Yamanaka & Watanabe 1994). Diafragma pemindah arus akaustik ini digunakan kini dalam kebanyakan sistem pembesar suara dan fon kepala.

Kumpulan penyelidik yang sama juga menyatakan bahawa kedua-dua tekanan haba dan selulosa bakteria hancur boleh digunakan untuk menghasilkan produk kertas berkekuatan tinggi. Dengan menambahkan selulosa bakteria hancur ke dalam jaringan pulpa kapas bukan-fibril, kertas komposit telah diteguhkan dan lebih panjang bagi kepingan untuk pecah (Yamanaka & Watanabe 1994). Pulpa selulosa bakteria juga berguna sebagai agen pelekat penghasilan kertas daripada bahan serat yang lain (Yamanaka et al. 1989). Ia digunakan dalam penghasilan kepingan serat karbon teraktif untuk penyerapan gas toksik yang mengandungi lima peratus selulosa bakteria berbanding tiga puluh peratus pulpa berserat yang lain. Keupayaan selulosa bakteria sebagai pengikat yang baik diaplikasikan untuk menghasilkan kepingan daripada pelbagai serbuk seperti kalsium karbonat dan tembaga.

Jadual 2.6 Senarai produk yang boleh dihasilkan daripada selulosa bakteria

Industri	Produk
Makanan	• Pencuci mulut (nata de coco, kepingan aiskrim rendah kalori, makanan ringan, gula-gula) • Penebal (ais krim dan sos salad) • Asas penurunan berat • Asas untuk daging buatan • Pembalut daging dan sosej • Penurun kolestrol serum • Kombucha atau Manchurian
Penjagaan Kesihatan	• Alatan penjagaan luka • Agen penghantaran ubatan, sama ada oral atau dermal • Substrat kulit tiruan
Kosmetik dan Kecantikan	• Krim kulit • Astringen • Asas untuk kuku tiruan • Penebal dan penguat bagi pengilat kuku
Alam Sekitar	• Span pembersihan tumpahan minyak • Asas penyerapan bagi penyingkiran bahan toksik
Petroleum dan Perlombongan	• Pemulihan minyak dan mineral
Pakaian dan Kasut	• Produk kulit tiruan • Tekstil pakaian terus (<i>One piece</i>)
Sukan Luar Rumah	• Khemah pakai buang dan camping gear
Kemudahan Awam	• Penulenan air dengan membran penapisan ultra dan membran osmosis balikan
Produk Penjagaan Bayi dan Audio	• Lampin pakai buang guna semula • Diafragma pembesar suara audio bermutu
Produk Perhutanan	• Penguat kayu tiruan (papan lapis) • Pengisi (<i>filler</i>) untuk kertas • Bekas berkekuatan tinggi
Kertas ' <i>Specialty</i> '	• Membaiki dokumen arkib (sejarah) • Dasar kertas untuk mata wang tahan lama
Automotif dan Pesawat Udara	• Badan kereta • Elemen struktur kapal terbang • Bekas roket untuk misi angkasa lepas

Keupayaan selulosa bakteria untuk mengubah sifat hidrofilik dan mekanikal menyumbang aplikasinya di bidang perubatan. Perlekatan pelikel selulosa bakteria digunakan untuk menyembuhkan luka (Sorj & Wilkinson 1988). Dengan menukarkan air pada pelikel kepada larutan cecair yang diperlukan, pelapik mengandungi cecair berubat diperolehi. Kumpulan penyelidik dari Brazil melaporkan penggunaan selulosa bakteria sebagai penggantian kulit sementara dalam rawatan penyembuh luka, sebagai pengelap pembedahan, pelapik rawatan, pembalut terbakar dan penutup tisu atau organ (Fontana et al. 1990). Proses untuk menyediakan bentuk berongga partikel selulosa bakteria semasa pengkulturan telah dilaporkan (Geyer et al. 1994a; Yamanaka et al. 2000). Biobahan silinder seperti ini boleh digunakan sebagai pengganti kepada bahan perubatan seperti salur darah, salur limfatik, ureter dan trakea. Kelebihan menggunakan selulosa bakteria untuk aplikasi tersebut adalah kerana ia mempunyai kekuatan mekanikal yang tinggi semasa basah dan berupaya untuk melakukan degradasi dalam haiwan dan manusia. Juga telah dilaporkan keupayaan selulosa bakteria sebagai pembawa dalam kultur sel haiwan (Watanabe et al. 1993) dan sebagai pelekat bagi cantuman sel bahagian luar kulit.

Selulosa yang lembab boleh digunakan sebagai kulit tiruan sementara untuk merawat kulit melecur akibat terbakar (Fontana et al. 1990) kerana ia mempunyai kapasiti menyerapan yang tinggi (Okiyama et al. 1993b) serta dapat mempertingkatkan pertumbuhan sel kulit manusia. Penggunaan selulosa sebagai kulit sementara telah dipatenkan dan dikomersialkan sebagai BioFill®. Selulosa boleh menjadi membran akustik atau membran konduktif kerana pelikel selulosa kering mempunyai taburan serat yang sekata. Produk Biofill® digunakan sebagai pembalut untuk kes kebakaran darjah kedua dan ketiga serta ulser. Kelemahan utama produk ini adalah sifat elastik yang terhad apabila digunakan ke atas permukaan yang memerlukan pergerakan yang kuat. Kebaikannya termasuklah menghilangkan sakit dengan segera, melekat dengan kuat kepada tempat luka, menghilangkan ketidakselesaan selepas pembedahan dan mengurangkan kadar infeksi. Selulosa yang lutsinar menjadikan pemeriksaan ke atas luka lebih mudah apabila kulit baru dihasilkan dengan penggunaan Biofill®. Biofill®

berpotensi sebagai pemangkin ekonomi dengan mengurangkan kos dan masa rawatan (Fontana et al. 1990).

Penghasilan selulosa bakteria berskala besar iaitu *Cellulon@* telah dihasilkan oleh Syarikat Weyerhaeuser dan Syarikat Cetus di Amerika Syarikat. *Cellulon@* adalah agen pemukal yang digunakan dalam sektor perlombongan sebagai pencantum, penyelaput dan penstabil membran. Ia dijual pada harga \$6-\$10 per paun. Kegunaannya dalam ramuan makanan adalah sebagai penebal, pemberi tekstur dan penurun kalori (Okiyama et al. 1992).

Toda et al. (1997) menyatakan bahawa walaupun formula kimia selulosa bakteria menyamai selulosa tumbuhan, tetapi fibril selulosa bakteria mempunyai sifat fizikal yang unik. Diameter selulosa bakteria adalah 0.1 μm iaitu 1 per 100 berbanding serat tumbuhan. Ini menjadikan selulosa bakteria suatu bahan baru yang berpotensi untuk diaplikasi dalam penghasilan kertas kualiti (Johnson & Winslow 1990) dan pencampur cat (Cannon & Anderson 1991), membran penapis ultra (Takai et al. 1991), substrat untuk kultur sel mamalia (Watanabe et al. 1993) dan membran pelindung bagi pengesan glukosa (Ammon et al. 1995). Aplikasi selulosa bakteria sebagai immobilisasi mikroorganisma telah dijelaskan oleh Fiedler et al. (1989). Syarikat Penyelidikan Biopolimer Berhad, Jepun telah menyediakan teknologi perindustrian penghasilan biopolimer yang memfokuskan kepada bakteria '*Bio-Cellulose*'. Kebaikan polimer dari sumber mikrob telah diulas oleh beberapa pengarang (Vandamme et al. 1998).

Kumpulan ahli kimia, biologi dan pakar bedah telah membangunkan satu produk yang dinamakan BASYC® '*Bacterial Synthesised Cellulose*'. BASYC® adalah satu tiub statik yang digunakan untuk menggantikan salur darah. Tiub tersebut mempunyai diameter dalam, 1 mm dan panjang, 5 mm dihasilkan untuk menggantikan salur darah. Kebaikannya ialah permukaan dalam tiub BASYC® adalah lebih lembut berbanding tiub yang diperbuat daripada bahan sintetik lain untuk tujuan yang sama. Pengujian telah dilakukan ke atas produk dengan berfungsi sebagai endo-prostesis bagi tikus putih. Kajian ini menunjukkan bahawa tiub mikro ini telah diseliputi dengan sel

endogenus dan berorientasi dengan sempurna, mengandung dinding vaskular yang terbentuk di dalam dinding selulosa tersebut (Klemm et al. 2001).

Penyelidik juga telah menemui kesesuaian menggunakan filem selulosa bakteria sebagai membran untuk proses pemisahan (Shibazaki et al.1993; Takai 1994; Ammon et al. 1995). Selulosa bakteria sebagai membran pemisah telah digunakan dengan jayanya dalam meningkatkan kestabilan jangka panjang bagi pengesan glukosa amperometrik (Ammon et al. 1995). Selulosa bakteria mampu mengesan dalam masa melebihi 200 jam untuk darah yang dicairkan dan stabil selama 24 jam dalam darah tanpa pencairan. Kajian ini menyimpulkan bahawa kegunaan membran selulosa bakteria untuk menutup pengesan glukosa amperometrik boleh meningkatkan kestabilan pengesan yang ketara dalam *in vitro* dan *in vivo* untuk jangka panjang. Penggunaan polimer boleh larut dalam air semasa penyediaan membran komposit selulosa bakteria telah dijelaskan oleh Takai (1994). Pelbagai aditif seperti CMC, PEG dan terbitan selulosa yang lain telah disatukan ke dalam filem membran yang disintesis oleh *A. xylinum*. Telah ditunjukkan bahawa stuktur dan saiz liang membran komposit boleh dikawal dengan menambahkan polimer yang larut dalam air.

Kejayaan aplikasi komersil ini bergantung kepada kos penghasilan yang rendah dan sifat membran selulosa yang berkualiti. Penentuan masa depan ekonomi industri selulosa bakteria bergantung kepada pembaikan rekabentuk bioreaktor dan penghasilannya, skala yang lebih ekonomi, harga substrat bahan mentah dan buruh serta aplikasi produk berpotensi.

2.8 PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA DI PERINGKAT INDUSTRI

Penghasilan selulosa bakteria berskala besar dan penyelidikannya telah dimulakan sejak 20 tahun yang lalu. Selain pengkulturan statik yang digunakan dalam penghasilan *nata* di Filipina, terdapat tiga lagi proses fermentasi lain yang diwakili oleh satu penerbitan dan dua paten. Penerbitan tersebut melibatkan penggunaan proses fermentasi dua peringkat untuk penghasilan pelikel selulosa bakteria oleh *A. aceti* yang dibangunkan oleh Ajinomoto (Okiyama et al. 1992). Penyelidik mencadangkan penggunaan kombinasi fermenter angkut udara yang berfungsi sebagai

penyebaran sel, diikuti dengan dulang kultur statik untuk penghasilan pelikel selulosa bakteria. Paten pertama adalah proses yang dibangunkan oleh Weyerhaeuser dan Cetus Corporation iaitu penggunaan sistem tangki dalam berpengaduk untuk menghasilkan jaringan selulosa bakteria dalam kaldu dua puluh peratus pepejal (Brown 1988 U.S. Patent 4,863,565). Sekurang-kurangnya 0.1 g/L.jam^{-1} produktiviti telah dicapai untuk penghasilan melebihi 70 jam dengan memilih strain *Acetobacter* yang stabil untuk kultur bergoncang. Proses ini digunakan dalam penghasilan komersil selulosa bakteria jenama *Cellulon@*. Paten kedua adalah proses daripada Imperial Chemical Industry (ICI) iaitu penggunaan fermentasi empat peringkat untuk aplikasi sebagai agen pemukal atau pembantu pentabletan. Produk terhasil berbentuk bukan pelikel dan reaktor berpengaduk kelompok yang digunakan adalah sama seperti proses paten pertama. Ketiga-tiga proses termasuk penghasilan *Nata de coco* secara komersil diringkaskan dalam Jadual 2.7.

Jadual 2.7 Penghasilan SB di peringkat industri

Nama Proses	Keterangan Proses
Proses <i>Nata de Coco</i>	Bahan mentah: Air kelapa daripada perusahaan kopra telah digunakan di makmal mikrobiologi Syarikat Kelapa Kebangsaan dalam mencari medium yang lebih sesuai untuk <i>nata</i> inokulum (<i>A. xylinum</i>). (Lapas et al. 1967). Formulasi medium: (dalam peratus berat) 5-6% sukrosa yang dibekalkan oleh gula tebu, 3% santan kelapa daripada kelapa yang diparut, 1.9% asid asetik glasial, 70% air dan 15-20% inokulum yang ditumbuhkan dalam medium yang sama komposisinya. Perincian proses: • Campuran medium secara bukan aseptik dalam satu dram plastik berisipadu 200L dan medium penghasilan dipindahkan ke dalam dulang polikarbonat. • Dulang tersebut disusun bertingkat sehingga 20 lapisan yang dipisahkan oleh kepingan kadbod antara satu sama lain dan ditempatkan dalam bilik inkubator dengan mentol lampu untuk pengawalan suhu terutama di waktu malam. • Sebahagian medium fermentasi diasingkan untuk dijadikan inokulum bagi operasi yang seterusnya. • Fermentasi statik selama 10-14 hari. Pelikel tersebut dibersihkan dan direndam dalam air untuk membuang baki asid asetik dan dipotong dalam bentuk kiub sebelum direbus di dalam air untuk membunuh sel yang terdapat dalam SB tersebut. Gula, pewarna dan perasa tiruan ditambah dan dibiarkan sehati dengan pelikel yang telah ditapis. <i>Nata</i> kemudiannya dididihkan sekali lagi dalam

larutan gula sebelum dipekkan di dalam balang.

bersambung...

...sambungan

- 5000 unit dulang segi empat yang setiap satunya berisipadu 1.2L medium merupakan fasiliti tipikal yang diperlukan untuk memproses 10 tan SB mentah (1% selulosa) setiap bulan.

Limitasi:

Memerlukan bekalan buruh yang intensif dan agak sukar menghasilkan produk yang konsisten kerana keadaan yang tidak aseptik. Produk sesuai digunakan untuk penebal makanan dan agen pengikat.

Proses
Ajinomoto

Perincian proses:

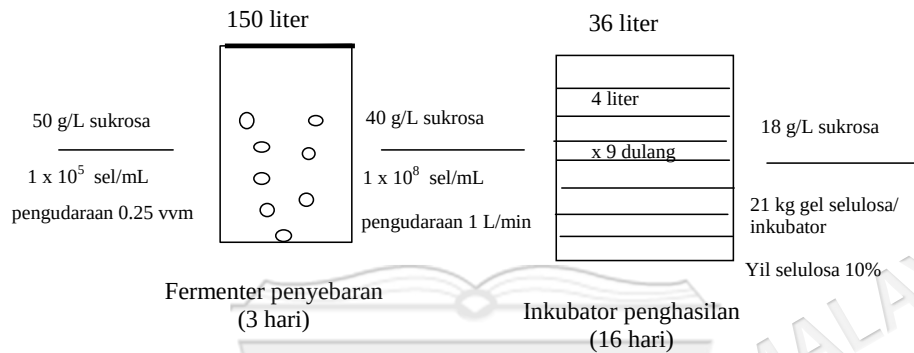
- Melibatkan fermentasi dua peringkat menggunakan strain *A. aceti* dan sukrosa sebagai sumber karbon seperti yang dilaporkan oleh penyelidik syarikat Ajinomoto (Okiyama et al. 1992).
- Peringkat pertama menggunakan bioreaktor angkut udara berpengaduk untuk menyebarkan sel pada ketumpatan tinggi.
- Kaldu fermentasi yang mengandungi sel dipindahkan ke dulang inkubator menyamai proses penghasilan *Nata de Coco*. Kultur dulang diudarakan permukaannya dan menghasilkan SB yang homogen.
- Penambahbaikan kepada proses *nata* konvensional. Rajah skematik bagi proses ini ditunjukkan dalam Rajah 2.6.
- Dengan memantau ketumpatan sel dan tahap ATP dalam peringkat angkut udara, ketumpatan sel paling tinggi, kandungan ATP dan keupayaan menghasilkan pelikel bagi kaldu fermentasi berlaku pada hari ketiga pengkulturan, selepas ketumpatan sel berada pada 2×10^7 sel/mL.
- Medium fermentasi kemudiannya dikulturkan secara statik dalam dulang inkubator.
- Pembentukan pelikel bagi kultur yang diudarakan awal ini bertambah sehingga 140% jika dibandingkan dengan kultur statik biasa.

Penambahbaikan:

Penghasilan SB telah dipertingkatkan dengan mengudarakan permukaan dulang inkubator. Masa pemprosesan keseluruhan adalah 19 hari dan $Y_{P/S}$ berasaskan kepada sukrosa awal, $Y_{P/S} = 10\%$.

bersambung...

...sambungan



Rajah 2.6 Proses fermentasi dua peringkat untuk penghasilan selulosa oleh A. Aceti

Sumber: Diolah daripada Okiyama et al. 1992

Proses
Weyerhaeuser

Fermentasi paling ekstensif bagi penghasilan SB berskala besar di Amerika Syarikat oleh penyelidik daripada Weyerhaeuser dan Cetus Corporation. Perincian tentang kerja mereka telah diterbitkan dalam siri paten (Brown 1988 U.S. Paten 4,863,565).

Perincian proses:

- Untuk menghasilkan serat yang dianggarkan 1/300 daripada saiz serat pulpa kayu lembut.
- Strain *A. xylinum* dipencilkan untuk mengurangkan kandungan produk sampingan, asid glukonik yang merendahkan pH medium.
- Proses penghasilan dilakukan dalam fermentar bersaiz 50 000 gellen dengan dua meter penapis penekan bertali digunakan untuk pemulihan produk.
- Produk daripada bioreaktor berpengaduk ini adalah ampaian pekat yang dinamakan *Cellulon*. Ia mempunyai lebih 200 kali ganda luas permukaan berbanding serat pulpa kayu lembut menjadikannya berguna untuk perlekatan, penebalan dan penyelaput pada kepekatan yang rendah.

Proses Imperial
Chemical Indusry
(ICI)

- Strain yang digunakan ialah *Acetobacter* ATCC 23769 dan sumber karbon glukosa untuk pertumbuhan dan penghasilan selulosa. Proses ini dibangunkan oleh ICI di England melibatkan 4 peringkat.

Pertama: Peringkat pertumbuhan di mana strain bakteri dikulturkan dalam reaktor tangki pengaduk sehingga sumber karbon habis.

...sambungan

bersambung...

Kedua: Peringkat pengumpulan di mana sumber karbon dibekal secara berterusan dan mencukupi bagi membolehkan SB bertambah.

Ketiga: Peringkat penyingkiran iaitu kaldu fermentasi yang mengandungi sel bakteri dan selulosa disingkirkan daripada reaktor

Keempat: Peringkat pemisahan di mana selulosa bakteri dipisahkan daripada sel.

- Kaedah tipikal untuk penyingkiran sel ialah merawat dengan natrium hidroksida (NaOH) pada kepekatan di antara 0.1-5%.
- Rawatan lanjut dan penerbitan kimia bagi produk selulosa bakteri bergantung kepada aplikasinya.
- Akhirnya, SB bukan pelikel sedia digunakan sebagai agen pemukul makanan dan pembantu pentabletan (Serafica 1997, Serafica et al. 2002).
- Peringkat pertumbuhan dan pengumpulan boleh dilakukan dalam satu fermenter atau berasingan bergantung kepada kadar penghasilan yang dikehendaki.
- Teknik pengadukan adalah secara mekanikal atau angkut-udara.

Komposisi medium : Medium Schramm & Hestrin (Schramm & Hestrin 1954a); 0.5% baktepepton, 0.5% ekstrak yis, 0.27% sodium fosfat monobasik dan 0.115% asid sitrik, dicampurkan dengan sumber karbon. Kepekatan gula berubah-ubah daripada 0.2-2% untuk peringkat pertumbuhan dan 0.1-1.0% untuk peringkat pengumpulan selulosa.

Parameter operasi: pH 5 dan suhu 28 °C.

Morfologi: SB berbentuk gumpalan diperolehi semasa peringkat pengumpulan dan ditapis daripada medium fermentasi.

2.9 PENCIRIAN SELULOSA BAKTERIA (SB)

2.9.1 Morfologi

Hult et al. (2003) melaporkan bahawa mikro fibril selulosa merupakan komponen utama bagi dinding sel tumbuhan dan merupakan satu gumpalan molekul selulosa dalam pelbagai urutan. Bahan selulosa dan kristal selulosa yang tinggi telah ditemui dalam alga marin hijau seperti *Siphonocladales*. Secara amnya, tumbuhan menjana mikro fibril yang nipis dengan kristaliniti selulosa yang rendah. Mikro fibril biasanya berkait rapat dengan hemiselulosa. Terdapat dua mekanisme untuk memadatkan molekul dalam kekisi kristal bagi selulosa natif iaitu selulosa I_α dan I_β (Atalla & VanderHart 1984; Sugiyama et al. 1990; Sugiyama et al. 1991).

Semua fibril selulosa natif diiktiraf sebagai campuran dua fasa kristal dan peratusan keduanya adalah bergantung kepada spesis (Koyama et al. 1997). Pengeraman spesis *Acetobacter* dalam hemiselulosa menyebabkan molekul selulosa menjadi kristal atau bercantum menjadi beberapa gumpalan kecil. Perubahan ini disebabkan oleh perubahan kristalografi yang menjadikan selulosa I_β lebih dominan (Atalla et al. 1993; Tokoh et al. 1998). Pengeraman spesis *Acetobacter* dalam medium likat (Shibazaki et al. 1998) atau pada suhu rendah (Hirai et al. 1997) menghasilkan pembentukan selulosa II.

Colvin dan Leppard (1977) menjelaskan sintesis pelikel selulosa bakteria yang berbeza daripada mekanisme pemintalan serat. Proses ini boleh berlaku tanpa enzim dan melibatkan molekul. *A. xylinum* telah ditumbuhkan dalam kultur statik dan setelah selulosa terbentuk, ia dikeluarkan daripada medium secara berhati-hati dan dibilas menggunakan air suling sebanyak tiga kali. Pelikel kemudiannya dianginkan di atas kekisi mikroskop elektron. Tiada sebarang koyakan mekanikal, terikan, sebaran ultrasonik, rendaman, rawatan kimia atau pemeruapan logam yang digunakan. Daripada pemerhatian didapati bahawa komponen pelikel selulosa merupakan jaringan cabang yang berhubungan antara satu sama lain dalam tiga dimensi dengan jarak lebar dari 10-50 nm. Fibril mikro membesar atau bercabang secara berulang-ulang, menghasilkan beberapa elemen yang terpisah dari titik yang sama. Pembesaran atau cabang biasanya membentuk poligon. Mekanisma pemintalan serat bagi pembentukan fibril mikro sub-unit hanya boleh membentuk bebenang satu dimensi. Morfologi yang berjaringan boleh dijelaskan oleh hipotesis pengkristalan. Semasa proses tersebut,

cabang tersebut meluas, membahagi atau melekat dengan fibril disebabkan oleh daya rantaian.

2.9.2 Analisis Mekanikal Dinamik (DMA)

DMA adalah nama umum yang diberikan kepada peralatan yang mengubah sampel secara mekanikal (tegangan) dan mengira tindakbalas sampel tersebut (terikan). Tindakbalas kepada perubahan tersebut boleh dipantau terhadap fungsi masa atau suhu. Dalam keadaan bebanan dinamik berfrekuensi tinggi, bahan plastik dikategorikan sebagai modulus dinamik kompleks, E^* . E^* pula terdiri daripada dua komponen yang dinamakan sebagai ‘benar’ dan ‘khayalan’ (Birley et al. 1992). Komponen ‘benar’ ialah modulus penyimpanan, ‘*storage modulus*’ (E') iaitu mewakili tenaga elastik yang tersimpan di dalam bahan. Komponen ‘khayalan’ ialah modulus kehilangan, ‘*loss modulus*’ (E'') adalah kesan daripada penyingkiran likat, ‘*viscous dissipation*’ semasa regangan. $\tan \delta$ pula menerangkan kaitan penyingkiran likat bagi bahan pada suhu dan frekuensi pengujian yang dijalankan. Data dinamik tersebut boleh dikaitkan dengan pergerakan struktur dan molekul dalam bahan plastik.

Modulus dinamik kompleks bagi natif dan membran selulosa bakteria yang dirawat telah diplotkan melawan suhu (George et al. 2005). Peningkatan modulus dinamik disebabkan oleh penyingkiran bendasing daripada membran oleh rawatan alkali. Satu penelitian menarik ialah kebanyakan modulus dinamik kompleks adalah tetap sepanjang julat suhu 30-275 °C. Ini mengandaikan terdapatnya satu perintang bagi sifat mekanikal walaupun pada suhu yang tinggi. Ini terjadi kerana tiada faktor kerehatan dalam rantaian amorfus, disebabkan oleh sifat pengkristalan yang tinggi bagi selulosa bakteria. Modulus penyimpanan bagi membran berkurang dengan turutan berikut: selulosa natif > rawatan K_2CO_3 > rawatan Na_2CO_3 > rawatan KOH > rawatan NaOH. Selepas rawatan kimia, modulus kehilangan dan $\tan \delta$ adalah rendah, menunjukkan komponen likat yang bertanggungjawab terhadap sifat visko-elastik polimer adalah sedikit bagi selulosa bakteria.

Brown & Marie-Pierre (2007) telah menjalankan analisis terhadap sampel dalam mod regangan '*tension mode*' menggunakan Rheometrics RSA II dan perlakuan mekanikal malar komposit nano dikaji dalam keadaan bebanan dinamik. Modulus penyimpanan bagi kedua-dua PEO tulen dan komposit nano SB/PEO berkurang dari -70 °C ke 60 °C tanpa nilai T_g yang ketara. Komposit nano yang mempunyai kandungan selulosa bakteria yang tinggi mempunyai modulus sub-embien yang tinggi walaupun dalam perbezaan kuantiti yang kecil. Takat cair bagi PEO adalah sekitar 60 °C, dan kejatuhan dramatik bagi E' yang dikesan pada PEO kawalan telah berkurang dengan ketara oleh peneguhan selulosa bakteria.

Kejatuhan modulus berkurang dengan peningkatan kandungan selulosa bakteria (SB) dalam komposit nano. Pada nisbah SB/PEO 59:41, tiada kejatuhan bagi E' pada takat cair PEO. Jelas sekali bahawa SB memberi kesan kepada kestabilan terma bagi modulus PEO matriks pada suhu melebihi takat cairnya. Perlakuan yang sama telah ditemui dalam komposit nano kepingan tunicin/PEO dan telah diterangkan sebagai pembentukan jaringan penapisan kristal nano SB yang teguh (Schroers et al. 2004; Azizi et al. 2005). Nisbah aspek yang tinggi, SB (1000) berbanding kristal nano tunicin (70) boleh menerangkan lebih lanjut kesan peneguhan hebat dalam komposit nano SB/PEO walaupun mungkin wujud sumbangan daripada sel bakteria. Pengurangan dalam indeks pengkristalan dalam komposit nano yang mempunyai kandungan SB yang tinggi juga menyumbang kepada kestabilan ini (Brown & Marie-Pierre 2007).

Iguchi et al. (2000) melaporkan tentang sifat dinamik filem visko elastik terhadap suhu (Yano et al. 1998). Modulus dinamik, E' berkurang secara perlahan dari 15 kepada 9 GPa dengan peningkatan suhu. $\tan \delta$ menunjukkan nilai maksimum pada 50 °C dan 230 °C, masing-masing merujuk kepada suhu penyaherapan air dan degradasi selulosa.

2.9.3 Kalorimetri Pengimbas Pembezaan (DSC)

DSC digunakan untuk menganalisis T_g dan kinetik pengkristalan pukal bagi pencirian terma molekul makro. Nilai T_g bagi molekul makro yang tinggi kristal seperti selulosa adalah sukar untuk ditentukan menggunakan kaedah ini kerana wujudnya lengkok aliran yang lebar dan mendatar di mana berbezaan jarak daripada garis dasar adalah amat kurang. Untuk memperbaiki masalah ini, kuantiti sampel lebih besar (>10 mg) diperlukan untuk analisis. Baranov et al. (2002) melaporkan nilai T_g bagi selulosa daripada *A. xylinum* adalah -13 °C, dianalisis menggunakan spektra dwi elektrik di atas filem nipis. George et al. (2005) melaporkan kajian ke atas selulosa bakteria menggunakan medium oleh Watanabe & Yamanaka (1995). Fermentasi dilakukan dalam kelalang kon dua liter dan dituai selepas dua minggu. Analisis DSC menyatakan nilai T_g selulosa natif adalah 13.94 °C. Namun begitu nilai tersebut meningkat kepada 41.41 °C selepas rawatan alkali sodium hidroksida (NaOH) 0.2 N dilakukan ke atas selulosa tersebut. Peningkatan T_g disebabkan oleh perubahan pergerakan molekul fibril selulosa selepas rawatan kimia.

Lengkok aliran haba membran selulosa natif menunjukkan puncak endotermik pada 120.47 °C, iaitu suhu kristal mencair bagi polimer. Nilai ini menjadi kurang setelah rawatan kimia dilakukan ke atas selulosa tersebut. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh perubahan yang berlaku pada fasa kristal selepas rawatan kimia. Puncak tambahan juga diperolehi daripada selulosa natif iaitu pada 155.37 °C, yang menunjukkan pencairan dan penguraian bahan protein dan sampingan yang terdapat padanya. George et al. (2005) juga menyatakan bahawa selepas rawatan kimia, hanya wujud satu puncak pertama sahaja sementara puncak kedua telah hilang membuktikan bahawa rawatan kimia sangat efektif untuk menyingkirkan bahan sampingan. Pada suhu lebih tinggi (>300 °C), satu puncak eksotermik dikenalpasti diikuti dengan penguraian bahan selulosik. Bagi selulosa natif, puncak eksotermik dilihat pada 298.07 °C, sementara bagi selulosa rawatan kimia sodium hidroksida (NaOH) memberikan nilai 343.27 °C (George et al. 2005).

2.9.4 Pembelauan Sinar-X (XRD)

Bansal et al. (2010) melaporkan bahawa kristal dan kekisi terbentuk disebabkan oleh ikatan hidrogen antara rantaian selulosa dan daya van der Waals antara molekul

glukosa. Darjah pengkristalan adalah pecahan kandungan kristal bagi sampel yang diukur. Teknik-teknik yang digunakan untuk mengira darjah pengkristalan bagi selulosa termasuklah pembelauan sinar-X, ^{13}C NMR dalam keadaan pepejal, pengiraan ketumpatan (Krassig 1993) dan spektroskopi FT Raman (Schenzel et al. 2005). Segal et al. (1959) mengira darjah pengkristalan dengan mengira bahagian amorfus dan kristal bagi selulosa I dengan membandingkan intensiti minimum pada $2\theta=18^\circ$ (I_{am}), dan intensiti maksimum pada $2\theta=22.5^\circ$ (I_{200}).

Kim et al. (2010) menyatakan bahawa dimensi bagi fibril mikro kristal bergantung kepada dari mana selulosa tersebut berasal (Wada et al. 1997) dan hanya permukaan fibril mikro yang boleh diukur sebagai bahagian amorfus (Wickholm et al. 1998). Selulosa I_α dan I_β terjadi secara semulajadi, di mana I_α jarang ditemui berbanding I_β yang menjadi bentuk utama berasal daripada tumbuhan peringkat tinggi. Masahisa et al. (2003) menyatakan bahawa fasa-fasa kristal dikenali sebagai I_α dan I_β . Selepas itu struktur selulosa I_α dan I_β diwakili masing-masing oleh sistem triklinik dan monoklinik (Sugiyama et al. 1991). Sistem kristal dua fasa telah dikaji secara ekstensif dalam kajian fisiokimia, biologi dan kristalografik (Atalla 1999a; Atalla 1999b). Secara fisiokimia fasa I_α berubah kepada I_β oleh rawatan hidrotermal menggunakan larutan alkali (Horii et al. 1987). Kajian membuktikan bahawa fasa I_β adalah lebih stabil secara termodinamik berbanding fasa I_α . Debzi et al. (1991) melaporkan bahawa fasa I_α boleh bertukar kepada fasa I_β dengan mudah dalam atmosfera gas helium.

Karla et al. (2005) menyatakan bahawa biopolimer selulosa terdiri daripada bahagian tersusun iaitu kristal dan tidak tersusun iaitu amorfus. Domain kristal bagi selulosa natif adalah komposit bagi dua kristal iaitu I_α dan I_β (Atalla & VanderHart 1984). Pembahagian dua jenis kekisi ini bergantung kepada di mana selulosa itu berasal dan berbeza antara satu dengan yang lain (Atalla & Vandertart 1984; Atalla 1989). Dua bentuk pengkelasan I_α atau I_β adalah komponen utama kristal. Sifat fisiokimia polimer dipengaruhi oleh darjah pengkristalannya. Sebagai contoh, pengkristalan selulosa mempengaruhi keupayaan sebagai terbitan kimia, pembengkakan 'swelling' dan sifat ikatan air. Oleh itu, darjah pengkristalan adalah

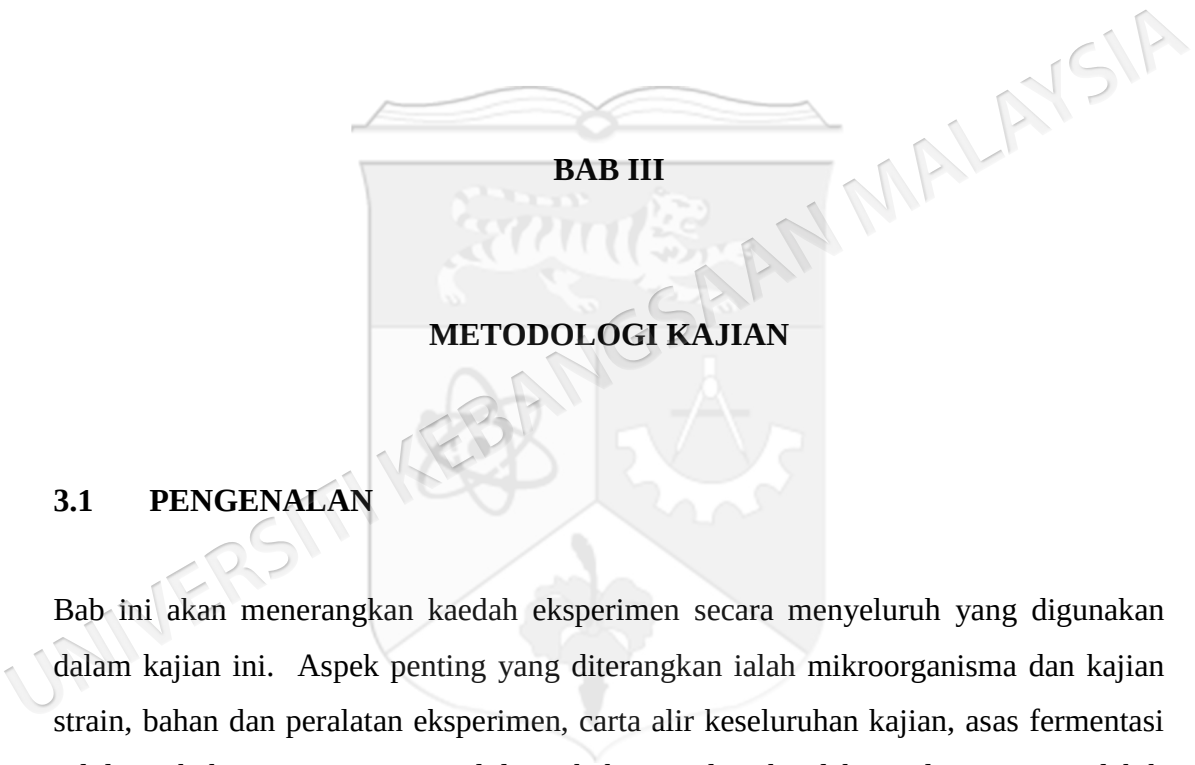
sifat yang sangat penting yang perlu diberi penekanan dalam penghasilan dan aplikasi selulosa dan bahan selulosik.

Kong & Hay (2002) menyatakan bahawa darjah pengkristalan adalah satu-satunya ciri paling penting bagi polimer bagi menentukan sifat mekanikal seperti tekanan yil, modulus elastik dan halangan hentaman (Sperling 1992). Sebagai contoh, amorfus polietilena teraftalat (PET) mempunyai nilai komersial yang rendah kerana ia mempunyai sifat mekanikal yang lemah, kestabilan dimensi yang rendah dan kadar ketelapan gas yang tinggi, manakala kristal PET mempunyai kekuatan yang tinggi, kestabilan dimensi dan halangan kimia yang baik. Ia digunakan dengan meluas dalam penghasilan fiber dan bekas minuman berkarbonat kerana kekuatan bahan yang tinggi, ketelapan gas yang rendah terutama kepada karbon dioksida dan oksigen. Darjah pengkristalan sesuatu polimer adalah dipengaruhi oleh suhu (Mathot 1994).

Sinar-X adalah radiasi elektromagnet dengan panjang gelombang menyamai 1 Å (10^{-10} m) iaitu sama saiz dengan satu atom. Ia berlaku pada bahagian spektrum elektromagnet di antara sinar gamma dan ultra ungu. Pembelaan sinar-X digunakan untuk mengetahui ciri-ciri bahan kristal dan mengenalpasti strukturnya dengan menentukan saiz dan bentuk satu unit sel. Kristal terdiri daripada atom-atom yang disusun berperingkat dalam satu paten tiga dimensi (Cullity 1956). Setiap pepejal kristal mempunyai paten unik tersendiri sebagai penciriannya. Pembelaan sinar-X adalah salah satu peralatan penting pencirian yang digunakan dalam kimia peringkat pepejal dan sains bahan. Pembelaan XRD serbuk dikenalpasti sebagai teknik yang paling luas digunakan dalam pembelaan sinar-X untuk pencirian bahan. Sampel mestilah dalam bentuk serbuk yang terdiri daripada partikel halus bahan kristal yang hendak dikaji. Serbuk sebenarnya bermaksud domain kristal bertebaran secara rawak dalam sampel. Apabila paten pembelaan dua dimensi direkodkan, ia menunjukkan lingkaran sepusat bagi penyerakan puncak yang mewakili pelbagai jarak- d bagi kekisi kristal. Posisi dan intensiti puncak digunakan untuk mengenalpasti struktur dasar (atau fasa) bagi bahan. Pengenalpastian fasa adalah penting kerana sifat-sifat bahan adalah amat bergantung kepada struktur (Cullity 1956).

Selulosa I adalah komposit bagi dua kristal terubahsuai, I_α dan I_β . Struktur selulosa I_α dilabel sebagai sistem triklinik dan I_β sebagai sistem monoklinik (Wada et al. 2001). Sampel selulosa boleh dikategorikan kepada dua iaitu jenis alga-bakteria dan jenis kapas-rami. Analisis diskriminasi '*discriminant*' menggunakan data jarak- d daripada penyerakan sinar-X adalah kaedah yang mudah dan objektif dalam menentukan jenis selulosa tersebut (Wada et al. 1993; Wada et al. 1994; Wada et al. 1995). Walau bagaimanapun, kebanyakan rujukan sebelum ini menjurus kepada selulosa sintetik dan umum berbanding SB. Kajian perbandingan bagi SB yang dihasilkan daripada formulasi medium berbeza tidak pernah dilaporkan sebelum ini. Kepentingan kajian pencirian bahan SB adalah untuk meningkatkan keupayaannya untuk aplikasi spesifik.





BAB III

METODOLOGI KAJIAN

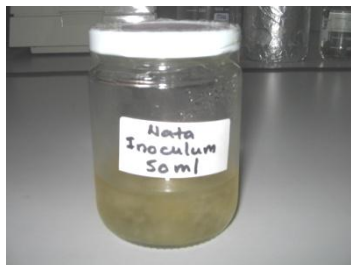
3.1 PENGENALAN

Bab ini akan menerangkan kaedah eksperimen secara menyeluruh yang digunakan dalam kajian ini. Aspek penting yang diterangkan ialah mikroorganisma dan kajian strain, bahan dan peralatan eksperimen, carta alir keseluruhan kajian, asas fermentasi selulosa bakteria, penuaian selulosa bakteria dan kaedah analisis secara lebih terperinci.

3.2 MIKROORGANISMA

Mikroorganisma untuk kajian ini adalah *Acetobacter xylinum* 0416 atau dikenali sebagai inokulum nata. Strain ini diperolehi daripada Institut Pembangunan dan Penyelidikan Pertanian Malaysia (MARDI). Penyelenggaraan strain *A. xylinum* turut dijalankan oleh MARDI untuk menjamin viabiliti mikroorganisma yang digunakan

sepanjang kajian ini. Strain yang digunakan adalah dalam bentuk larutan inokulum yang dibotolkan bersaiz 50 mL dan 100 mL.



Rajah 3.1 Strain *Acetobacter xylinum* atau inokulum nata

Kajian strain merupakan asas utama dalam penentuan sifat dan morfologi bakteria di peringkat sel. Kepentingan kajian strain untuk eksperimen ini adalah kerana terhadnya maklumat berkaitan strain yang diperolehi daripada MARDI. Keputusan kajian ini turut dibandingkan dengan kajian oleh penyelidik terdahulu daripada rujukan berkaitan. Skop kajian ini merangkumi pengenaltastian awal bakteria iaitu pencirian morfologi bagi koloni, pewarnaan gram dan morfologi strain peringkat sel.

3.2.1 Penyediaan Medium Agar

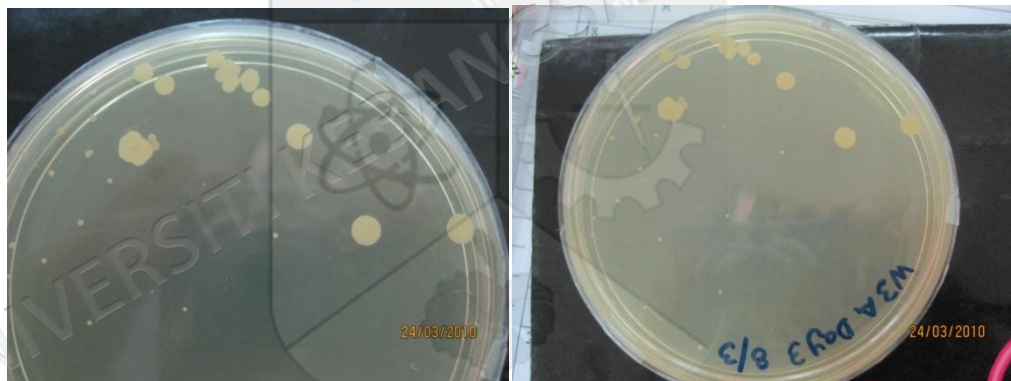
Medium agar disediakan mengikut komposisi dalam Jadual 3.1. Selepas proses pensterilan, medium yang masih cair dituangkan ke dalam piring petri dan dibiarkan membeku pada suhu bilik. Sebanyak 0.5 mL kultur bakteria yang telah aktif dipipetkan ke atas permukaan medium agar dalam piring petri. Alat berupa 'kayu hoki' digunakan untuk meratakan sebaran inokulum atas medium agar. Inkubasi dijalankan pada suhu 30 °C dan dipantau setiap hari. Imej bentuk dan pinggiran koloni diambil menggunakan penganalisis imej jenama Leica pada pembesaran x50 dan dikaji secara makroskopik dan mikroskopik.

Jadual 3.1 Komposisi medium agar

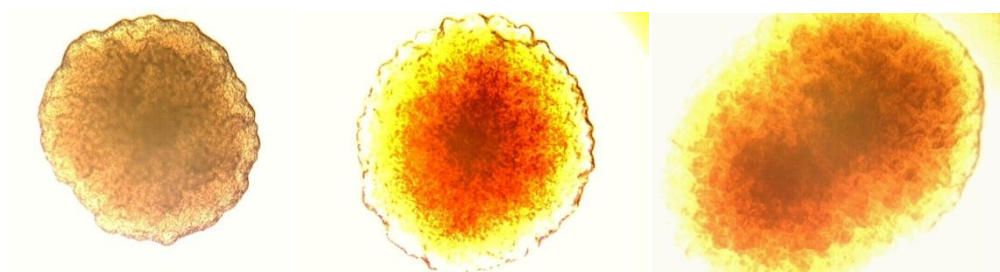
Komposisi	Kuantiti
Glukosa	2.0 g
Sodium hidrogen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	0.27 g

Bakto pepton	0.5 g
Ekstrak yis	0.5 g
Asid sitrik	0.115 g
Air nyah ion	100 mL
Nutrien agar	4% (4 g untuk 100 mL)

Pencirian koloni bakteria dilakukan pada hari ketiga inkubasi iaitu setelah koloni kelihatan dengan jelas di atas piring petri. Imej koloni bakteria berbentuk bulat diambil menggunakan mikroskop penganalisis imej jenama LEICA Microscope (LEICAQ5001W) Imaging Workstation dan Image Processing and Analysis System pada pembesaran x50. Rajah 3.2 menunjukkan hasil kajian makroskopik koloni bakteria selepas inkubasi hari ketiga. Koloni seragam berbentuk bulat jelas kelihatan di atas plat agar tersebut. Rajah 3.3 dan 3.4 menunjukkan hasil kajian mikroskopik imej koloni dan pinggiran koloni bakteria. Imej koloni bakteria *Acetobacter xylinum* 0416 adalah berbentuk bulat dengan pinggiran beralun.



Rajah 3.2 Kajian makroskopik koloni bakteria dalam plat agar



Rajah 3.3 Kajian mikroskopik imej koloni bakteria berbentuk bulat



Rajah 3.4 Kajian mikroskopik imej pinggiran koloni bakteria bentuk beralun

3.2.2 Pewarnaan Gram

Pemencilan bakteria dilakukan dengan kaedah piring sebaran dalam keadaan aseptik. Sedikit sampel yang telah ditumbuhkan dalam piring petri diambil menggunakan dawai inokulum dan dicoretkan di atas medium agar seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 3.5. Kemudian piring petri dililit dengan parafilm dan dieram secara aerobik pada suhu 30 °C selama 24 jam. Piring petri dilabelkan sebagai rujukan dan teknik ini diulang sehingga sel tunggal berjaya dihasilkan. Setelah mendapatkan sel tunggal, teknik pewarnaan gram dilakukan ke atas sel bakteria tersebut.

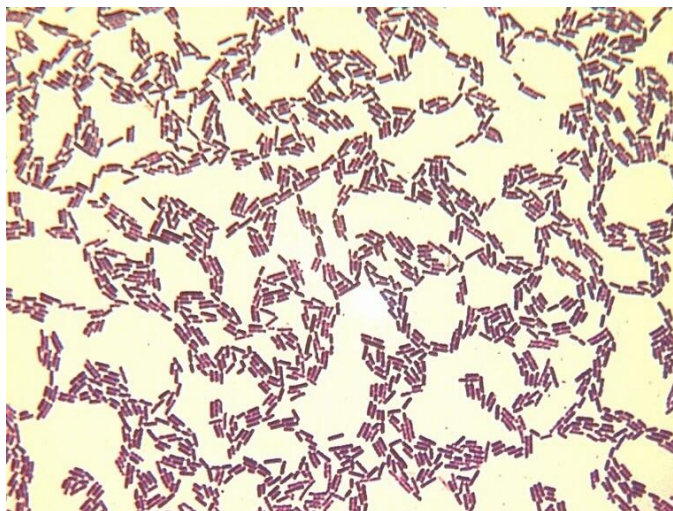


Rajah 3.5 Corak coretan piring sebaran bagi mendapatkan sel tunggal



Rajah 3.6 Kit ujian pewarnaan gram

Empat botol kit ujian pewarnaan gram iaitu R1: crystal violet, R2: Iodine PVP, R3: Gram decolorizer dan R4: Safranin diperlukan dalam analisis ini ditunjukkan dalam Rajah 3.6. Setelah calitan disediakan ia perlu ditetapkan oleh haba dengan memanaskan slaid kaca perlahan-lahan di atas nyalaan api. Ini bertujuan memastikan koloni bakteria melekat dengan sempurna di atas slaid kaca tersebut. Kemudian calitan tersebut dilitupi dengan cecair Crystal Violet dari R1 dan dibiarkan selama 1-2 minit. Lebih cecair di atas slaid kaca dibilas menggunakan air paip dan digoncang beberapa kali. Setelah itu calitan tadi dilitupi pula dengan Iodine PVP dari R2 dan dibiarkan selama 1-2 minit. Lebih cecair tadi dibilas dengan air paip seperti kaedah sebelum ini. Kemudian calitan dinyahwarnakan beberapa saat menggunakan Gram Decolorizer dari R3 dan dibilas semula dengan air paip. Akhirnya, Safranin dari R4 diletakkan di atas calitan untuk 1-2 minit sebelum dibilas dengan air paip dan dibiarkan mengering pada suhu bilik. Calitan tersebut dianalisis menggunakan mikroskop dan jenis pewarnaan gram bagi bakteria akan ditentukan.



Rajah 3.7 Mikrograf menunjukkan sel berbentuk rod dengan gram negatif

Teknik pewarnaan gram dilakukan bagi menentukan jenis gram spesies bakteria dan morfologi bakteria pada peringkat sel. Prosedur ini berasaskan keupayaan mikroorganisma untuk mengekalkan pewarnaan violet kristal sewaktu penyahwarnaan menggunakan alkohol. Bakteria gram positif akan kekal berwarna biru, manakala bakteria gram negatif akan menunjukkan warna merah jambu setelah safranin digunakan selepas proses penyahwarnaan.

Setelah pewarnaan gram dijalankan, slaid tersebut akan diperhatikan di bawah Mikroskop Penganalisis Imej pada pembesaran x5 seperti Rajah 3.7. Imej dianalisis dengan kaedah objektif rendaman minyak. Daripada imej tersebut disimpulkan bahawa sel bakteria ini adalah bakteria gram negatif dengan morfologi sel berbentuk basilus atau rod. Viabiliti strain *A. xylinum* 0416 terhadap masa penyimpanan telah dikaji dan data ditunjukkan dalam Lampiran A. Keputusan membuktikan bahawa koloni *A. xylinum* 0416 agak stabil untuk masa penyimpanan empat minggu dan viabilitinya terjamin.

3.3 BAHAN DAN PERALATAN EKSPERIMEN

Bahan kimia untuk komposisi medium dan analisis, dan peralatan untuk kajian ini ditunjukkan dalam Jadual 3.2.

Jadual 3.2 Bahan kimia dan peralatan yang digunakan dalam kajian ini

Bahan kimia	Peralatan
• R & M Chemicals keluaran R & M Marketing, Essex United Kingdom, • BDC keluaran Becton, Dickinson and Company, • Perancis dan Fisher Chemicals keluaran Fisher Scientific, United Kingdom.	• Inkubator: jenama BINDER, model BD53 • Ketuhar: jenama BINDER, model FD53 • Penimbang: jenama Pioneer - OHAUS Corporation, model PA214 • Plat pemanas berputar: 1. Labtech, model LMS – 1003, 2. Heidolph – MR Hei – Standard, model 505-20000-02-0 dan 3. Schott dari Alpha Chemicals Sdn. Bhd. • Meter pH: jenama Jenway, model 3305 • Autoklaf atau pensteril stim bertekanan tinggi: jenama TOMY, model SX-700 • Inkubator goncang: jenama VISION daripada Scientific Company Limited, model VS-8480 • Mikroskop pengimbas elektron (SEM) dan dispersi tenaga sinar-X (EDX), jenama Hitachi, model S-3400 • Kromatografi cecair tekanan tinggi (HPLC): 1. Perkin Elmer dengan turus pemanas Eppendorf CH-30 2. HPLC Agilent 1100 Series 3. HPLC Agilent 1200 Series • Kabinet aliran laminar: AirStream jenama ESCO

Bahan mentah utama bagi penyediaan medium fermentasi iaitu air kelapa diperolehi dari kedai runcit di Serdang, Selangor. Bagi menjamin keseragaman, air kelapa tersebut diperolehi dari kedai yang sama, dipastikan kelapa matang berkulit perang dari spesis yang sama, bebas daripada serangan serangga perosak dan penyakit serta berkocak air di dalamnya. Bagi mendapatkan kematangan kelapa yang sama, kelapa tersebut adalah kelapa tua iaitu santannya digunakan untuk memasak. Isi kelapa tersebut berwarna putih dan tidak berbau tengik. Juga dipastikan tiada tunas yang tumbuh di luar tempurung kelapa tersebut. Bagi penyediaan medium, diperlukan air kelapa segar dari kelapa yang baru dibelah.

3.4 FERMENTASI SELULOSA BAKTERIA

3.4.1 Medium Penyelenggaraan

Medium penyelenggaraan digunakan untuk penyediaan inokulum bagi fermentasi selulosa bakteria. Medium penyelenggaraan dalam kajian ini bersumberkan kepada MARDI dan digunakan untuk keseluruhan eksperimen. Ia bertujuan memastikan tahap viabiliti strain adalah optimum dan memendekkan masa adaptasi fasa lamban.

Komposisi medium penyelenggaraan ditunjukkan dalam Jadual 3.3 yang bersumberkan dari MARDI. Air kelapa daripada kelapa matang segar ditapis dalam kuantiti yang secukupnya. 500 mL air kelapa disukat dan ditambahkan 80.0 g sukrosa dan 5.0 g ammonium sulfat. Larutan campuran kemudiannya dikacau bagi melarutkan bahan kimia tersebut. Nilai pH medium dijadikan 4.5 dengan menambahkan asid asetik glasial. Medium kemudiannya ditambahkan lagi air kelapa sehingga isipadu menjadi 1.0 L. Kemudian medium disteril dalam autoklaf pada 121 °C selama 15 minit dan disejukkan sehingga suhu bilik. Medium tersebut diinokulasi dengan 10 mL strain iaitu 10% berbanding isipadu medium keseluruhan. Selepas itu, medium dimasukkan ke dalam inkubator dan fermentasi dijalankan pada suhu 30 °C. Selepas tiga hari pengerasan, medium dikeluarkan dari inkubator dan digunakan sebagai inokulum atau disimpan di dalam peti sejuk sebagai stok. Stok inokulum ini boleh digunakan selama 4 minggu dan viabilitinya terjamin. Data viabiliti strain *A. xylinum* 0416 terhadap masa penyimpanan ditunjukkan dalam Lampiran A dan data penentuan kinetik pertumbuhan *A. xylinum* 0416 ditunjukkan dalam Lampiran B.

Jadual 3.3 Komposisi medium penyelenggaraan

Komposisi	Kuantiti
Air kelapa bertapis	~ 1 L
Sukrosa	80.0 g
Ammonium sulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
pH	4.5

Sumber: MARDI

3.4.2 Medium Fermentasi

Tiga medium fermentasi iaitu air kelapa-HS (CWHSM), kompleks (CM) dan Hestrin-Schramm (HSM) digunakan dalam kajian ini. Komposisi dan cara penyediaan diterangkan seperti berikut.

Jadual 3.4 Komposisi medium air kelapa-HS (CWHSM)

Komposisi	Kuantiti
Sodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)	2.7 g
Bakto pepton	5.0 g
Ekstrak yis	5.0 g
Asid sitrik	1.15 g
Air kelapa bertapis	menjadi 1.0 L
pH	6.0

Medium air kelapa-HS atau singkatannya CWHSM disediakan dengan melarutkan 2.7 g sodium hidrogen fosfat, 5.0 g bakto pepton, 5.0 g ekstrak yis dan 1.15 g asid sitrik dalam sedikit air kelapa segar yang ditapis seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.4. Setelah semua bahan kimia larut, air kelapa bertapis ditambah ke dalam medium sehingga menjadi lebih kurang 900 mL. Nilai pH medium dijadikan 6.0 dengan menambah larutan alkali atau asid bergantung kepada nilai pH awal yang diukur. Kemudian larutan medium ditambah lagi air kelapa bertapis sehingga isipadu menjadi 1.0 L. Setelah disteril dan dibiarkan sejuk ke suhu bilik, medium sedia untuk proses inokulasi dan fermentasi.

Jadual 3.5 Komposisi medium kompleks (CM)

Komposisi	Kuantiti
Air kelapa bertapis	1.0 L
Sukrosa	80.0 g
Ammonium sulfat (NH_4) ₂ SO ₄	5.0 g
pH	4.5 (menggunakan asid asetik glasial)

Sumber: MARDI

Cara penyediaan medium kompleks atau singkatannya CM adalah sama seperti penyediaan medium penyelenggaraan yang diterangkan sebelum ini. Komposisi CM ditunjukkan dalam Jadual 3.5.

Jadual 3.6 Komposisi medium Hestrin-Schramm (HSM)

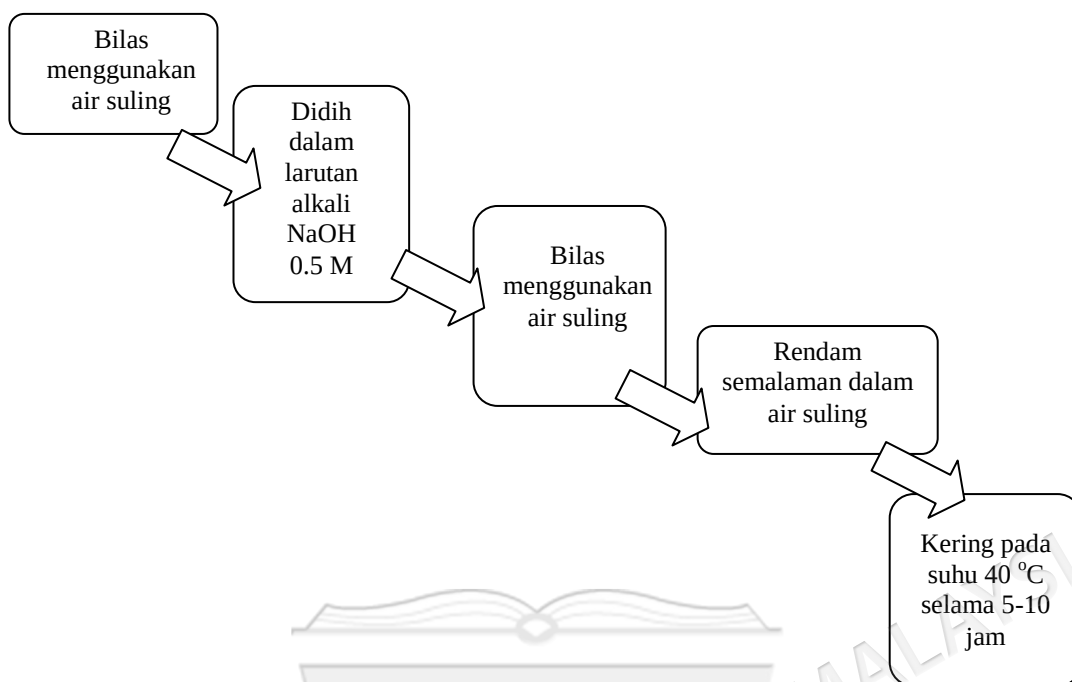
Komposisi	Kuantiti
Glukosa	20.0 g
Sodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)	2.7 g
Bakto pepton	5.0 g
Ekstrak yis	5.0 g
Asid sitrik	1.15 g
Air suling	menjadi 1.0 L
pH	6.0

Sumber: Hestrin-Schramm 1954

Medium Hestrin-Schramm atau singkatannya HSM disediakan dengan melarutkan 20.0 g glukosa, 2.7 g sodium hidrogen fosfat, 5.0 g bakto pepton, 5.0 g ekstrak yis dan 1.15 g asid sitrik dalam air suling. Komposisi HSM ditunjukkan dalam Jadual 3.6. Setelah semua bahan kimia larut, air suling ditambah sehingga menjadi lebih kurang 900 mL. Nilai pH medium dijadikan 6.0 dengan menambah larutan alkali atau asid bergantung kepada nilai pH awal yang diukur. Kemudian larutan medium ditambah lagi air suling sehingga isipadu keseluruhan menjadi 1L. Setelah disteril dan dibiarkan sejuk ke suhu bilik, medium sedia untuk proses inokulasi dan fermentasi. HSM merupakan medium tertakrif dan digunakan oleh kebanyakan penyelidik untuk penghasilan selulosa bakteria.

3.5 PENUAIAN SELULOSA BAKTERIA

Setelah fermentasi dijalankan dan gel SB diperolehi, ia perlu diasingkan daripada sel bakteria dengan kaedah pendidihan dalam larutan alkali sodium hidroksida (NaOH). SB berbentuk gel basah dibilas sebanyak dua kali menggunakan air suling. Gel tersebut kemudiannya dididihkan dalam larutan sodium hidroksida 0.5 M selama 20 minit untuk melarutkan sel yang terperangkap di antara jaringan pelikel SB. Selepas itu gel tersebut dibilas sekali lagi menggunakan air suling. Gel kemudiannya direndam di dalam air suling semalaman atau sehingga air rendaman memberikan pH neutral (7.0). Langkah ini bertujuan memastikan larutan alkali yang masih teringgal dalam gel keluar sepenuhnya. Larutan alkali yang masih tersisa dalam sampel boleh merosakkan kualiti SB yang terhasil.



Rajah 3.8 Prosedur penuaian selulosa bakteria

Setelah itu gel tersebut dikeringkan perlahan-lahan di dalam ketuhar pada suhu 40 °C selama 5-10 jam, bergantung kepada ketebalan sampel. Ketebalan sampel dalam kajian ini adalah dalam julat 0-12 mm. Julat ketebalan 0-6 mm memerlukan masa pengeringan 5-8 jam, manakala sampel yang melebihi 5 mm memerlukan masa pengeringan sehingga 10 jam. Sampel SB kering kemudiannya disimpan di dalam bekas tertutup untuk analisis dan aplikasi seterusnya. Prosedur penuaian SB ditunjukkan dalam Rajah 3.8.

3.6 KAEDAH ANALISIS

3.6.1 Analisis Karbohidrat

Supernatan daripada kelalang disteril terlebih dahulu bagi menghalang kontaminasi. Supernatan tersebut kemudiannya ditapis menggunakan Phenex-RC 15mm 0.2μ. Analisis polisakarida yang dijalankan adalah untuk sukrosa, fruktosa dan glukosa. Kromatografi cecair halaju tinggi dengan turus Rezek RCM Monosaccharide digunakan untuk analisis ini. Fasa bergerak adalah air dengan kadar alir 1 mL/min. Peralatan HPLC yang digunakan ialah Agilent 1200 Series.

3.6.2 Berat Kering Selulosa Bakteria

Setelah SB dituai dan dikeringkan dengan sempurna, kepingan SB tersebut ditimbang menggunakan penimbang elektronik Pioneer-OHAUS Corporation, model PA214 sehingga satu bacaan yang stabil diperolehi. Data tersebut mewakili berat kering SB dalam unit g/L.

3.6.3 pH Medium

Sebaik sahaja kelalang mengandungi sampel dikeluarkan daripada inkubator, nilai pH supernatan direkod menggunakan meter pH Jenway model 3305.

3.6.4 Ketebalan Selulosa Bakteria Basah

Ketebalan SB diukur menggunakan angkup Vernier jenama Toyogo sejeurus dikeluarkan daripada kelalang kon, sebelum proses penuaian dilakukan ke atas sampel. Teknik mengukur dan memegang gel SB basah perlu berhati-hati supaya bentuk asal gel tidak rosak. Kerosakan bentuk gel akan memberikan bacaan ketebalan yang tidak tepat.

3.6.5 Analisis Asid Glukonik

Setelah proses penyediaan sampel dilakukan seperti analisis karbohidrat, analisis asid glukonik dijalankan menggunakan turus Synergy 4U Hydro-RP 80A dengan peralatan HPLC Agilent 1100 Series. Fasa bergerak ialah 0.1% H_3PO_4 dengan halaju 1.0 mL/min, panjang gelombang 220 nm dan suhu 30 °C.



BAB IV

PEMILIHAN MEDIUM PENGHASILAN DAN PENENTUAN KOMPOSISI SELULOSA BAKTERIA

4.1 PENGENALAN DAN STRATEGI KAJIAN

Selulosa bakteria (SB) boleh dihasilkan daripada sumber karbon glukosa, sukrosa, fruktosa, gliserol, mannitol dan arabitol. Mannitol dan fruktosa adalah sumber karbon

yang lebih baik (Ross et al. 1991; Masaoka et al. 1993; Oikawa et al. 1995a; Oikawa et al. 1995b; Shoda & Sugano 2005). Kos mannitol dan fruktosa yang tinggi dan penghasilan yil SB yang rendah membataskan pengkomersialannya. Terdapat pelbagai sumber karbon yang telah dibuktikan secara eksperimen untuk menghasilkan SB. Namun begitu pemilihan substrat yang efektif bergantung kepada proses penyediaan seperti hidrolisis yang melibatkan penggunaan bahan kimia yang tinggi toksik dan masa penyediaan yang panjang. Kajian terhadap sumber karbon tempatan yang murah amat diperlukan dalam menghasilkan formulasi medium berpotensi untuk fermentasi SB.

Air kelapa daripada bahan buangan perusahaan kopra dan santan telah diformulasi untuk medium SB. Penggunaan air kelapa sebagai substrat telah digunakan oleh Budhiono et al. (1999) tetapi tiada kajian lanjut dibuat selepas itu. Oleh itu, kajian ini memfokuskan kepada penambahbaikan terhadap formulasi keseluruhan dengan mengambil kira nutrien lain yang menyumbang kepada penghasilan satu medium baru yang berpotensi. Dalam merangka objektif tersebut, perbandingan antara tiga medium telah dikaji iaitu medium cadangan, medium Hestrin-Schramm dan medium kompleks. Air kelapa dipilih sebagai substrat kajian kerana mudah diperolehi dari sumber tempatan, tidak melibatkan proses hidrolisis dan nyah-toksik, salah satu bahan buangan agro, dan mempunyai ciri-ciri berpotensi untuk dikomersilkan. Air kelapa mempunyai kandungan karbohidrat utama (Unagul et al. 2007) yang diperlukan dalam penghasilan SB seperti ditunjukkan dalam Jadual 4.1. Produktiviti, kadar penghasilan dan pencirian SB menjadi kriteria utama dalam kajian ini. Jadual 4.2 menunjukkan perbezaan kandungan karbohidrat dalam air kelapa matang

Jadual 4.1 Analisis air kelapa matang

Kandungan	Jenis	Amaun
Kandungan pepejal		40.0 ± 2.0
Total karbohidrat		17.8
	Glukosa	5.0 ± 0.4
	Fruktosa	6.1 ± 0.4
	Sukrosa	6.7 ± 0.6

Asid organik		4.15 ^a
Asid asetik		0.7 ± 0.1
Asid sitrik		0.05 ± 0.03
Asid DL-malik		2.5 ± 0.2
Asid sukinik		0.9 ± 0.1
Analisis unsur	C _{30.99} H _{7.27} N _{0.026}	
Asid lemak		6.3
	C8:0	0.35
	C10:0	1.78
	C12:0	2.23
	C14:0	0.93
	C16:0	0.48
	C18:0	0.14
	C18:1	0.32
	C18:2	0.07
(Surih) unsur	Manganese (mg/L)	0.19 ± 0.02
	Magnesium	0.046 ± 0.009
	Potassium	0.41 ± 0.06
	Sodium	0.23 ± 0.03

Data dalam unit g/L kecuali dinyatakan, dalam % berat/berat

^a Tidak termasuk puncak tidak dikenal pasti

Sumber: Unagul et al. 2007

Jadual 4.2 Perbezaan kandungan karbohidrat dalam air kelapa matang

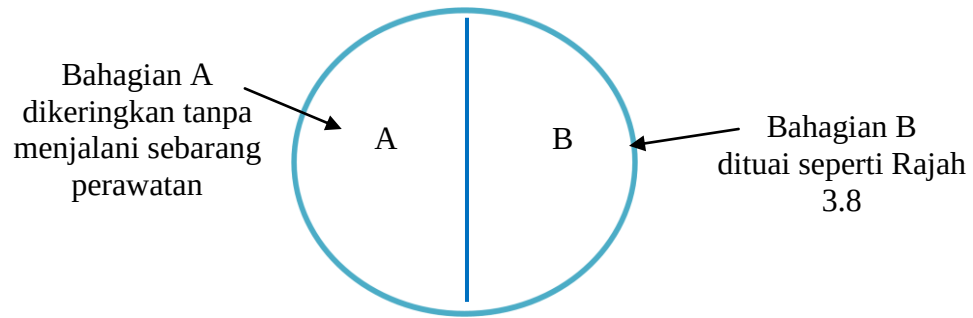
Total karbohidrat	Glukosa	Fruktosa	Sukrosa	Sumber
17.8	5.0 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.7 ± 0.6	Unagul et al. 2007
10.3	2.8	4.5	3.0	Eksperimen luas permukaan
6.5	1.0	2.5	3.0	Eksperimen statik dan goncang

Komposisi medium penyelenggaraan untuk kajian pemilihan medium penghasilan SB dinyatakan dalam Jadual 3.3. Komposisi tiga medium fermentasi iaitu CWHSM ditunjukkan dalam Jadual 3.4, CM ditunjukkan dalam Jadual 3.5 dan

HSM ditunjukkan dalam Jadual 3.6. Fermentasi dijalankan dalam kelalang kon bersaiz 250 mL dengan isipadu medium 100 mL. Sebanyak 6 kelalang kon diperlukan bagi setiap medium fermentasi yang mewakili hari inkubasi 2, 4, 6, 8, 10 dan 12. Inokulum yang berusia 3 hari digunakan sebagai kultur pembenihan. Setelah inokulasi dilakukan, fermentasi dijalankan pada suhu 30 °C secara kultur statik. Kelalang dikeluarkan daripada inkubator mengikut hari inkubasi. Selepas itu sampel dituai mengikut prosedur dalam Rajah 3.8 dan dianalisis untuk berat kering SB, jumlah sel yang terperangkap antara pelikel, pH medium dan produktiviti.

Kajian penentuan komposisi SB dijalankan untuk medium CWHSM, CM dan HSM dalam kultur permukaan statik dan goncang. Enam puluh kelalang kon bersaiz 100 mL yang mengandungi 50 mL medium setiap satu diperlukan sepanjang eksperimen. Enam set eksperimen yang memerlukan 10 kelalang kon setiap set disediakan iaitu CWHSM statik, CWHSM goncang, CM statik, CM goncang, HSM statik dan HSM goncang. Selepas diautoklaf, setiap kelalang dimasukkan 5.0 mL inokulum nata daripada medium penyelenggaraan. Fermentasi dijalankan pada suhu 30 °C selama 10 hari. Enam kelalang kon akan dikeluarkan dari inkubator setiap hari untuk dianalisis bermula hari pertama sehingga hari kesepuluh.

Objektif kajian ini adalah untuk menentukan komposisi selulosa, air dan sel yang terkandung dalam satu sampel SB basah. Setelah kelalang kon dikeluarkan daripada inkubator, bacaan pH supernatan dicatatkan dan sampel SB dikeluarkan dari kelalang kon secara perlahan-lahan supaya tidak terkoyak. Setelah bacaan berat basah dan ketebalan SB diambil, sampel dibahagi kepada dua bahagian. Separuh pertama akan dituai seperti kaedah yang diterangkan dalam bahagian 3.5, manakala separuh kedua akan terus dikeringkan tanpa menjalani sebarang proses penuaian. Kaedah pengiraan untuk kajian ini diringkaskan dalam Jadual 4.3. Setelah bacaan berat basah diambil, sampel dibahagi kepada dua bahagian seperti ditunjukkan dalam Rajah 4.1.



Rajah 4.1 Sampel SB

Jadual 4.3 Ringkasan kaedah pengiraan komposisi sampel SB

Parameter	Simbol	Persamaan
Berat basah SB	X	$C + SB + W$
Berat kering A (1/2 sampel)		$C + SB$
Berat kering A (1 sampel)	Y	$2 \times (C + SB)$
Berat kering B (1/2 sampel)		SB
Berat kering B (1 sampel)	Z	$2 \times (SB)$
Berat air	W	$X - Y$
Peratusan SB dalam sampel	% SB	$(Z/X) \times 100$
Peratusan air dalam sampel	% W	$(W/Y) \times 100$
Peratusan sel dalam sampel	% C	$((Y - Z)/X) \times 100$

Nota: C adalah berat sel, SB adalah berat selulosa bakteria,
W adalah berat air yang terkandung dalam sampel

Keterangan bagi Jadual 4.3 ialah berat basah sampel selulosa bakteria, X dinyatakan dalam persamaan di bawah iaitu;

$$\text{Berat basah, } X = C + SB + W \quad \dots(4.1)$$

di mana C adalah berat sel, SB adalah berat selulosa bakteria dan W adalah berat air yang terkandung dalam sampel. Berat kering separuh sampel yang tidak dirawat adalah jumlah separuh berat sel, C dan separuh berat selulosa bakteria, SB iaitu,

$$\text{Berat kering separuh sampel tidak dirawat} = C + SB$$

$$\text{Berat kering satu sampel tidak dirawat, } Y = 2 (C + SB) \quad \dots(4.2)$$

Berat kering separuh sampel yang dirawat adalah nilai separuh berat selulosa bakteria, SB iaitu,

Berat kering separuh sampel dirawat = SB

Berat kering satu sampel yang dirawat, $Z = 2 (SB)$... (4.3)

Jumlah air, W dalam sampel adalah perbezaan antara berat basah, X kepada berat kering satu sampel tidak dirawat, Y iaitu,

$$W = X - Y \quad \dots (4.4)$$

Peratusan komposisi selulosa bakteria, % SB dalam sampel,

$$\% SB = (Z / X) \times 100 \quad \dots (4.5)$$

Peratusan komposisi air, % W dalam sampel,

$$\% W = (W / X) \times 100 \quad \dots (4.6)$$

Peratusan komposisi sel, % C dalam sampel,

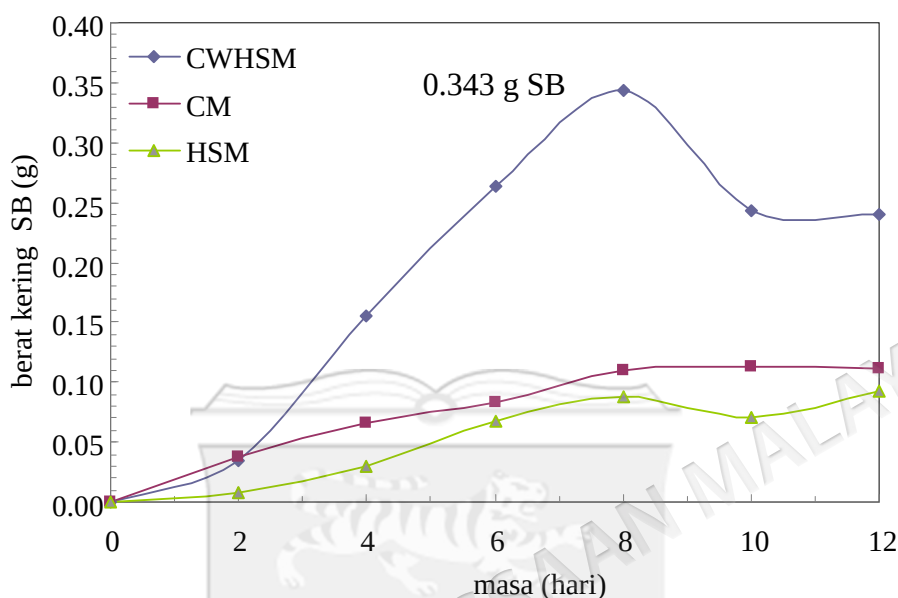
$$\% C = ((Y - Z) / X) \times 100 \quad \dots (4.7)$$

4.2 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.2.1 Kesan Formulasi Medium terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria

Rajah 4.2 menunjukkan penghasilan SB dalam tiga medium berbeza. Untuk tujuan perbandingan, inokulum yang digunakan untuk keseluruhan kajian adalah daripada kelompok yang sama. CWHSM memberikan penghasilan SB maksimum, diikuti oleh CM dan HSM. Kandungan nutrien bagi HSM dan CWHSM adalah sama tetapi

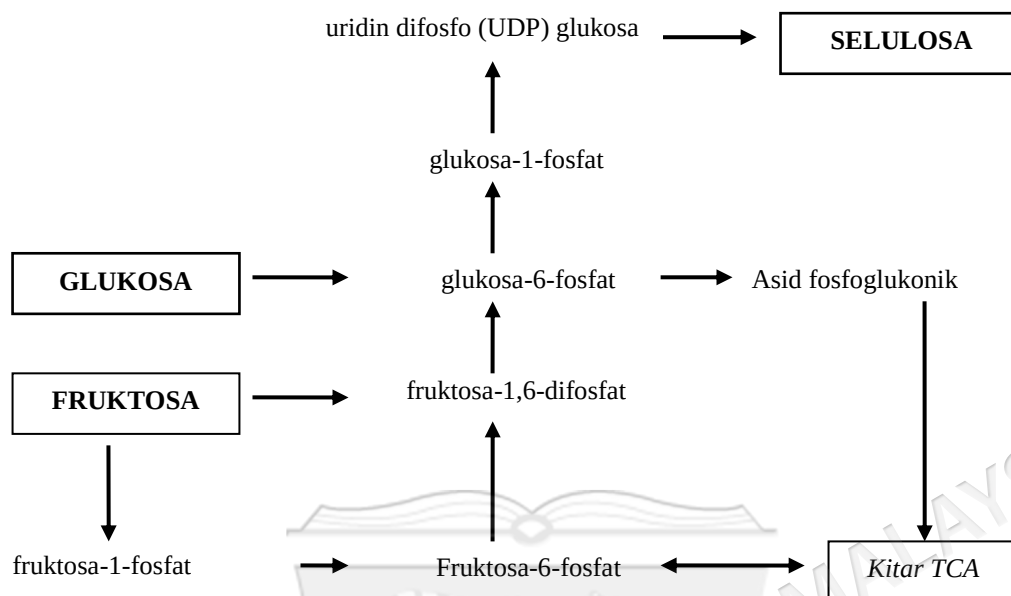
sumber substratnya adalah berbeza. Kandungan air suling dan glukosa dalam HSM diganti dengan air kelapa dalam CWHSM. Sumber substrat bagi CM ialah air kelapa dan sukrosa.



Rajah 4.2 Penghasilan SB dalam medium penghasilan berbeza

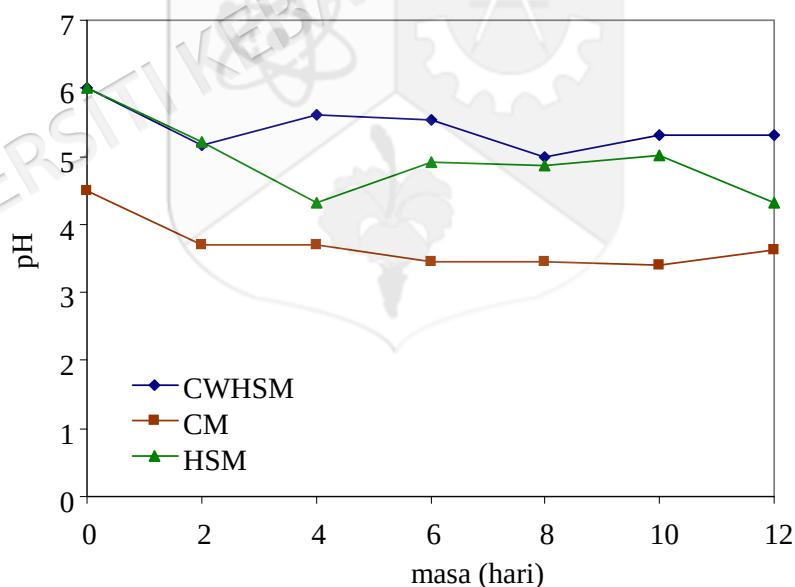
Air kelapa membekalkan kepelbagaian jenis gula kepada medium CWHSM dan CM seperti glukosa, sukrosa dan fruktosa. Penghasilan SB yang tinggi oleh CWHSM disebabkan oleh campuran monosakarida, disakarida dan nutrien sesuai di dalam medium penghasilan SB. Keadaan ini mempengaruhi penghasilan SB berpandukan kepada laluan metabolik dalam Rajah 4.3 iaitu glukosa dan fruktosa digunakan serentak untuk menghasilkan SB. Penghasilan SB tertinggi diperolehi oleh CWHSM dengan 0.343 g/L, diikuti oleh CM dengan 0.11 g/L dan HSM dengan 0.08 g/L, kesemuanya pada hari ke-8 fermentasi.

Laluan metabolik bagi SB dalam Rajah 4.3 menunjukkan bahawa glukosa ditukarkan kepada glukosa-6-fosfat manakala asid fosfoglukonik pula sebagai produk sampingan. Pelopor kepada sintesis selulosa ialah uridin difosfoglukosa (UDP-glukosa) dan menggunakan glukosa, fruktosa dan sukrosa sebagai substrat untuk pertumbuhan dan penghasilan SB seperti yang dilaporkan oleh Vandamme et al. (1998).



Rajah 4.3 Model laluan metabolik bagi selulosa bakteria (SB)

Sumber: Diolah daripada Serafica 1997

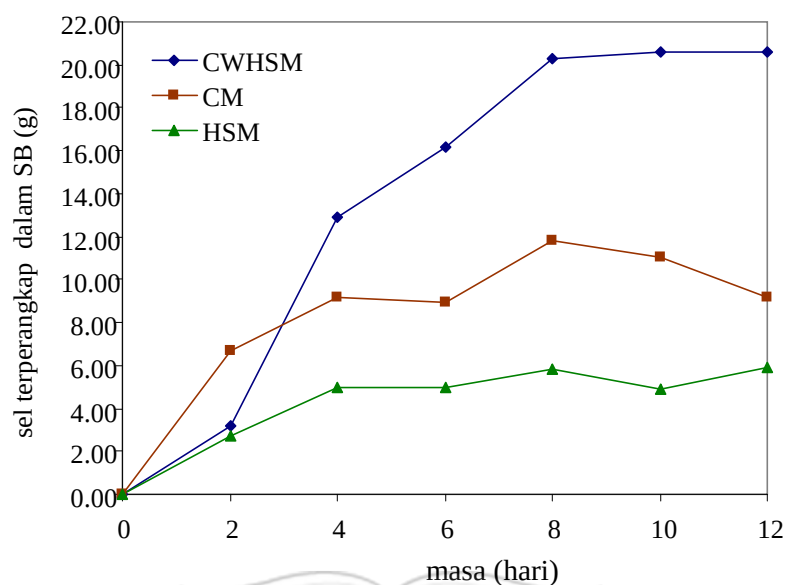


Rajah 4.4 Profil pH bagi medium penghasilan SB

European Paten No. 86308092.5 menjelaskan bahawa apabila *A. xylinum* tumbuh dalam substrat dektrosa atau substrat karbohidrat yang mana ia adalah salah satu daripada komponen, ia akan menukarkan 26% (lebih daripada satu per empat)

kandungan glukosa kepada asid glukonik dan 2-keto-glukonik. Keadaan ini mengurangkan kuantiti glukosa yang dapat ditukar kepada SB. Rajah 4.4 menunjukkan nilai pH bagi ketiga-tiga medium berbanding masa fermentasi. Substrat bagi CWHSM adalah campuran glukosa, sukrosa dan fruktosa manakala HSM menggunakan hanya glukosa sebagai substrat. Pengumpulan asid dalam medium dapat dilihat dengan kejatuhan pH yang ketara bagi HSM pada hari ke-4 berbanding CWHSM. Perlu dijelaskan di sini bahawa perbezaan antara CWHSM dan HSM hanyalah dari segi sumber substratnya dan membuktikan kenyataan oleh paten tersebut.

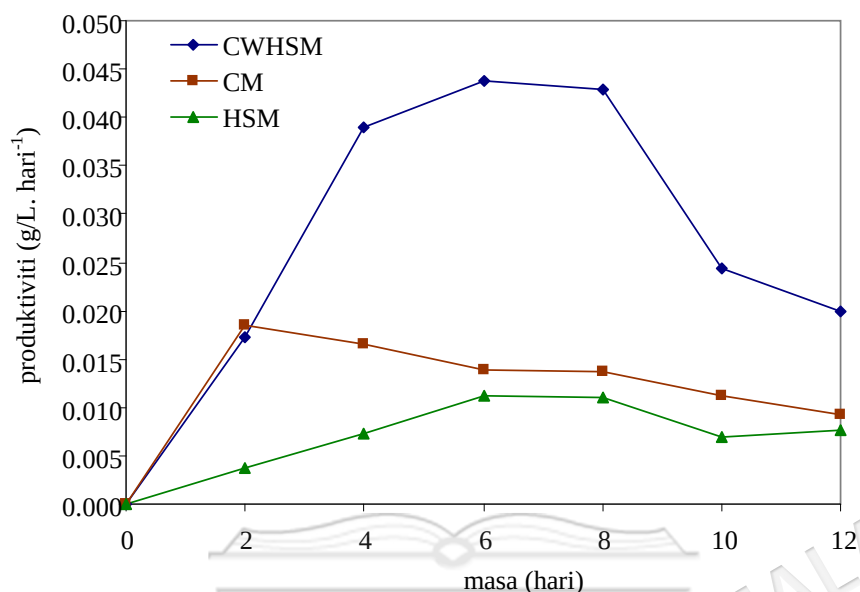
Kejatuhan pH bagi HSM berbanding CWHSM adalah disebabkan oleh pengumpulan asid glukonik dan asid keto-glukonik dalam medium, seterusnya merendahkan pH medium kepada takat yang tidak sesuai bagi penghasilan SB. CWHSM adalah medium yang fleksibel untuk *A. xylinum* berbanding dua medium yang lain kerana terdapatnya kepelbagaian gula dan nutrien yang mencukupi. Keadaan ini memberi ruang kepada *A. xylinum* untuk menyesuaikan diri secara perlahan-lahan dan menggalakkan pertumbuhan serta penukaran glukosa kepada SB. Hwang et al. (1999) telah mengkaji kesan kepekatan glukosa awal terhadap pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa dalam medium CSL secara fermentasi kelompok dan menyatakan bahawa salah satu faktor yil selulosa berkurangan pada kepekatan glukosa awal dalam medium adalah kerana peningkatan metabolisme glukosa kepada asid glukonik. Masaoka et al. (1993) melaporkan bahawa yil selulosa akan berkurang dengan peningkatan kepekatan glukosa awal. Beliau mencadangkan supaya kultur kelompok dijalankan dengan kepekatan glukosa awal yang rendah. Walau bagaimanapun, bagi mendapatkan kepekatan selulosa yang tinggi, glukosa perlu dibekalkan secara berterusan atau berkala bagi mengekalkan pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa.



Rajah 4.5 Jumlah sel yang terperangkap dalam SB

Rajah 4.5 menunjukkan kuantiti sel yang terperangkap di antara pelikel SB basah dalam medium penghasilan berbeza. Anggapan dibuat bahawa jumlah air yang boleh dipegang oleh pelikel SB adalah sama, untuk semua sampel. Ini juga menerangkan bahawa kuantiti sel yang terperangkap di antara pelikel SB basah adalah menggambarkan jumlah sel yang menghasilkan SB dalam sampel. Ia juga mewakili sel yang aktif dan kebolehhidupan sel yang mensistesis SB.

Mekanisme pembentukan pelikel SB oleh sel *A. xylinum* adalah dalam pergerakan maju dan mundur yang dikenali sebagai pergerakan berbalik yang disebabkan oleh sintesis SB (Shah & Malcolm 2004) dan melaporkan bahawa pengumpulan strain semasa pengkristalan selulosa bertanggungjawab kepada pergerakan berbalik ini. Rajah 4.5 menunjukkan bahawa jumlah sel terperangkap di antara pelikel SB adalah berkadar terus dengan kadar penghasilan SB. Keputusan ini adalah seperti yang dilaporkan oleh Marx-Figini dan Pion (1974), iaitu fasa sintesis SB adalah serentak dengan pertumbuhan sel. Kepekatan SB serta pertumbuhan sel bakteria mengikuti tindakbalas yang sama iaitu tindakbalas peringkat pertama. Fakta menyatakan bahawa sintesis SB hanya dilakukan oleh bakteria yang mampu membahagi menunjukkan bahawa penghasilan SB mestilah seiring dengan proses pembahagian sel itu sendiri (Marx-Figini & Pion 1974).



Rajah 4.6 Produktiviti SB dalam medium berbeza

Rajah 4.6 menunjukkan produktiviti SB dalam medium berbeza berbanding masa fermentasi. Produktiviti SB dikira dengan membahagikan berat kering SB (Rajah 4.2) dengan masa fermentasi dalam hari. Medium CWHSM menunjukkan produktiviti paling tinggi berbanding medium CM dan HSM. Produktiviti keseluruhan tertinggi diperolehi oleh CWHSM dengan $0.044 \text{ g/L.hari}^{-1}$ pada hari ke-6. Medium CWHSM adalah medium tidak tertakrif dan menggunakan air kelapa sebagai sumber substrat utama. Kajian terdahulu oleh Hestrin dan Schramm (1954) dan Forng et al. (1989) menyatakan bahawa kadar penghasilan SB lebih tinggi dalam medium tak tertakrif berbanding medium sintetik oleh strain *A. xylinum*. Kesimpulan daripada kajian ini ialah medium CWHSM menyediakan satu formulasi medium kompleks untuk keperluan penghasilan SB yang optimum.

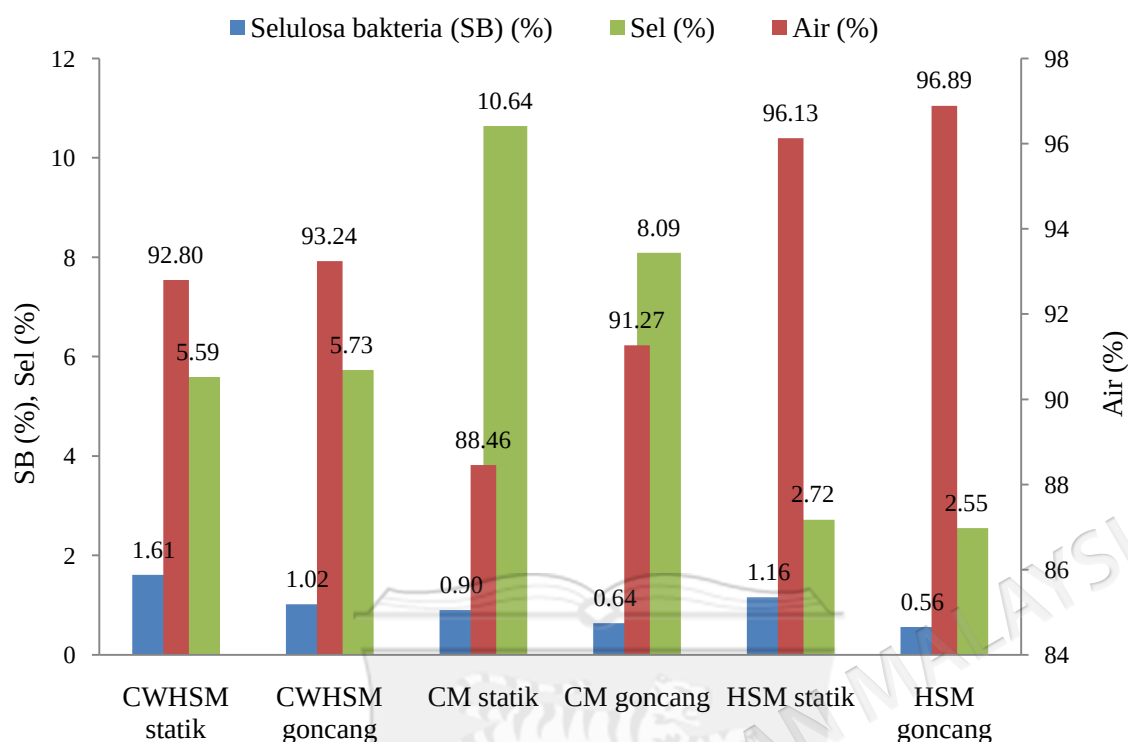
4.2.2 Kajian Penentuan Komposisi Selulosa Bakteria

Rajah 4.7 menunjukkan purata peratusan komposisi SB natif dalam keadaan basah iaitu sebelum sampel dituai dan dirawat. Kajian ini bertujuan untuk menganggarkan peratusan SB, air dan sel yang terdapat dalam satu sampel SB basah. Daripada keenam-enam proses penghasilan SB ini jelas menunjukkan bahawa CWHSM statik

memberikan peratusan SB paling tinggi dengan 1.61% daripada keseluruhan berat basah sampel SB. Peratusan kandungan air paling tinggi adalah daripada HSM goncang (96.89%) dan peratusan kandungan sel paling tinggi diperolehi daripada CM statik (10.64%).

Perbezaan peratusan komposisi ini menunjukkan bahawa wujudnya perbezaan struktur dan sifat fizikal SB iaitu keupayaan memerangkap air oleh pelikel selulosa. SB daripada HSM goncang dan statik, berupaya memegang air dengan banyak (>96%) berbanding medium yang lain. Walaupun peratusan SB daripada HSM goncang adalah paling kecil (0.56%), tetapi ia mampu merangkap air dengan kadar paling tinggi. Keputusan ini mencadangkan bahawa struktur pelikel SB daripada HSM goncang sama ada saiz liang dan diameter liang, mempunyai keupayaan memerangkap air paling tinggi.

Peratusan sel paling tinggi iaitu 10.64% diperolehi dalam CM statik menunjukkan bahawa mod statik mampu untuk memerangkap sel *A. xylinum* dalam jaringan pelikel SB berbanding mod goncang. Proses fermentasi secara permukaan statik membantu sel untuk berada di antara pelikel SB dan secara langsung meningkatkan penghasilan SB. Ini ditunjukkan dengan peratusan komposisi SB dalam mod statik lebih tinggi berbanding goncang.



Rajah 4.7 Purata peratusan komposisi sampel SB natif dalam keadaan basah

4.3 KESIMPULAN

Formulasi medium CWHSM berpotensi sebagai medium penghasil SB yang efektif dengan penghasilan berat kering SB tertinggi, 0.343 g/L berbanding formulasi HSM dan CM. Substrat yang digunakan pula adalah dari sumber tempatan yang murah dan mudah diperolehi. Penggunaan air kelapa daripada perusahaan kopra dan santan dapat membantu menangani masalah sisa buangan pertanian dan alam sekitar di negara ini. Di samping itu, kultur permukaan statik yang digunakan dalam kajian ini adalah operasi yang mudah diselenggarakan. Satu medium penghasilan SB yang murah dan tinggi produktiviti bersumberkan bahan buangan pertanian iaitu air kelapa telah dapat dibangunkan daripada kajian ini. Peratus kandungan SB paling tinggi (1.61%) diperolehi daripada penggunaan medium CWHSM, manakala peratus kandungan air paling tinggi (96.89%) diperolehi daripada penggunaan medium HSM gancang. Penggunaan medium CM statik memberikan peratusan kandungan sel paling tinggi (10.64%). Oleh kerana asas utama pemilihan medium penghasilan SB adalah

keupayaan medium untuk memberikan produktiviti SB tertinggi, maka medium CWHSM dipilih untuk kajian selanjutnya.



BAB V

PENGHASILAN SELULOSA BAKTERIA DALAM CWHSM

5.1 PENGENALAN DAN STRATEGI KAJIAN

Kajian penghasilan SB oleh *A. xylinum* 0416 menggunakan medium berbeza iaitu CWHSM, CM dan HSM menunjukkan bahawa penghasilan SB tertinggi iaitu 0.343 g/L (Rajah 4.2) telah dihasilkan oleh medium CWHSM. Penghasilan bioproduk SB boleh ditingkatkan sekiranya proses fermentasi dijalankan menggunakan parameter proses yang bersesuaian misalnya dengan meneliti kesan guncangan, luas permukaan medium, pengudaraan dan pH awalan medium yang digunakan. Oleh itu, kajian ini memfokuskan kepada tiga parameter iaitu kesan guncangan, luas permukaan dan pH awalan medium terhadap penghasilan SB dalam CWHSM oleh *A. xylinum* 0416.

Strain *Acetobacter* penghasil selulosa menghasilkan asid glukonik sebagai produk sampingan daripada metabolisme karbohidrat. Apabila *A. xylinum* ditumbuhkan di atas substrat karbohidrat, sebanyak 26% glukosa ditukarkan kepada asid glukonik dan 2-ketoglukonik. Kebanyakan asid glukonik ini diguna semula untuk menghasilkan selulosa dan metabolit sel yang lain (Hestrin 1961). Penghasilan asid glukonik berlebihan oleh *Acetobacter* dalam kultur kelompok menyukarkan untuk menentukan dengan tepat julat pH untuk memaksimumkan kadar sintesis selulosa. Julat pH bagi *Acetobacter* dalam fermentasi kelompok berubah dengan masa dari 3.5 ke 6.2 (Bureau & Brown 1987). Penghasilan asid glukonik akan menggunakan glukosa daripada medium yang sepatutnya digunakan untuk penghasilan selulosa (Hwang et al. 1999).

Metodologi penghasilan selulosa bakteria dalam CWHSM seperti yang dinyatakan dalam bahagian 3.4 di mukasurat 59. Medium penghasilan pula adalah seperti dalam Jadual 3.4 untuk CWHSM. Proses penuaian SB adalah sama seperti yang dinyatakan dalam Rajah 3.8 di mukasurat 62. Berat kering SB, profil pH medium sepanjang fermentasi, produktiviti penghasilan SB, kepekatan karbohidrat dan asid glukonik dalam medium dianalisis dan direkodkan.

Kesan kultur permukaan statik dan goncang terhadap penghasilan selulosa bakteria dalam CWHSM dijalankan dalam kelalang kon bersaiz 100 mL dengan isipadu medium 50 mL setiap satu. Sepuluh unit kelalang kon untuk setiap kultur fermentasi disediakan. Fermentasi dijalankan selama 10 hari pada suhu 30 °C. Fermentasi permukaan statik dijalankan menggunakan inkubator jenama BINDER, model BD53, manakala fermentasi goncang dijalankan menggunakan inkubator goncang jenama VISION daripada Scientific Company Limited, model VS-8480. Halaju goncang ditetapkan pada 150 rpm. Parameter yang dianalisis ialah berat kering SB, kepekatan karbohidrat, kepekatan asid glukonik dan pH medium.

Jadual 5.1 Perincian luas permukaan dan isipadu medium

	Luas permukaan, L(cm ²)	Nisbah luas permukaan kepada isipadu medium L(cm ²):I(mL)	Keterangan
250 mL kelalang kon	55.91	1.40	Luas besar
100 mL kelalang kon	33.46	0.84	Luas sederhana
50 mL tabung uji	4.84	0.12	Luas kecil

Setelah keputusan perbandingan kultur fermentasi diperolehi, luas permukaan medium dijalankan untuk kultur fermentasi yang paling efisien di antara permukaan statik dan goncang. Perincian luas permukaan dan isipadu medium ditunjukkan dalam Jadual 5.1. Isipadu medium ditetapkan kepada 40 mL bagi setiap luas permukaan yang dikaji. Ketiga-tiga peralatan yang digunakan iaitu 50 mL tabung uji (4.84 cm²), kelalang kon 100 mL (33.46 cm²), dan kelalang kon 250 mL (55.91 cm²), mewakili nisbah luas permukaan kepada isipadu medium sebagai 0.12, 0.84 dan 1.4. Fermentasi dijalankan secara permukaan statik selama 10 hari pada suhu 30 °C.

Parameter yang dianalisis ialah berat kering SB, kepekatan karbohidrat, kepekatan asid glukonik dan pH medium.

Kajian pH awalan medium adalah sambungan daripada kajian kultur fermentasi dan luas permukaan. Kajian pH awalan dijalankan menggunakan nisbah L/I yang paling efisien dan di antara kultur fermentasi statik dan goncang. Nilai pH awalan ditetapkan dalam julat 5.0 ke 6.5 iaitu 5.0, 5.5, 6.0 dan 6.5. Fermentasi dilakukan dalam kelalang kon bersaiz 100 mL dengan isipadu medium 40 mL secara fermentasi permukaan statik. Sebanyak 12 kelalang kon diperlukan untuk setiap nilai pH. Fermentasi dijalankan selama 12 hari pada 30 °C. Satu kelalang daripada setiap pH awalan akan dikeluarkan daripada inkubator setiap hari untuk dianalisis. Parameter yang dianalisis ialah berat kering SB, kepekatan karbohidrat, kepekatan asid glukonik dan pH medium.

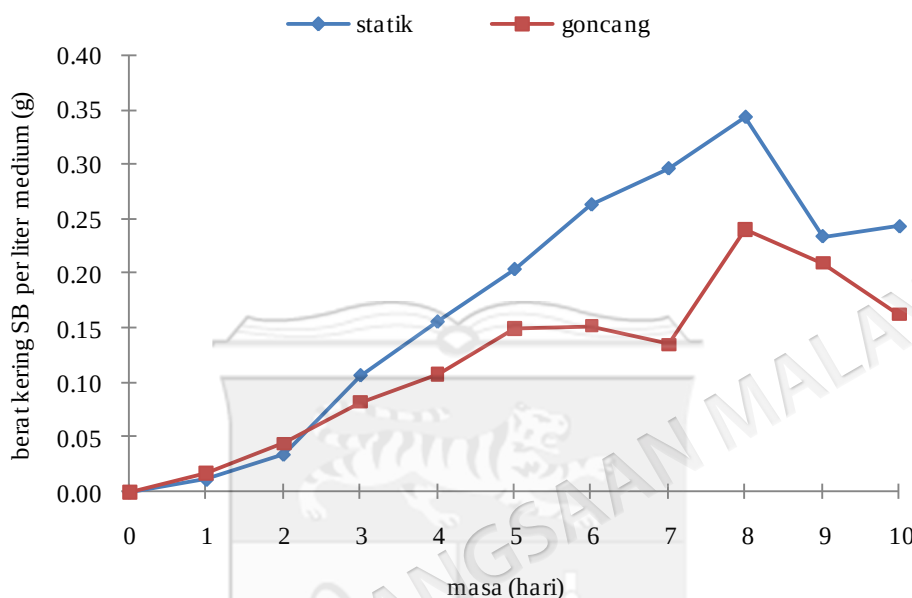
5.2 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

5.2.1 Kesan Kultur Permukaan Statik dan Goncang Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria

Rajah 5.1 menunjukkan bahawa berat kering SB dalam kultur permukaan statik adalah 1.43 kali lebih tinggi berbanding kultur goncang. Dalam keadaan statik, SB dihasilkan sebanyak 0.343 g/L dan produktiviti maksimum, 0.043 g/L.hari⁻¹. Berat kering SB bagi kultur statik dan goncang meningkat secara linear hingga mencapai maksimum pada hari ke-8. Kepekatan SB maksimum bagi kultur goncang ialah 0.240 g/L.

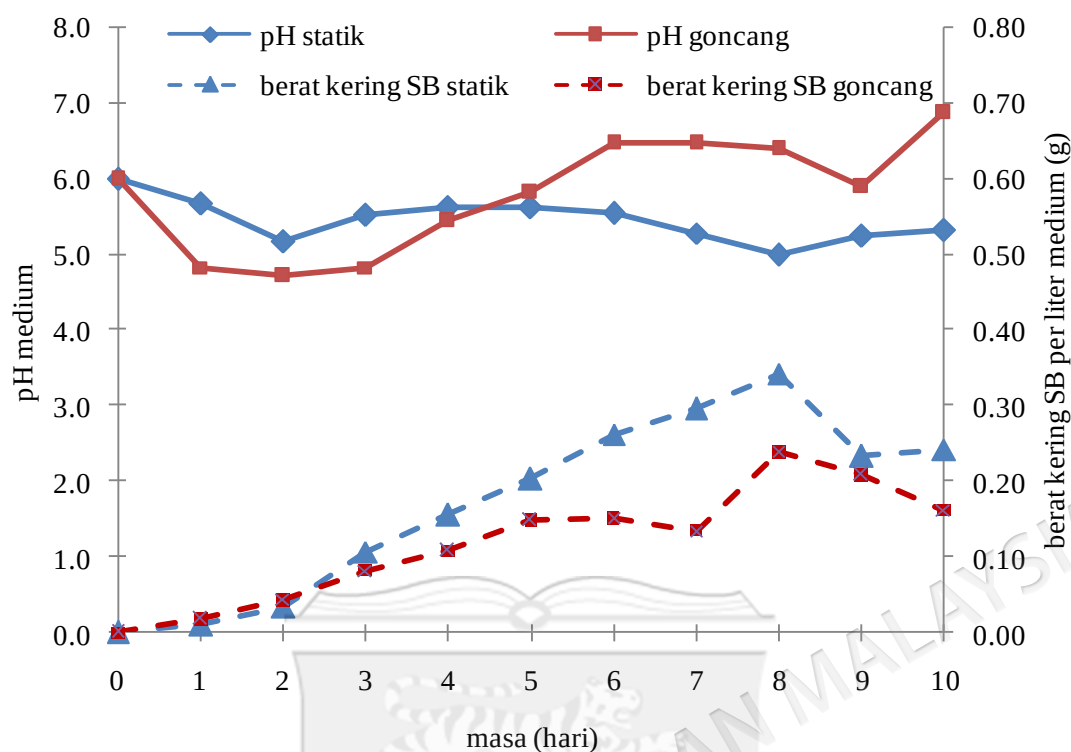
Proses penghasilan SB dalam goncang lebih kompleks kerana wujud pengaruh lain dalam medium yang ditunjukkan oleh profil graf yang tidak konsisten. Hwang et al. (1999) menyatakan bahawa produktiviti selulosa dalam kultur goncang lebih rendah berbanding statik kerana wujudnya ketidakstabilan genetik bagi strain penghasil selulosa dan pertumbuhan berlebihan secara berkala bagi strain bukan penghasil selulosa. Strain *Acetobacter* berupaya menjadi bukan penghasil selulosa dalam keadaan goncang pada kepekatan oksigen terlarut yang tinggi dan menghadkan jumlah selulosa yang dihasilkan. Oleh itu, produktiviti yang tinggi selulosa per unit

isipadu bagi fermentasi goncang belum lagi dinyatakan dalam mana-mana laporan. Kesimpulan daripada kajian ini ialah kultur fermentasi statik berupaya menghasilkan SB lebih tinggi berbanding goncang. Oleh itu, fermentasi permukaan statik akan menjadi kultur untuk kajian parameter fermentasi yang seterusnya.



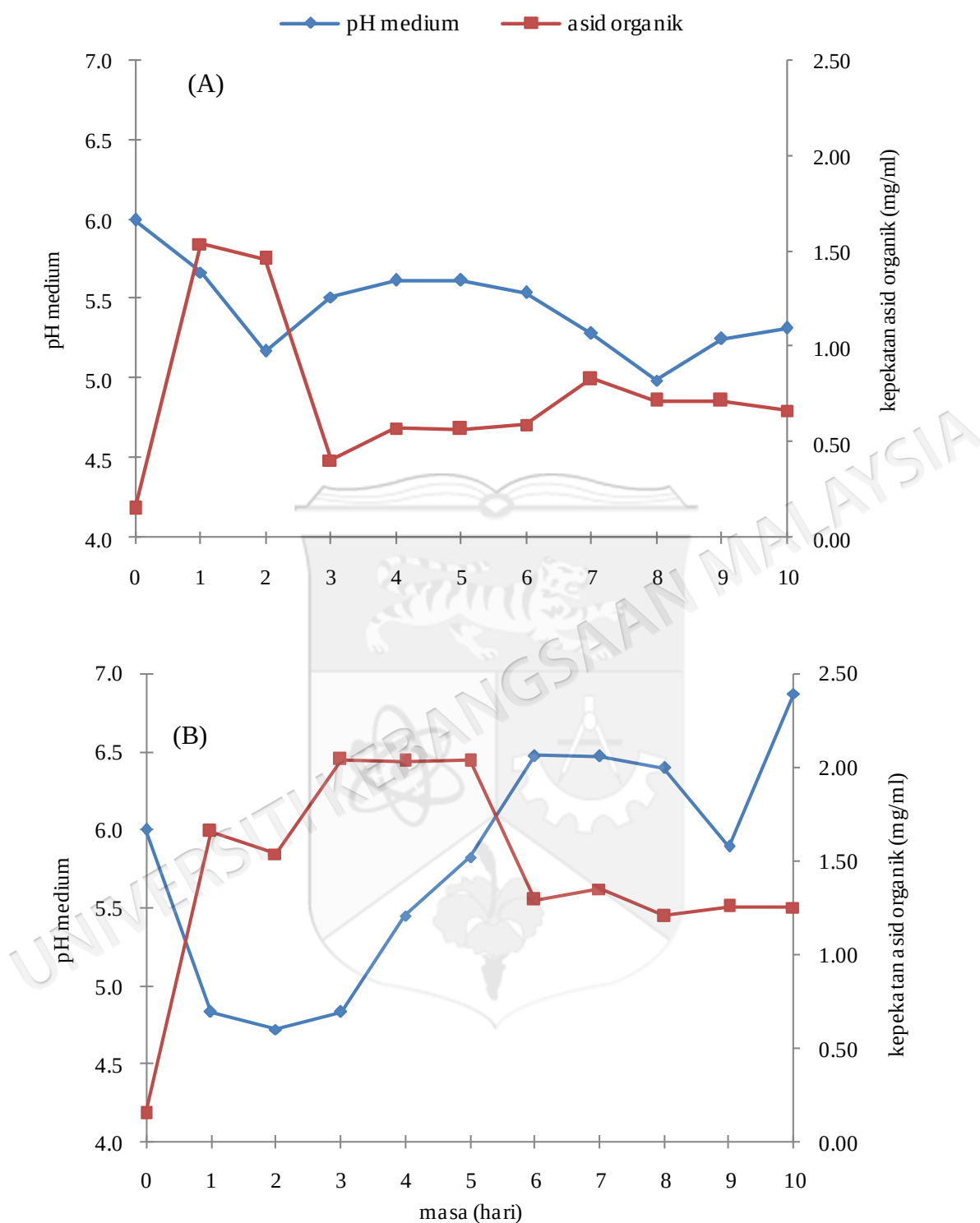
Rajah 5.1 Perbandingan berat kering SB dalam kultur permukaan statik dan goncang

Rajah 5.2 menunjukkan perbandingan nilai pH medium dan berat kering SB terhadap masa fermentasi untuk kultur permukaan statik dan kultur goncang. Julat pH medium bagi kultur permukaan statik adalah lebih kecil iaitu minimum pada 4.99 dan maksimum pada 6.0. Julat pH medium bagi kultur goncang lebih besar dengan minimum pada 4.72 dan maksimum pada 6.88. Perbezaan nilai pH medium ini mempengaruhi penghasilan SB dalam kedua-dua kultur. Bagi kultur permukaan statik, penghasilan berat kering maksimum dicapai pada hari ke-8 pada nilai pH medium yang paling rendah iaitu 4.99. Kenaikan pH medium selepas hari ke-8 bagi kultur permukaan statik, dan hari ke-9 bagi kultur goncang berkemungkinan disebabkan oleh pengurangan kuantiti bakteria yang masih hidup dalam kedua-dua medium. Fenomena ini mengurangkan gas karbon dioksida, CO_2 yang berasid dalam medium.



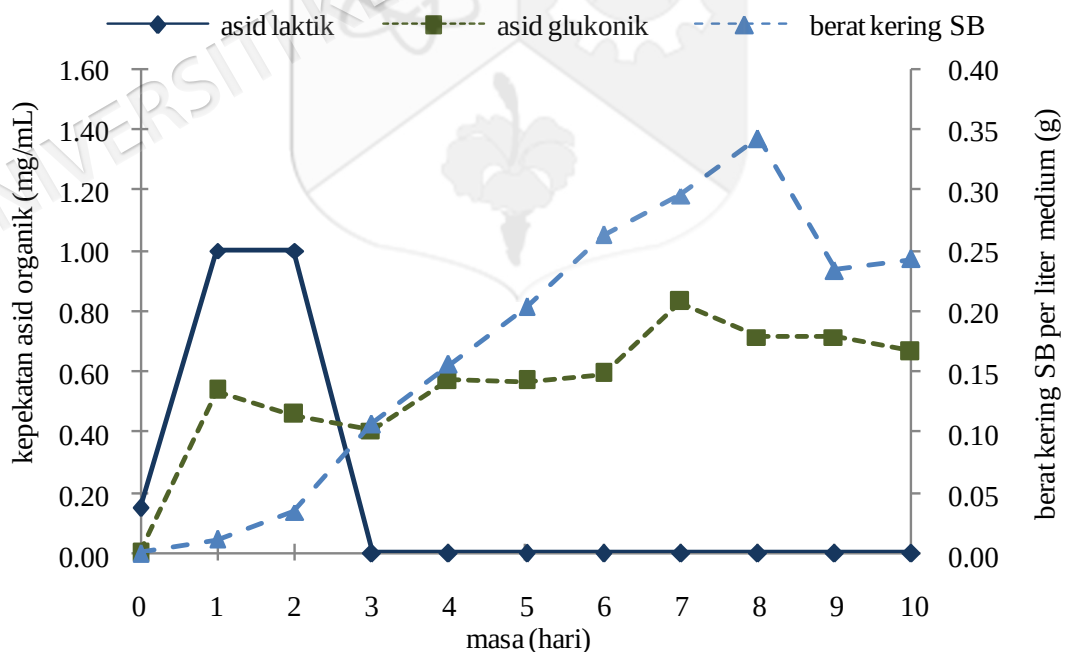
Rajah 5.2 Perbandingan pH medium dan berat kering SB dalam kultur permukaan statik dan guncang

Berbeza dengan kultur guncang, penghasilan SB maksimum diperolehi pada nilai pH medium yang agak tinggi iaitu 6.4. Nilai pH medium untuk penghasilan SB oleh *A. xylinum* 0416 dipengaruhi oleh kuantiti asid asid laktik dan asid glukonik yang terhasil semasa pertumbuhan. Profil pH dan kepekatan asid organik dalam medium ditunjukkan dalam Rajah 5.3. Nilai pH medium adalah berkurangan dengan peningkatan kepekatan kedua-dua asid dalam medium bagi kedua-dua kultur. Ini membuktikan bahawa kepekatan asid laktik dan asid glukonik mempengaruhi nilai pH medium dan penghasilan SB. Keputusan ini menyamai laporan oleh Hwang et al. (1999) yang menyatakan bahawa pertukaran glukosa kepada asid organik dalam kultur kelompok akan merendahkan pH medium. Yang et al. (1998) pula menyatakan bahawa apabila strain *A. xylinum* BRCS dihidupkan di dalam fermenter menggunakan sumber karbon glukosa, kebanyakan glukosa ditukarkan kepada asid glukonik. Oleh itu, asid glukonik akan bertambah dalam brot yang menghasilkan selulosa tersebut seterusnya merendahkan pH medium. Merujuk kepada Rajah 5.3, asid organik yang dimaksudkan ialah campuran kepekatan asid glukonik dan asid laktik di dalam medium.



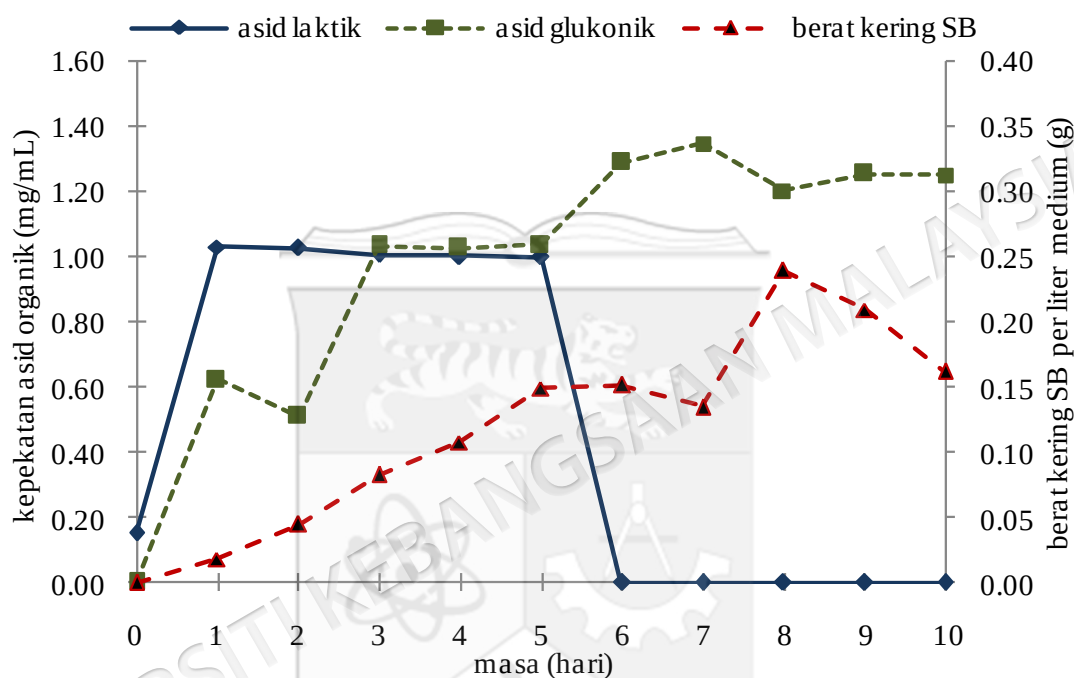
Rajah 5.3 Profil pH dan kepekatan asid organik dalam kultur (A) permukaan statik dan (B) goncang

Rajah 5.4 menunjukkan perubahan kepekatan asid laktik dan asid glukonik dalam kultur permukaan statik. Asid laktik bagi kultur permukaan statik tidak mempengaruhi penghasilan SB pada permulaan inkubasi yang ditunjukkan dengan graf yang mendatar. Namun begitu keperluan kepada asid laktik yang drastik diperhatikan pada hari ke-2 sehingga berkepekatan sifar pada hari ke-3. Keadaan ini dipercayai kerana asid laktik diperlukan semasa proses penggandaan sel untuk penghasilan SB (Matsuoka et al. 1996). Naritomi et al. (1998a) menyatakan bahawa dalam kultur kelompok yang menggunakan laktat sebagai satu-satunya sumber substrat, sebanyak 77% laktat dioksidakan kepada karbon dioksida, CO_2 dan hanya 6.9% ditukarkan kepada SB. Ini menunjukkan laktat berfungsi sebagai sumber tenaga, bukan sebagai substrat untuk biosintesis SB. Laktat dehidrogenase mengoksidakan laktat kepada piruvat oleh *A. xylinum*, dan piruvat yang dijana dimetabolismekan dalam kitaran TCA. Namun begitu, *A. xylinum* tidak menghasilkan SB daripada piruvat tersebut (Schramm et al. 1957a). Laktat juga berfungsi merangsang pertumbuhan sel bagi BPR2001 semasa peringkat awal kultur kelompok dengan menghubungkan dengan rantai pernafasan dan menjana tenaga untuk pertumbuhan (Matsuoka et al. 1996).



Rajah 5.4 Perubahan kepekatan asid laktik dan glukonik dalam kultur permukaan statik

Kepekatan asid glukonik pula menunjukkan sedikit penurunan bermula dari permulaan fermentasi sehingga hari ke-3. Pertambahan kepekatan asid glukonik diperhatikan pada hari ke-3 sehingga hari ke-7 disebabkan oleh berlakunya pembentukan SB bersama-sama asid glukonik yang merupakan produk sampingan fermentasi. Namun begitu, kehadiran asid glukonik dalam medium mengawal pH medium pada pH yang menggalakkan penghasilan SB bagi kultur permukaan statik.

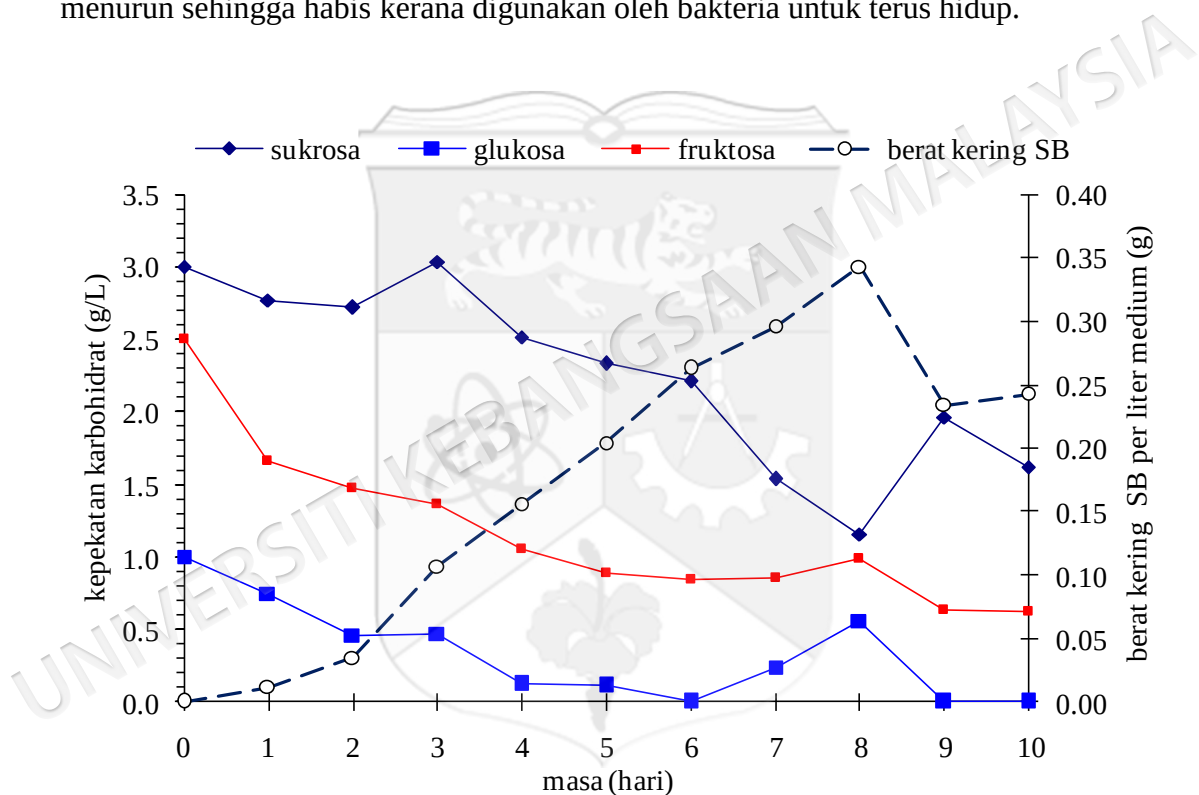


Rajah 5.5 Perubahan kepekatan asid laktik dan glukonik dalam kultur goncang

Rajah 5.5 menunjukkan perubahan kepekatan asid laktik dan asid glukonik dalam kultur goncang semasa pertumbuhan dan penghasilan SB oleh *A. xylinum* 0416. Asid laktik bagi kultur goncang tidak mempengaruhi penghasilan SB yang ditunjukkan dengan graf yang mendatar. Namun begitu keperluan kepada asid laktik yang drastik diperhatikan pada hari ke-5 sehingga sifar pada hari ke-6. Kepekatan asid glukonik pula menunjukkan peningkatan dari awal dan maksimum pada hari ke-7 fermentasi.

Rajah 5.6 menunjukkan perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat bagi kultur permukaan statik. Ditunjukkan bahawa penggunaan glukosa, fruktosa dan sukrosa digunakan serentak oleh sel. Namun begitu, terdapat kecenderungan

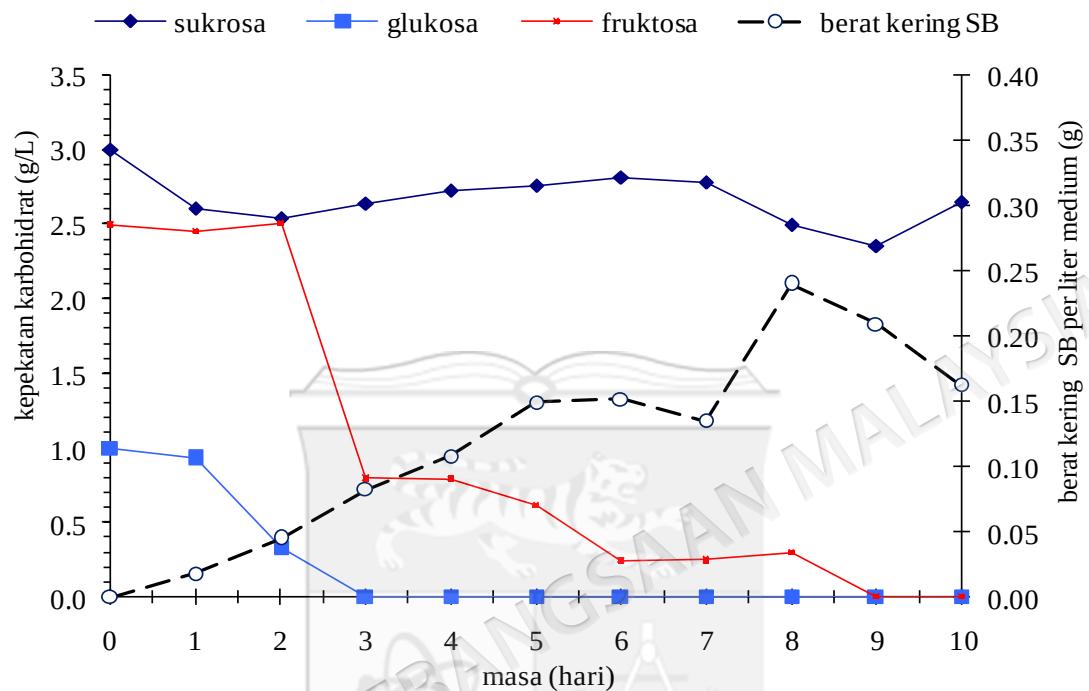
penggunaan substrat tertentu oleh strain *A. xylinum* 0416. Ini ditunjukkan dengan kepekatan glukosa yang sifar pada hari ke-6. Selepas hari ke-6, kepekatan glukosa kembali meningkat menunjukkan wujudnya penguraian sukrosa (disakarida) kepada glukosa dan fruktosa (monosakarida). Diperhatikan juga bahawa peningkatan kepekatan glukosa dari hari ke-6 hingga hari ke-8 adalah serentak dengan peningkatan penghasilan SB. Dapat disimpulkan bahawa selepas hari ke-6 penguraian sukrosa kepada glukosa dan fruktosa adalah dalam kuantiti yang banyak di mana sebahagiannya digunakan untuk penghasilan SB. Sehingga hari ke-8, kepekatan sukrosa menurun dengan masa fermentasi. Selepas hari ke-8 kepekatan glukosa kekal menurun sehingga habis kerana digunakan oleh bakteria untuk terus hidup.



Rajah 5.6 Perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat dalam kultur permukaan statik

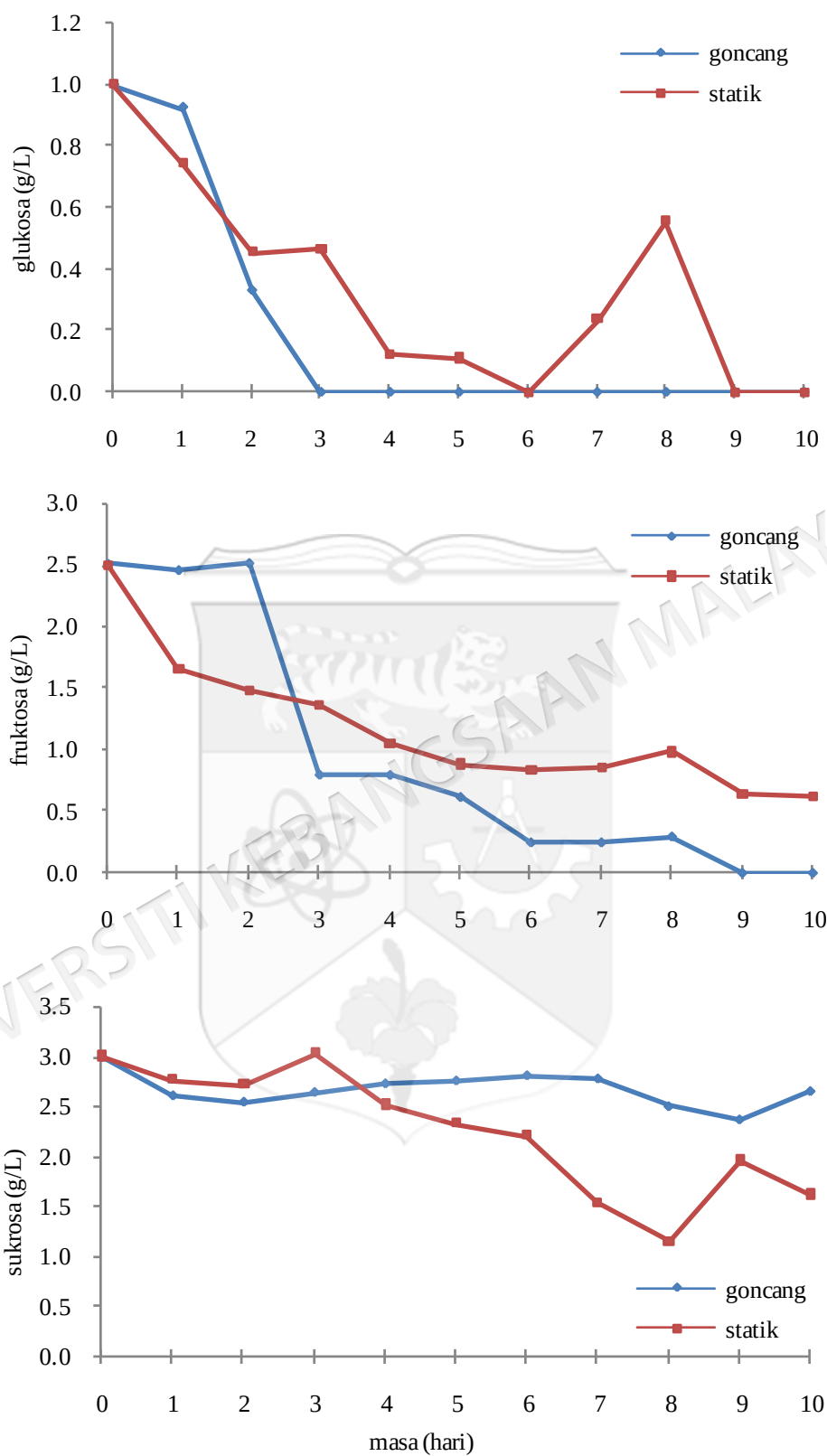
Rajah 5.7 menunjukkan perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat dalam kultur goncang. Glukosa habis digunakan pada hari ke-3, diikuti dengan fruktosa habis pada hari ke-9. Kepekatan sukrosa terendah dicatatkan pada hari ke-9 pada nilai 2.359 g/L. Kepekatan sukrosa terdapat sedikit pengurangan pada awalnya (hari 0-2) tetapi naik semula sehingga hari ke-7. Penurunan kepekatan sukrosa selepas hari ke-7, menunjukkan bahawa ia digunakan untuk penghasilan SB setelah

glukosa dan fruktosa habis. Daripada graf juga menunjukkan bahawa penggunaan substrat adalah berturutan dimulai dengan glukosa, diikuti fruktosa dan terakhir sukrosa.



Rajah 5.7 Perkaitan berat kering SB dan kepekatan karbohidrat dalam kultur goncang

Rajah 5.8 menunjukkan profil kepekatan karbohidrat bagi kultur permukaan statik dan goncang bagi CWHSM bagi kedua-dua kultur. Kadar penggunaan glukosa lebih cepat berbanding fruktosa dan sukrosa. Keadaan ini mencadangkan dua kesimpulan iaitu kecenderungan strain *A. xylinum* 0416 untuk memilih substrat paling sesuai untuk penghasilan SB dan faktor kuantiti glukosa, fruktosa dan sukrosa dalam medium dengan kepekatan awal masing-masing (nilai kepekatan pada masa $t=0$ hari) 1.0 g/L, 2.5 g/L dan 3.0 g/L seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 5.8 tersebut.



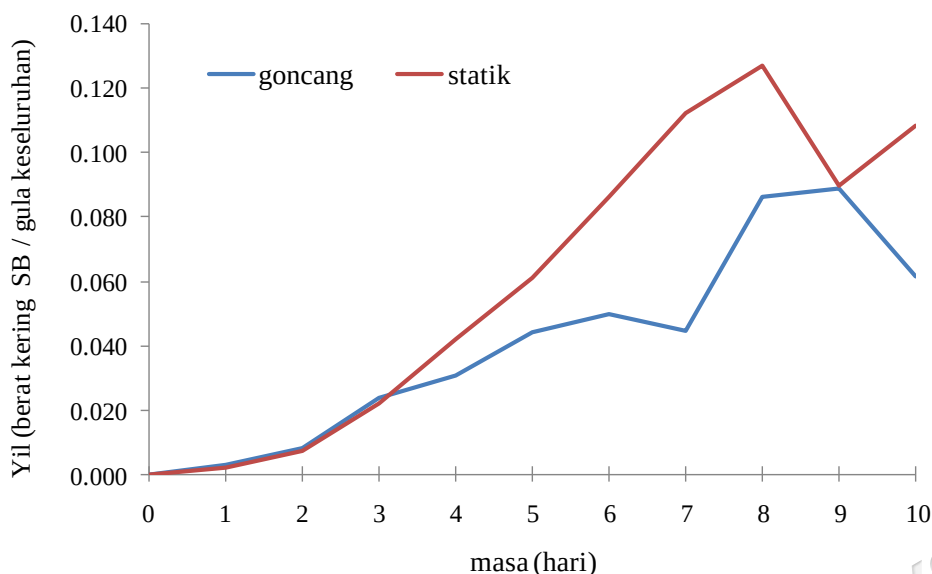
Rajah 5.8 Profil kepekatan karbohidrat bagi kultur permukaan statik dan goncang dalam CWHSM

Berdasarkan Hwang (1999), fasa pertumbuhan sel adalah sama dengan fasa penghasilan SB yang dikategorikan sebagai pertumbuhan berkait '*growth associated*'. Kesukaran menentukan biojisim sel, menghadkan pengiraan kadar pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak}) iaitu parameter penting fermentasi. Kaedah anggaran iaitu dengan mengambil kira keluk penghasilan SB dapat membantu menganggar pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak}) dan masa penggandaan (t_d) bagi kultur permukaan statik dan goncang dalam CWHSM. Jadual 5.2 ditentukan daripada Rajah 5.6 bagi CWHSM statik dan Rajah 5.7 bagi CWHSM goncang.

Jadual 5.2 Kadar pertumbuhan spesifik maksimum dan masa penggandaan bagi CWHSM

	Kadar pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak})	Masa penggandaan (t_d)
CWHSM statik	0.380 hari ⁻¹	1.82 hari
CWHSM goncang	0.279 hari ⁻¹	2.48 hari

Rajah 5.9 menunjukkan yil SB dalam kultur permukaan statik dan goncang yang ditentukan daripada nilai berat kering SB kepada kepekatan gula keseluruhan. Nilai kepekatan awal gula keseluruhan bagi kajian ini ialah 6.5 g/L. Yil tertinggi diperolehi oleh statik pada hari ke-8 (0.127 g SB/g gula keseluruhan). Kebanyakan laporan yil adalah menfokuskan kepada substrat glukosa dan tiada laporan yil bagi gula keseluruhan. Hwang et al. (1999) menyatakan bahawa sekiranya kepekatan glukosa awal kurang daripada 20 g/L, $Y_{P/S}=0.21$, sekiranya kepekatan awal adalah 40 g/L, $Y_{P/S}=0.13$. Produktiviti maksimum dicapai oleh kultur permukaan statik pada hari ke-8 iaitu 0.043 g/L.hari⁻¹.



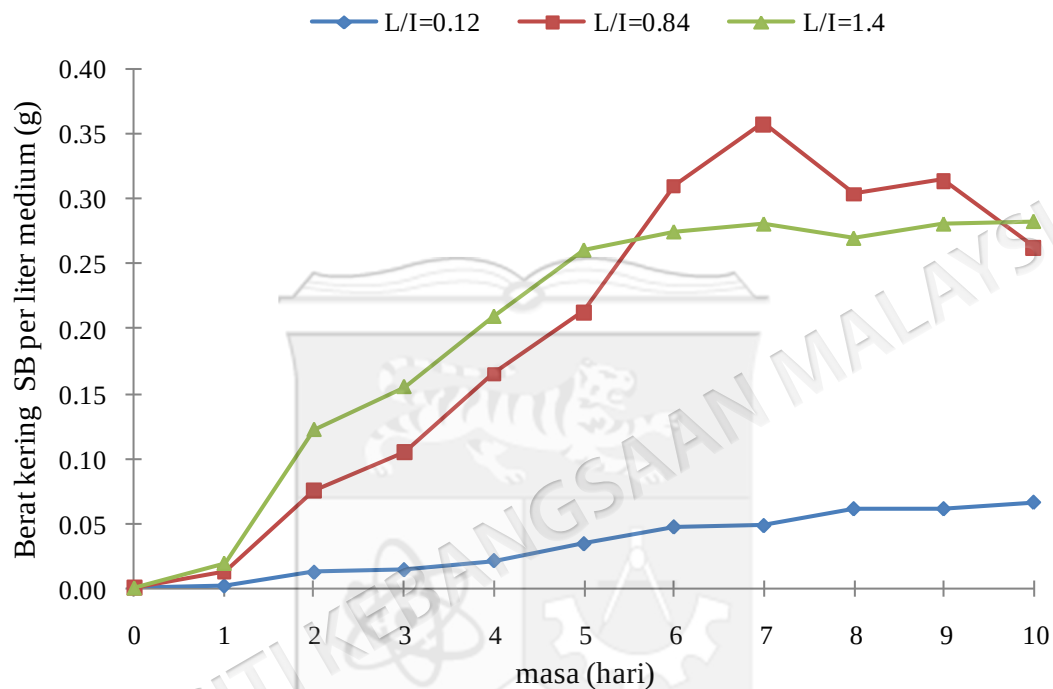
Rajah 5.9 Yil SB dalam kultur permukaan statik dan goncang bagi CWHSM

5.2.2 Kesan Luas Permukaan Medium Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria

Rajah 5.10 menunjukkan perkaitan nisbah luas permukaan (L) kepada isipadu (I) terhadap penghasilan SB. Bermula dari awal fermentasi sehingga hari ke-5, luas permukaan medium (A) adalah berkadar dengan SB yang dihasilkan. Selepas hari ke-5, nisbah $L/I=0.84$ menunjukkan kadar penghasilan SB lebih tinggi berbanding nisbah yang lain, sehingga mencapai maksimum pada hari ke-7 dengan 0.358 g SB per liter medium. Keputusan kajian ini adalah bersamaan dengan Masaoka et al. (1993) yang menyatakan bahawa isipadu dan kedalaman medium tidak mempengaruhi penghasilan SB dan kadar penghasilan SB berkadar terus dengan luas permukaan medium untuk masa fermentasi kurang daripada 4 hari. Selain itu, mereka juga mendapati bahawa penghasilan SB bergantung kepada luas permukaan medium sekiranya nisbah luas permukaan kepada isipadu (L/I) adalah dalam julat 0.13-1.0.

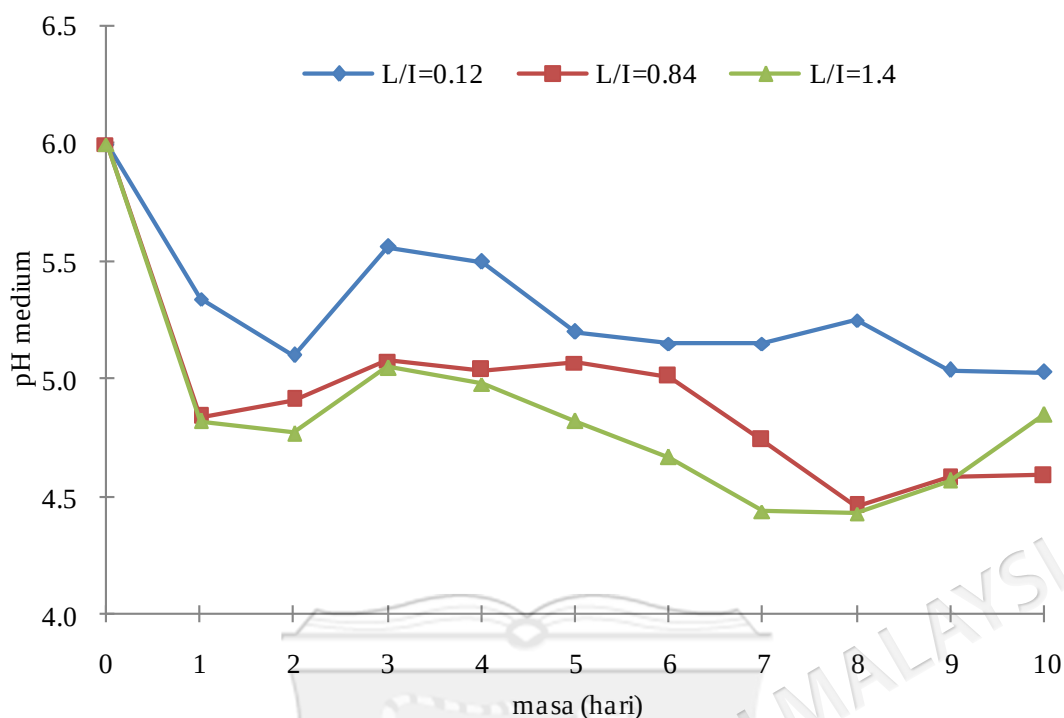
Dalam kajian ini hanya $L/I=0.84$ yang dipengaruhi oleh luas permukaan medium manakala penghasilan SB bagi $L/I=1.4$ dan $L/I=0.12$ tidak dipengaruhi oleh luas permukaan medium. Fenomena penghasilan SB dalam kultur statik dijelaskan oleh Borzani & Souza (1995) iaitu penghasilan SB adalah di bahagian atas pelikel iaitu di antara muka udara dan cecair. Apabila pelikel menjadi semakin tebal, sel yang

menghasilkan SB dan sumber nutrien lebih sukar untuk menembusi pelikel untuk ke permukaan medium (Jonas & Luiz 1998), menyebabkan penghasilan SB berkurangan. Sebagai jalan penyelesaian kepada ketebalan pelikel ini, SB boleh dikeluarkan daripada kelalang setelah mencapai ketebalan yang diinginkan. Kitar fermentasi diteruskan lagi bagi medium yang masih tersisa dalam kelalang sehingga selesai.



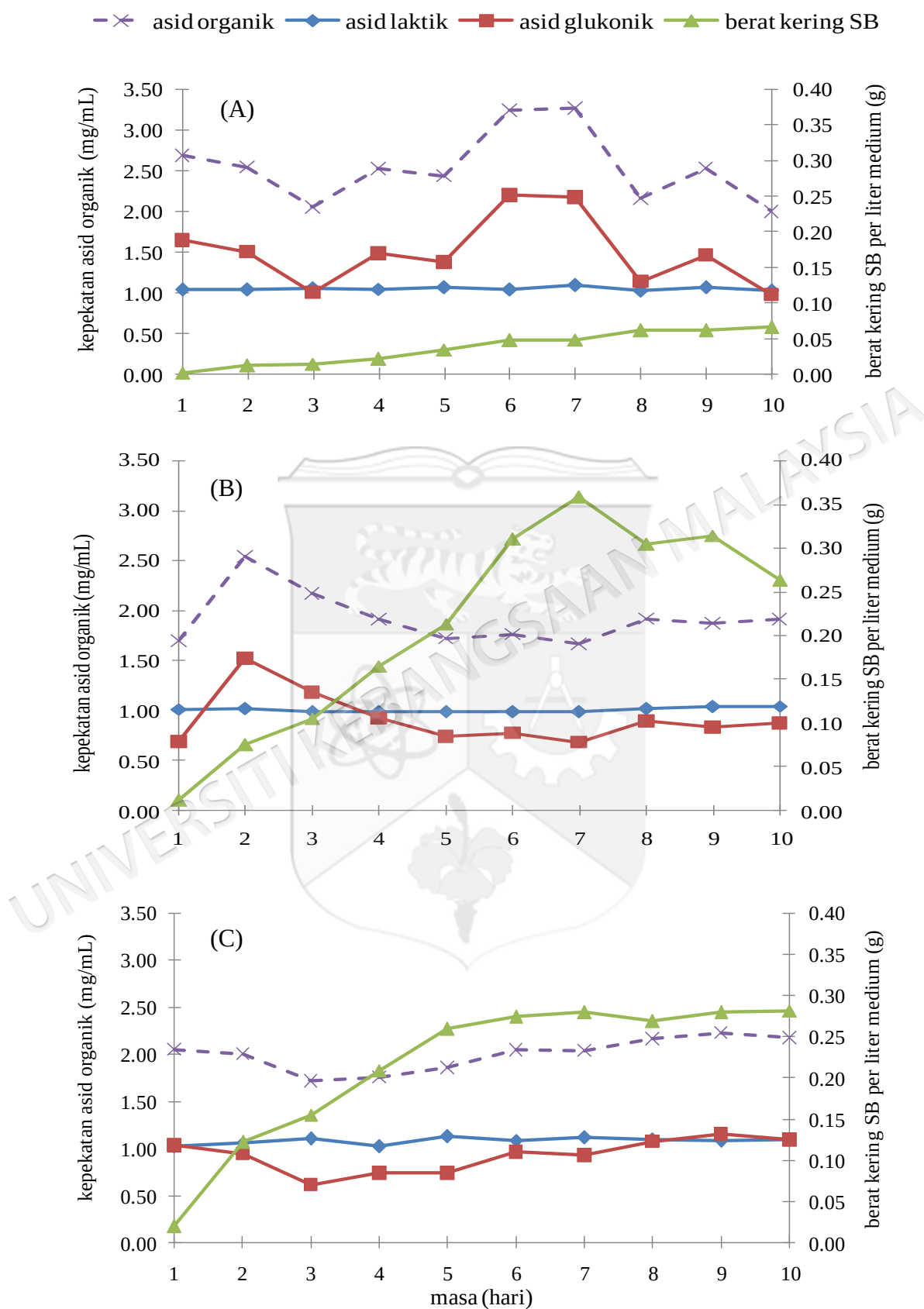
Rajah 5.10 Perkaitan nisbah luas permukaan kepada isipadu (L/I) terhadap penghasilan SB

Rajah 5.11 menunjukkan nilai pH medium bagi nisbah L/I yang berbeza. Pada nisbah L/I=1.4 terdapat lebih bekalan oksigen kepada medium dan sel menyebabkan banyak sel berada di permukaan medium untuk penghasilan SB. Keadaan ini merendahkan pH medium kerana respirasi berlebihan oleh sel dengan penghasilan gas karbon dioksida, CO_2 sehingga medium menjadi lebih berasid dan berada dalam julat pH yg tidak optimum untuk menghasilkan SB. Medium berasid juga disebabkan oleh penukaran glukosa kepada asid glukonik semasa penghasilan SB.

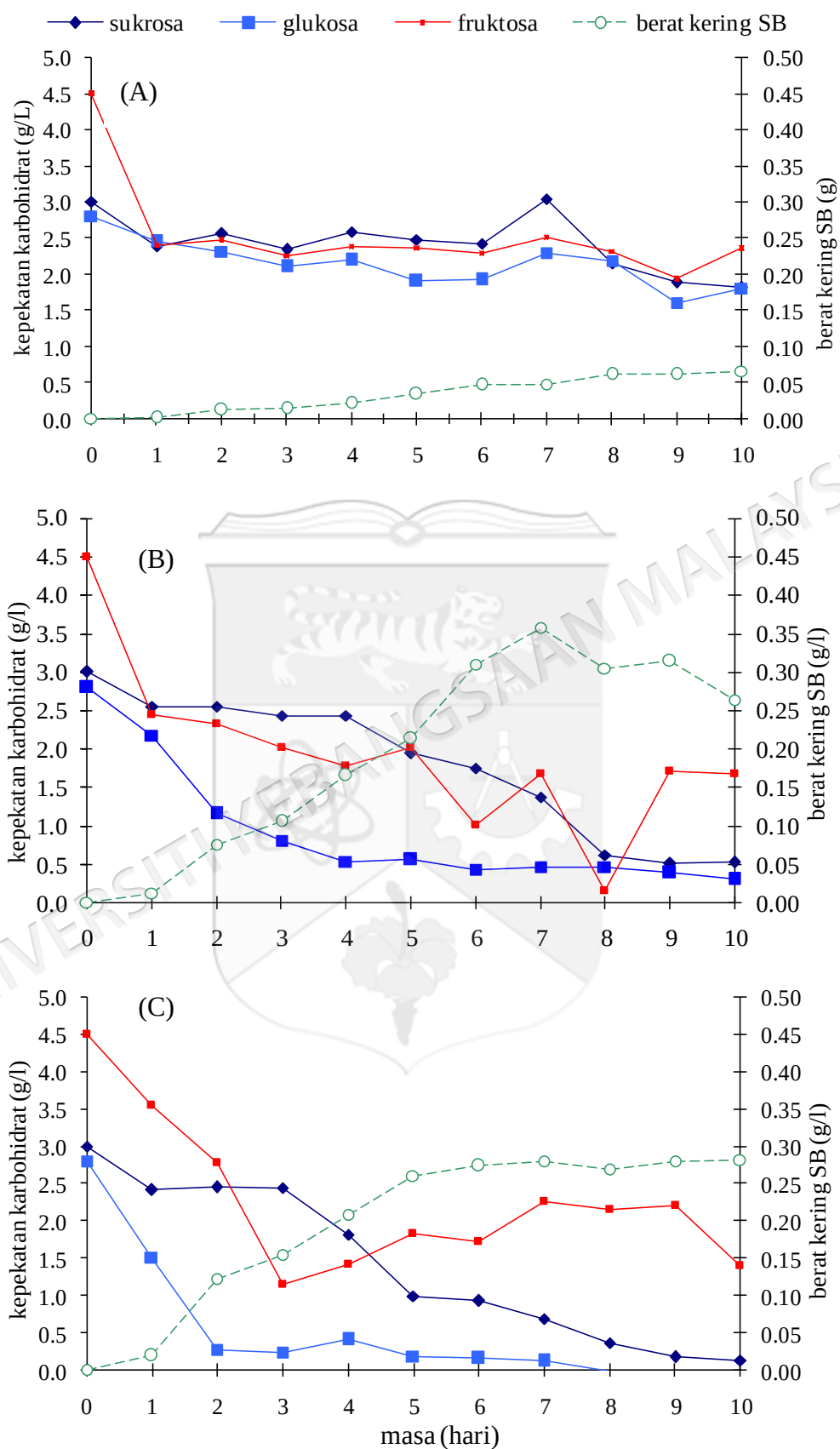


Rajah 5.11 Nilai pH medium bagi nisbah L/I yang berbeza

Rajah 5.12 menunjukkan perkaitan kepekatan asid organik (asid laktik dan asid glukonik) dan berat kering SB bagi nisbah L/I=0.12, 0.84 dan 1.4. Nisbah L/I=0.12 memberikan penghasilan SB minimum tetapi kepekatan asid yang lebih tinggi berbanding L/I=0.84 dan 1.4. Kepekatan asid glukonik paling tinggi pada hari ke-6 mencadangkan bahawa pada nisbah L/I yang kecil, kebanyakan substrat ditukarkan kepada asid glukonik dan penukaran kepada SB adalah amat kecil peratusannya. Nisbah L/I=0.84 memberikan berat kering SB maksimum pada hari ke-7, dan kepekatan asid tinggi pada hari kedua dipercayai kerana pengumpulan asid glukonik dan asid laktik semasa fasa eksponen. Asid laktik berperanan menggalakkan pertumbuhan sel seterusnya meningkatkan menghasilkan SB. Nisbah L/I=1.4 pula mempunyai perlakuan penghasilan SB yang hampir sama dengan L/I=0.84 semasa awal fermentasi sehingga hari ke-6. Selepas itu, penghasilan SB menjadi malar berkemungkinan disebabkan oleh penggunaan substrat berlebihan oleh strain di permukaan medium yang paling besar. Bagi ketiga-tiga nisbah L/I tersebut, jelas menunjukkan bahawa kepekatan asid glukonik adalah dominan berbanding asid laktik serta mempengaruhi penghasilan SB dengan ketara.



Rajah 5.12 Perkaitan kepekatan asid organik dan berat kering SB bagi nisbah (A) $L/I=0.12$ (B) $L/I=0.84$ dan (C) $L/I=1.4$



Rajah 5.13 Perkaitan kepekatan karbohidrat dan berat kering SB bagi nisbah (A) L/I=0.12 (B) L/I=0.84 dan (C) L/I=1.4

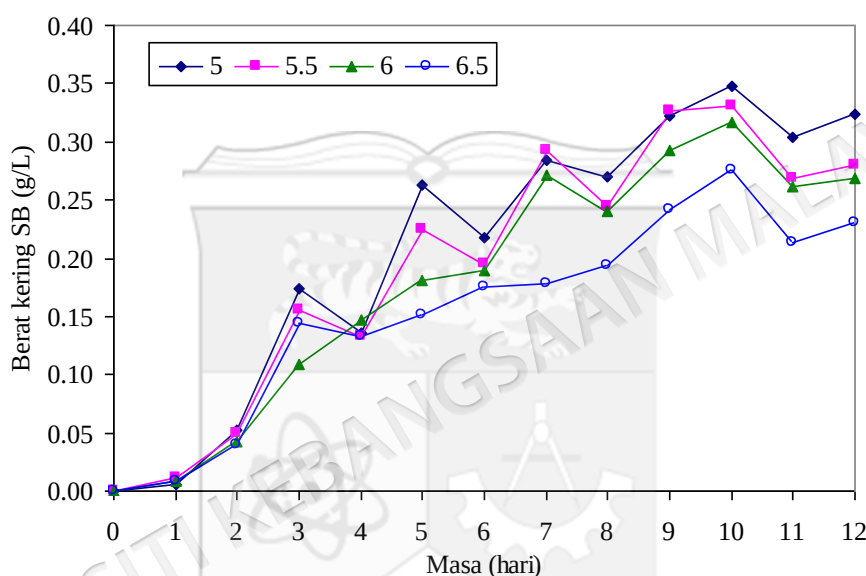
Rajah 5.13 menunjukkan perkaitan kepekatan karbohidrat dan berat kering SB bagi nisbah $L/I=0.12$, $L/I=0.84$ dan $L/I=1.4$. Bagi ketiga-tiga nisbah tersebut menunjukkan bahawa kadar penggunaan karbohidrat adalah berkadaran dengan luas permukaan medium. Selain itu, glukosa, fruktosa dan sukrosa digunakan serentak oleh sel dalam ketiga-tiga keadaan. Karbohidrat tidak digunakan sehingga habis oleh strain *A. xylinum* 0416 dalam $L/I=0.12$ dan masih terdapat lebih substrat yang besar dlm medium. Bagi $L/I=0.84$ pula menunjukkan kadar penggunaan karbohidrat yang lebih cepat berbanding $L/I=0.12$ dan penggunaan substrat adalah berkadar langsung dengan penghasilan SB. Sebaliknya bagi $L/I=1.4$ menunjukkan kadar penggunaan karbohidrat yang cepat dengan glukosa habis sebelum hari ke-8 fermentasi dipercayai dioksidakan kepada asid glukonik dan digunakan serentak untuk penghasilan SB. Keputusan ini mencadangkan bahawa luas permukaan medium adalah perkadaran dengan kadar penggunaan substrat oleh strain *A. xylinum* 0416.

5.2.3 Kesan pH Awalan Medium Terhadap Penghasilan Selulosa Bakteria

Rajah 5.14 menunjukkan berat kering SB untuk setiap pH awalan dari 5.0 ke 6.5. Hwang et al. (1999) menyatakan bahawa proses fermentasi SB meliputi (i) fasa lag atau fasa induksi, (ii) fasa pengumpulan asid glukonik, (iii) pertumbuhan sel atau fasa penghasilan SB dan (iv) fasa pegun. Penghasilan SB dikategorikan sebagai pertumbuhan berkait '*growth associated*' iaitu pertumbuhan sel dan penghasilan SB adalah dalam fasa yang sama. Rajah 5.14 juga mewakili profil pertumbuhan sel untuk setiap pH awalan yang dikaji. Tiada fasa lag atau fasa induksi yang ketara ditunjukkan dalam graf ini. Pengumpulan asid glukonik berlaku dari hari 0 hingga 1 dengan penurunan pH medium yang ketara. Semasa fasa ini, asid laktik telah digunakan oleh sel untuk menggalakkan pertumbuhan dan bersedia untuk penghasilan SB. Telah dilaporkan oleh Matsuoka et al. (1996) bahawa laktat akan menggalakkan pertumbuhan sel dan penghasilan SB. Penambahan asid laktik akan memperbaiki pertumbuhan sel pada fasa awal kultur dan ia akan habis digunakan selepas 10 jam.

Graf menunjukkan bahawa fasa pertumbuhan sel dan penghasilan SB berlaku dari hari 1 hingga 10 fermentasi. Kadar penghasilan SB meningkat dengan penurunan pH awalan medium. Berat kering SB tertinggi diperolehi dengan pH awalan 5.0.

Ringkasan berat kering SB adalah $5.0 > 5.5 > 6.0 > 6.5$. Fermentasi pada pH awalan 6.5 adalah sangat perlahan berbanding yang lain. Memulakan fermentasi pada pH menghampiri neutral (7.0), tidak memberikan kebaikan untuk penghasilan SB dan strain *A. xylinum*, di mana keadaan ini tidak membantu mengaktifkan strain untuk menghasilkan SB dengan lebih banyak. Fasa pegun pula dikenalpasti berlaku dari hari 10 hingga 12 yang ditunjukkan dengan pengurangan berat kering SB bagi setiap nilai pH awalan medium.

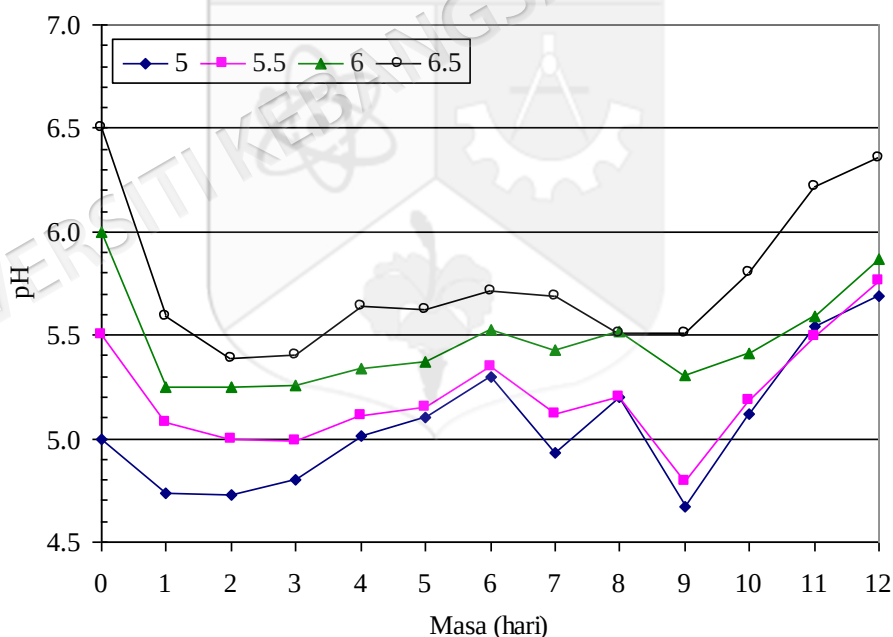


Rajah 5.14 Berat kering SB dalam pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi

Pergerakan garis bagi penghasilan SB oleh *A. xylinum* dalam kultur permukaan statik ditunjukkan dengan profil turun naik yang konsisten dengan masa fermentasi atau dikenali dengan 'perlakuan seperti ombak'. Perlakuan ini amat ketara ditunjukkan oleh pH 5.0, 5.5 dan separuh daripada pH 6.0 bermula dari hari ke-7. Perlakuan turun naik 'seperti ombak' ini dipercayai berlaku kerana wujudnya kombinasi proses pengkristalan dan pempolimeran dalam penghasilan SB seperti yang dilaporkan oleh Benziman et al. (1980). Keputusan ini dijelaskan oleh teori pengkristalan dan pempolimeran yang mewakili keseluruhan proses penghasilan SB.

Rajah 5.15 menunjukkan perlakuan pH medium sepanjang fermentasi. Menurut Hwang et al. (1999) pH 4.0 adalah sesuai untuk penukaran glukosa kepada

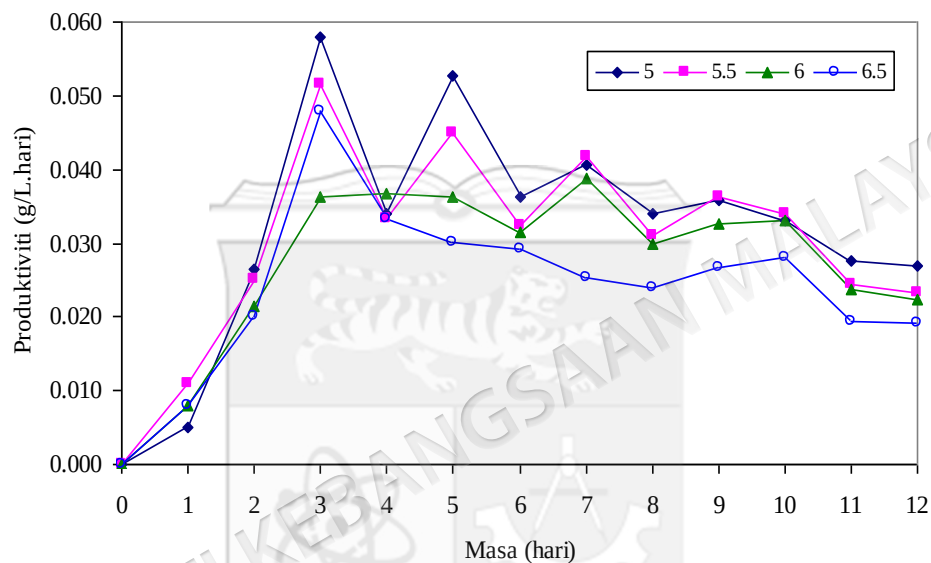
asid glukonik dan pH 5.0 diperlukan untuk pertumbuhan sel dan penghasilan selulosa bagi *Acetobacter xylinum* BRCS dalam kultur gancang. Daripada graf ini menunjukkan bahawa karbohidrat yang terdapat dalam medium ditukarkan kepada asid glukonik pada kadar yang berbeza dari hari 0-1. Namun begitu bagi pH 6.5 memerlukan lebih karbohidrat untuk ditukarkan kepada asid glukonik bagi menjadikan pH medium 5.6 pada hari pertama berbanding pH awalan yang lebih rendah, seperti 5.0 kepada pH medium 4.75 pada hari pertama. Lebih karbohidrat diperlukan untuk ditukarkan kepada asid glukonik menjadikan pengurangan karbohidrat atau karbohidrat penghad di dalam medium. Walaupun pH medium tidak sesuai untuk pertumbuhan sel dan penghasilan SB, sel-sel yang sedia ada akan cuba untuk menyediakan dirinya bagi keperluan fasa yang seterusnya. Merujuk kepada keputusan sebelum ini, dicadangkan bahawa pH yang sesuai untuk penukaran asid glukonik adalah dalam julat 4.7-5.0 dan pH untuk pertumbuhan sel dan penghasilan SB adalah 5.0-5.3.



Rajah 5.15 Nilai pH medium bagi setiap pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi

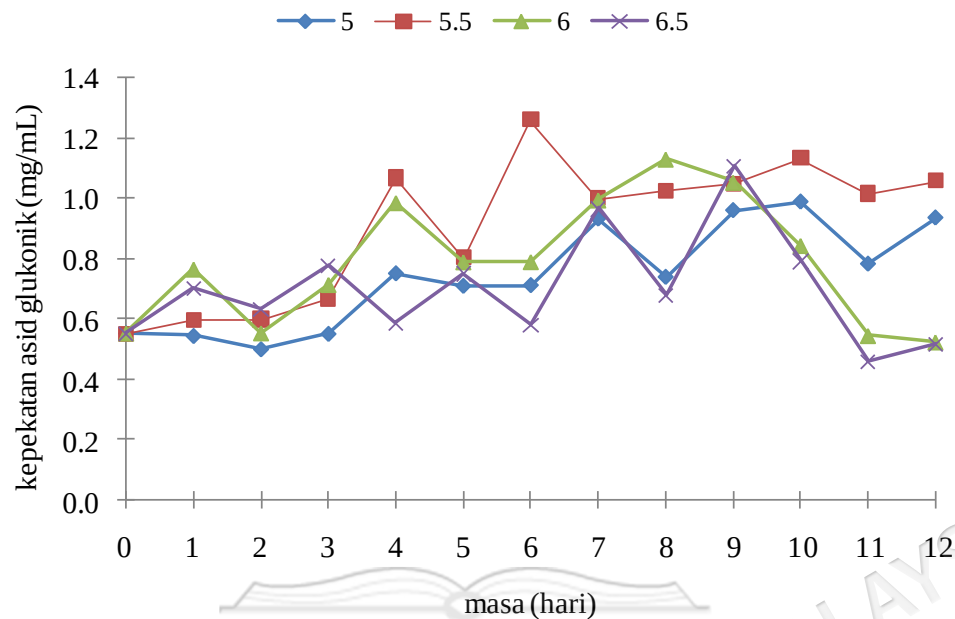
Rajah 5.16 menunjukkan produktiviti SB dalam pH awalan medium berbeza. Keputusan ini berkaitan langsung dengan berat kering SB. Produktiviti maksimum diperolehi oleh pH awalan 5.0 pada hari ketiga fermentasi dengan $0.058 \text{ g/L.hari}^{-1}$.

Penukaran maksimum asid glukonik kepada SB berlaku pada keadaan ini di mana keadaan optimum diperlukan untuk memberikan kadar penghasilan SB maksimum yang berlaku pada peringkat awal fasa penghasilan SB. Dalam keadaan ini dipercayai bahawa amaun asid glukonik yang berlebihan, pertumbuhan sel dan nutrien yang mencukupi dapat menggalak produktiviti SB yang optimum. Produktiviti paling rendah untuk keseluruhan fermentasi diperolehi pada pH awalan 6.5 bagi setiap hari yang dikaji.



Rajah 5.16 Nilai produktiviti SB bagi pH awalan berbeza berbanding masa fermentasi

Rajah 5.17 menunjukkan pertambahan asid glukonik dalam medium dari permulaan fermentasi sehingga hari pertama. Bagi pH 5 pula pertambahan asid glukonik adalah minimum tetapi medium tetap berada pada julat untuk pertumbuhan sel dan penghasilan SB.



Rajah 5.17 Kepekatan asid glukonik pada pH awalan berbeza

5.3 KESIMPULAN

Penghasilan berat kering SB dalam kultur permukaan statik adalah 1.43 kali lebih tinggi berbanding kultur goncang. Bagi kultur permukaan statik, penghasilan berat kering maksimum dicapai pada hari ke-8 pada nilai pH medium yang paling rendah iaitu 4.99. Berbeza dengan kultur goncang, penghasilan SB maksimum diperolehi pada nilai pH medium yang agak tinggi iaitu 6.4. Bersumberkan kepada penyelidikan terdahulu, lactate bukan berfungsi sebagai substrat untuk biosintesis SB tetapi berperanan sebagai sumber tenaga untuk penggandaan sel dan penghasilan SB. Penggunaan substrat glukosa, fruktosa dan sukrosa adalah serentak dalam kultur permukaan statik tetapi dalam kultur goncang adalah berturutan. Kadar penggunaan glukosa dalam kultur goncang adalah lebih cepat berbanding fruktosa dan sukrosa. Keadaan ini mencadangkan dua kesimpulan iaitu kecenderungan strain *A. xylinum* 0416 untuk memilih substrat paling sesuai untuk penghasilan SB dan faktor kuantiti glukosa, fruktosa dan glukosa dalam medium dengan kepekatan masing-masing 1.0 g/L, 2.5 g/L dan 3.0 g/L. Oleh kerana fermentasi SB adalah pertumbuhan berkait 'growth associated', maka mengambil kira keluk penghasilan SB dapat membantu menganggar kadar pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak}) dan masa penggandaan (t_d)

bagi kedua-dua kultur permukaan statik dan goncang bagi CWHSM. Yil tertinggi dan produktiviti maksimum diperolehi daripada kultur permukaan statik dengan masing-masing 0.127 g SB/g gula keseluruhan pada hari ke-8 dan 0.043 g/L.hari⁻¹ pada hari ke-8.

Bagi kajian luas permukaan medium pula, nisbah L/I=0.84 menunjukkan kadar penghasilan SB lebih tinggi berbanding nisbah yang lain selepas hari ke-5 fermentasi sehingga mencapai maksimum pada hari ke-7 dengan 0.358 g SB per liter medium. Kepekatan asid glukonik yang tinggi pada nisbah L/I=0.12 adalah kerana kebanyakan substrat ditukarkan kepada asid glukonik dan penukaran kepada SB adalah amat kecil peratusannya. Bagi ketiga-tiga nisbah L/I jelas menunjukkan bahawa kepekatan asid glukonik adalah dominan berbanding asid laktik serta mempengaruhi penghasilan SB dengan ketara. Substrat glukosa, fruktosa dan sukrosa digunakan serentak oleh strain dalam setiap nisbah L/I yang dikaji. Kesimpulannya ialah luas permukaan medium adalah perkadaran dengan kadar penggunaan substrat oleh strain *A. xylinum* 0416.

pH awalan medium mempengaruhi penghasilan SB dalam CWHSM yang ketara. Penghasilan SB maksimum diperolehi pada pH 5.0 dengan 0.348 g/L. Profil pH menunjukkan kesan pengumpulan produk sampingan dipercayai asid glukonik dalam medium terhadap penghasilan SB. Perlakuan profil pH menunjukkan kesamaan untuk setiap pH awalan yang dikaji. Produktiviti maksimum diperolehi daripada pH awalan 5.0 dan berkaitan dengan berat kering SB. Untuk kajian selanjutnya dicadangkan supaya penggunaan karbohidrat dan jisim sel dikira. Kepekatan asid glukonik dan asid laktik hendaklah ditentukan di samping kajian terhadap pengaruh pengkristalan dan pempolimeran bagi menjelaskan keseluruhan proses fermentasi ini.

BAB VI

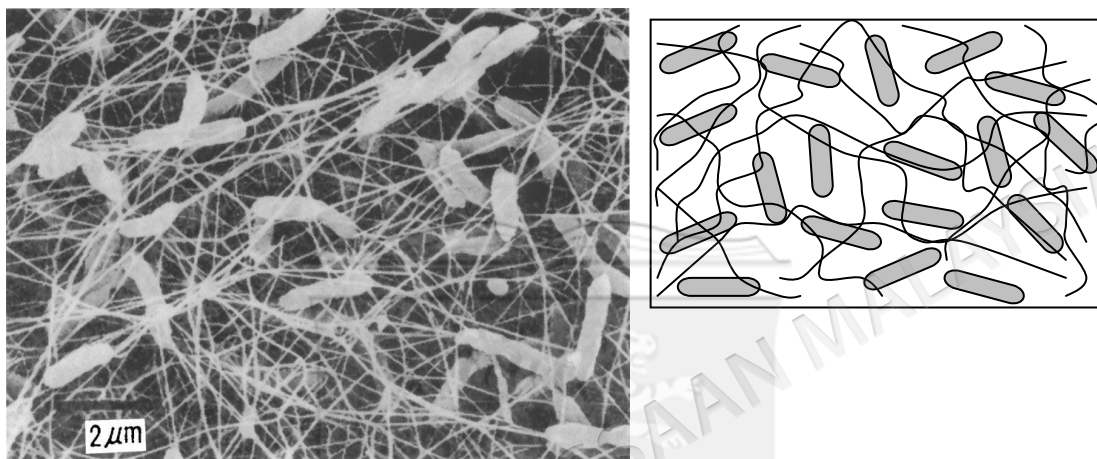
PEMBANGUNAN PROSES PERAWATAN SELULOSA BAKTERIA

6.1 PENGENALAN DAN STRATEGI KAJIAN

Selulosa bakteria (SB) yang dihasilkan oleh *Acetobacter xylinum* mempunyai pelbagai aplikasi berpotensi dan menjadi sumber biopolimer baru di alam ini. SB adalah selulosa tulen secara kimia yang bebas daripada hemiselulosa, peptin dan lignin yang biasanya ditemui dalam selulosa tumbuhan dan menyukarkan proses pengasingan dan penulenan (Bielecki et al. 2002; Jung et al. 2007). SB adalah tulen dan mempunyai sifat pempolimeran dan pengkristalan yang tinggi. Ia juga bebas daripada kewujudan bahan sampingan berbahaya. Proses pengkayaan SB memerlukan tenaga yang rendah dan tiada proses kimia intensif yang terlibat. Rawatan menggunakan alkali pada suhu tinggi akan membuang sel yang berada di dalam jaringan SB seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6.1. Penghasilan biobahan tidak toksik, tidak pirogenik dan sempurna untuk pelbagai aplikasi akan dihasilkan dengan kaedah ini (Krystynowicz et al. 2000b; Alvarez et al. 2004; Czaja et al. 2004b).

SB perlu dirawat menggunakan alkali cair (0.5 M), pada suhu tinggi bagi memastikan sel yang berada dalam jaringan pelikel larut sepenuhnya. Rawatan ini dilakukan untuk menjamin kualiti SB supaya boleh disimpan dalam jangka masa yang lama. Analisis biokimia menjelaskan bahawa pelbagai kaedah rawatan alkali adalah efektif dalam menyingkirkan protein dan asid nukleik daripada membran natif dan menghasilkan membran selulosa tulen (George et al. 2005). Selepas rawatan alkali dan pembersihan menggunakan air suling, SB boleh dikeringkan dan diproses menjadi membran selulosa (Serafica et al. 2002).

George et al. (2005) telah mengkaji keupayaan empat jenis larutan kimia dalam menghasilkan membran SB tulen iaitu kalium karbonat (K_2CO_3), sodium karbonat (Na_2CO_3), kalium hidroksida (KOH) dan sodium hidroksida (NaOH). Kesan rawatan kimia terhadap sifat mekanikal terma juga dikira serentak. Rawatan alkali yang lembut dengan kepekatan 0.2 N memberi kelebihan kepada kestabilan terma dan memperbaiki sifat-sifat mekanikal terma bagi SB.

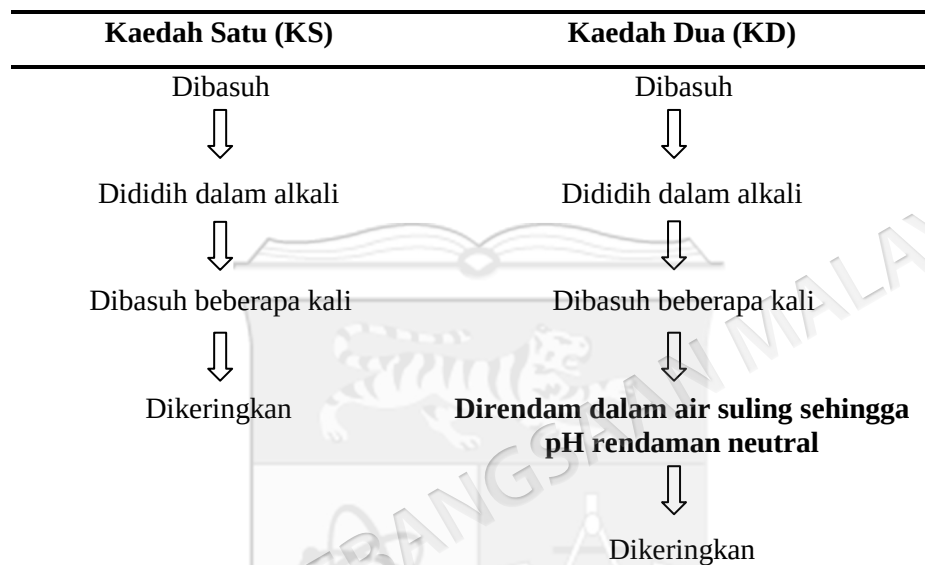


Rajah 6.1 Gambarajah skematik menunjukkan sel berada di dalam jaringan SB (kanan), mikrogram sel dalam jaringan SB (kiri)

Sumber: Iguchi et al. 2000

Pembangunan proses perawatan SB dijalankan dengan penyediaan medium penyelenggaraan seperti Jadual 3.2 dan medium penghasilan seperti Jadual 3.3. Sembilan kelalang kon bersaiz 100 mL yang mengandungi 50 mL medium setiap satu diperlukan sepanjang eksperimen. Nilai pH telah dikawal menggunakan asid asetik glasial kepada 4.0, 5.0 dan 6.0. Setelah autoklaf, setiap kelalang dimasukkan 5.0 mL inokulum nata daripada medium penyelenggaraan. Kelalang kon tersebut ditandakan 4, 7 dan 10 bagi setiap nilai pH, mewakili masa fermentasi dalam hari di mana ia perlu dikeluarkan daripada inkubator. Fermentasi dijalankan pada suhu 30 °C selama 10 hari secara kultur permukaan statik. Tiga kelalang kon daripada pH awalan 4, 5 dan 6 akan dikeluarkan dari inkubator pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 untuk dituai dan dianalisis.

Dua kaedah penuaian telah digunakan dalam eksperimen bagi membandingkan kaedah yang sedia ada dengan kaedah yang dicadangkan. Kaedah Satu (KS) adalah kaedah penuaian yang digunakan secara komersial dan digunakan oleh kebanyakan penyelidik sebelum ini, sementara kaedah cadangan adalah Kaedah Dua (KD). Keseluruhan prosedur yang terlibat ditunjukkan dalam Rajah 6.2. Setiap sampel SB mentah dibahagi kepada dua bahagian dan dituai secara KS dan KD.



Rajah 6.2 Prosedur yang digunakan dalam KS dan KD

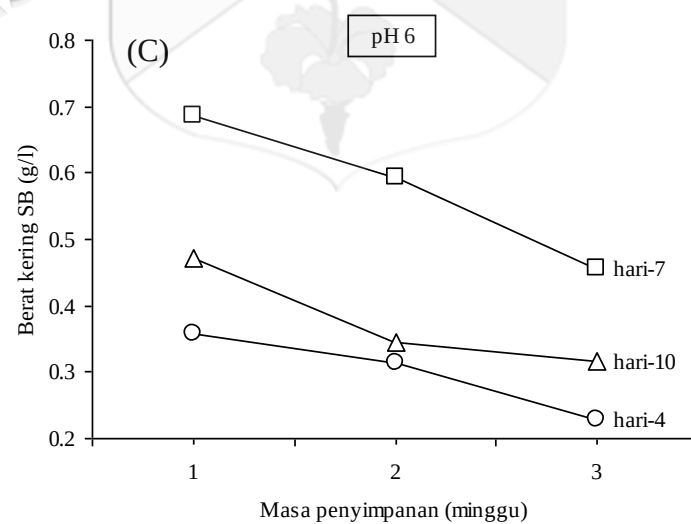
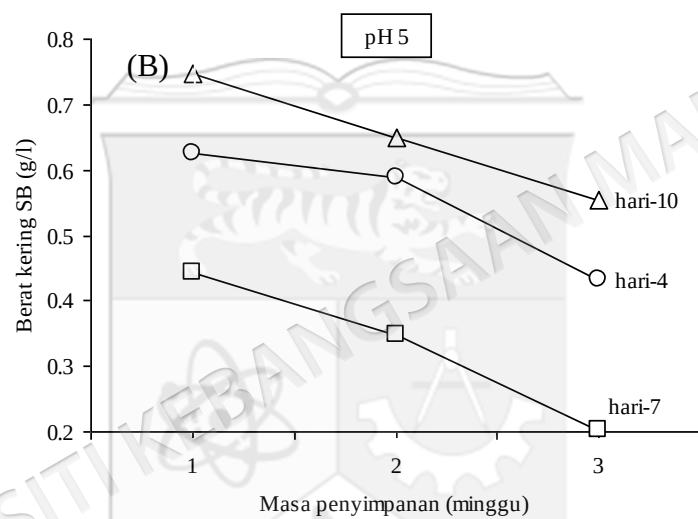
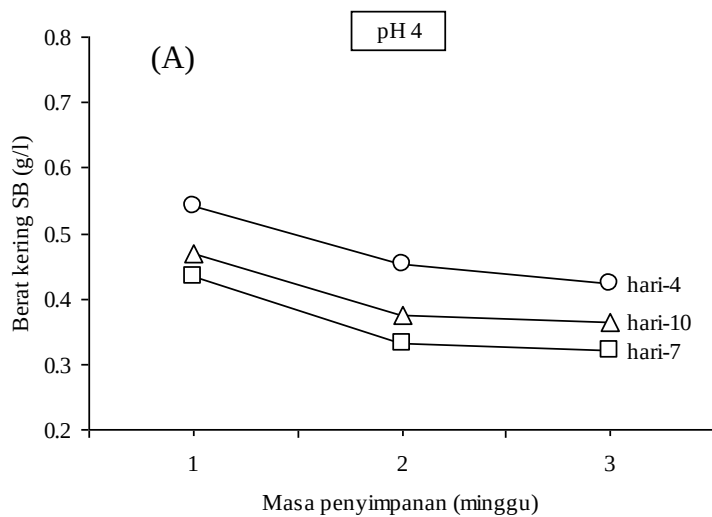
KS dimulakan dengan membasuh SB yang berbentuk gel sebanyak dua kali menggunakan air suling. Gel tersebut dididihkan dalam larutan sodium hidroksida (NaOH) 0.5 M selama 20 minit untuk melarutkan sel yang terperangkap di antara jaringan pelikel SB. Kemudian gel tersebut dibasuh semula menggunakan air suling beberapa kali. Gel tersebut dikeringkan perlahan-lahan di dalam ketuhar pada 40 °C selama 5 jam. Kepingan gel yang kering ditimbang dan mewakili berat kering SB yang dihasilkan. Sampel tersebut disimpan di dalam bekas tertutup untuk ditimbang semula pada minggu ke-2 dan ke-3. Tiga bacaan berat kering bagi setiap sampel akan diambil dan puratanya dikira. Bacaan purata berat kering sampel akan dikira sekali setiap minggu selama tiga minggu berturut-turut. Ia dilabelkan sebagai minggu-1, minggu-2 dan minggu-3 dan konsistensi data akan dinilai berpanduan graf. KD pula hampir menyamai KS tetapi ditambah satu unit operasi iaitu merendam SB di dalam air suling sehingga pH rendaman menjadi neutral.

Kajian morfologi ke atas sampel SB kering dilakukan menggunakan Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM) manakala kajian unsur pula dianalisis menggunakan Dispersi Elektron Sinar-X (EDX). Tiga sampel dianalisis untuk kajian ini iaitu KS, KD dan sampel tanpa sebarang rawatan. Sampel tanpa rawatan adalah gel SB mentah yang dikeringkan sebaik sahaja dikeluarkan daripada kelalang kon tanpa menjalani sebarang proses penuaian dan perawatan. Sampel tersebut mewakili piawaian kepada kandungan unsur yang terdapat dalam sampel SB mentah. Saiz diameter liang, diameter pelikel dan kandungan unsur dianalisis untuk setiap sampel.

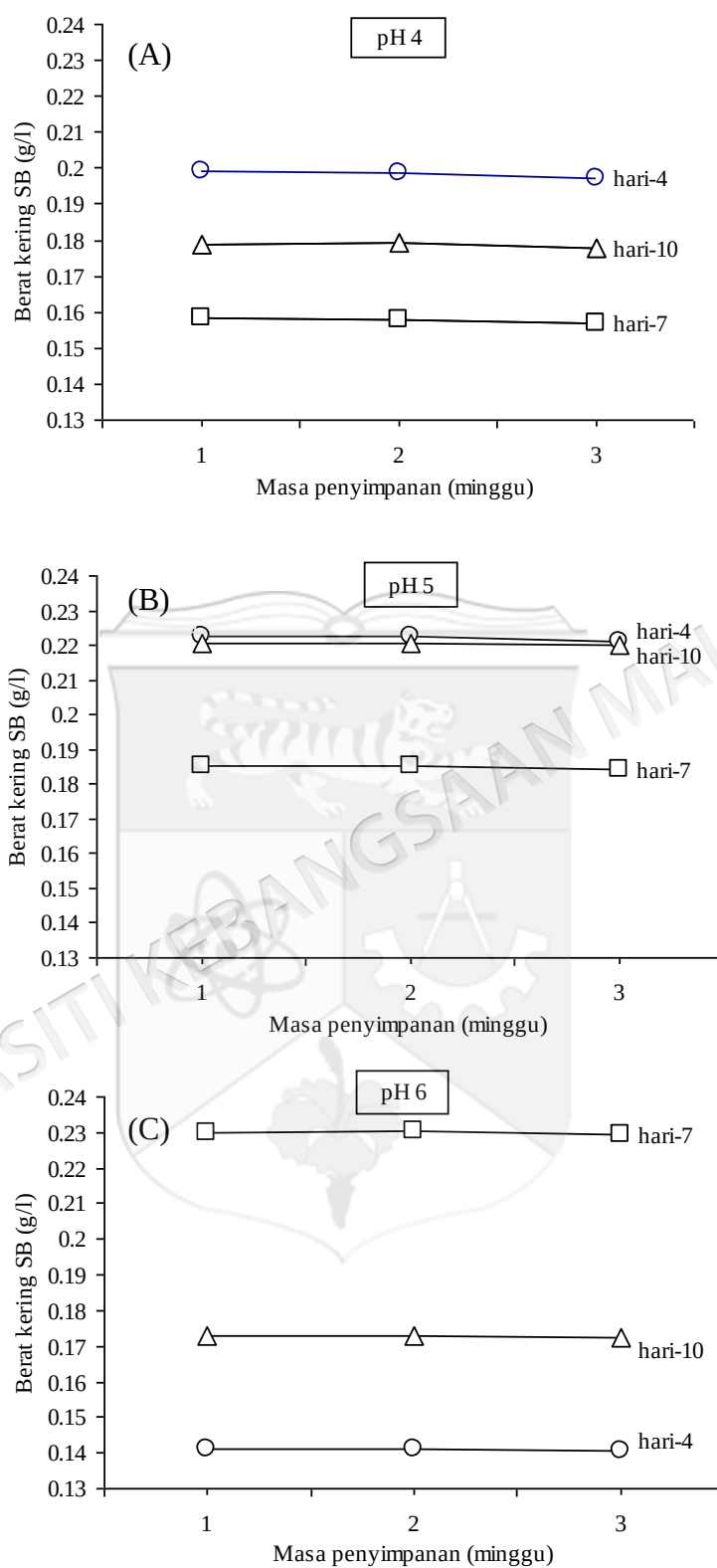
6.2 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

6.2.1 Kajian Berat Kering Selulosa Bakteria dalam Kaedah Satu (KS) dan Kaedah Dua (KD)

Rajah 6.3 menunjukkan kesan rawatan KS untuk hari 4, 7 dan 10 terhadap masa penyimpanan. Graf tersebut mewakili pH awalan medium 4 untuk (A), 5 untuk (B) dan 6 untuk (C). Berat kering SB untuk semua sampel berkurang dengan ketara terhadap masa penyimpanan dari minggu pertama hingga minggu ketiga. Nilai pH awalan medium mempengaruhi berat kering SB yang terhasil tetapi tidak mempengaruhi berat kering SB terhadap masa penyimpanan. Ini dijelaskan dengan penurunan berat kering SB yang ketara setiap minggu bagi setiap nilai pH awalan. Pola pengurangan berat kering tersebut hampir sama untuk setiap nilai pH awalan yang dikaji. Pengurangan berat kering SB terhadap masa penyimpanan dalam KS berkemungkinan disebabkan oleh degradasi alkali yang masih terdapat dalam sampel tersebut.



Rajah 6.3 Berat kering SB dalam KS dengan pH awalan (A) 4, (B) 5 dan (C) 6



Rajah 6.4 Berat kering SB dalam KD dengan pH awalan (A) 4, (B) 5 dan (C) 6

Rajah 6.4 menunjukkan berat kering SB yang dirawat secara KD. Bacaan berat kering amat konsisten terhadap masa penyimpanan yang diwakili dengan garisan graf yang mendatar untuk (A), (B) dan (C). Tiada penurunan berat kering yang ketara dari minggu pertama hingga minggu ke-3. KD merupakan kaedah perawatan paling berkesan untuk SB dan akan digunapakai dalam keseluruhan eksperimen untuk kajian ini. Namun begitu, berat kering SB yang dirawat secara KD berkurang hampir 2.3 kali ganda berbanding KS. Nilai penghasilan berat kering SB dengan penyelidik terdahulu tidak dapat dibandingkan kerana majoriti menggunakan kaedah rawatan secara KS. Gostomski dan Schrecker (2005) telah menggunakan KS dalam kajian mereka dan perbezaan cuma pada jenis air dan masa yang digunakan iaitu air nyah-ion dan masa rendaman selama 48 jam. Namun begitu tiada data penghasilan berat kering yang dilaporkan. Jadual 6.1 menunjukkan perbandingan kualiti SB yang diperolehi setelah menjalani rawatan secara KS dan KD.

Jadual 6.1 Perbandingan kualiti SB yang dirawat secara KS (diguna oleh kebanyakan penyelidik) dan KD (cadangan kajian ini)

	KS	KD
Keterangan proses	• KS adalah kaedah perawatan SB yang diguna secara meluas oleh kebanyakan penyelidik sebelum ini. • Prosedur ditunjukkan dalam Rajah 6.2.	• KD adalah kaedah perawatan SB yang dicadangkan dalam kajian ini. • Penambahan unit operasi merendam • Prosedur ditunjukkan dalam Rajah 6.2.
Integriti dan morfologi SB yang diperolehi	• integriti SB tidak terjamin • morfologi tak sekata, permukaan berkedut, mudah peroi dan rapuh (rujuk Rajah 6.5). • bau busuk atau hapak mungkin kerana degradasi SB oleh sodium • berat tak konsisten sepanjang masa penyimpanan (rujuk Rajah 6.3) • tidak dapat diaplikasi untuk pelbagai tujuan inovatif	• integriti SB meningkat 20% (KS) kepada 80% (KD) – daripada pemerhatian di makmal • morfologi SB sekata, tiada degradasi (rujuk Rajah 6.6) • tiada bau busuk atau hapak • berat konsisten sepanjang masa penyimpanan (rujuk Rajah 6.4) • dapat digunakan untuk pelbagai tujuan inovatif

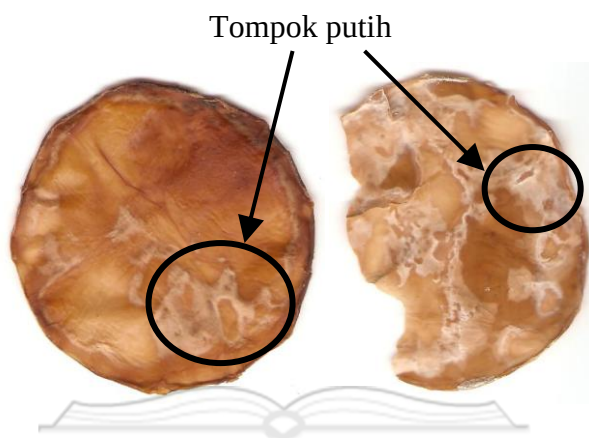
bersambung...

...sambungan

Berat kering SB	• Mencapai nilai maksimum 0.75 g/L seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6.3B, pH awalan 5.0, sampel hari ke-10 pada minggu pertama penyimpanan SB. • Lebihan berat kering ketara berbanding KD kerana masih terdapat unsur lain dalam sampel SB. • Berat kering berkurang dengan ketara terhadap masa penyimpanan.	• Mencapai nilai maksimum 0.23 g/L seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6.4C, pH awalan 6.0, sampel hari ke-7. • Berat kering berkurang hampir 3.3 kali berbanding KS kerana SB daripada KD adalah tulen. • Berat kering konsisten sepanjang masa penyimpanan.
Sifat mekanikal terma	• Tidak dapat diuji menggunakan alatan DMA kerana struktur sampel rapuh dan berderai.	• Sampel mempunyai sifat kekakuan yang tinggi, stabil terhadap suhu dan perintang haba yang terbaik. Nilai maksimum modulus penyimpanan, E' diperolehi sebanyak 44470 MPa.
Ketulenan SB	• SB mengandungi unsur sodium (Na) yang tinggi (rujuk Rajah 6.12 B) • Bacaan Na oleh EDX, nilai awal ialah 0.03 dan nilai akhir 0.99 (rujuk Jadual 6.2)	• SB yang tulen diperolehi tanpa kandungan sodium (rujuk Rajah 6.12 C) • Bacaan Na oleh EDX, nilai awal ialah 0.03 dan nilai akhir 0.03 (rujuk Jadual 6.2)

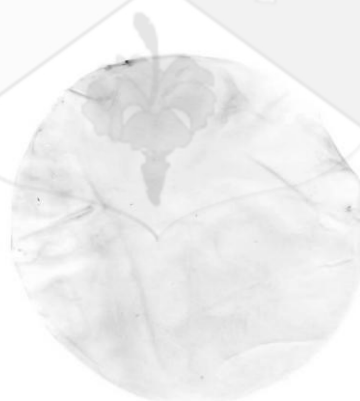
Rajah 6.5 menunjukkan keadaan sampel selepas tiga minggu penyimpanan yang dirawat secara KS. Kualiti kepingan SB yang terjejas ditunjukkan dengan kehadiran tompokan putih di permukaan SB, berbau busuk dan bacaan berat kering SB yang semakin berkurang. Kualiti SB tidak dapat dipelihara oleh KS, dan memungkinan kajian aplikasi tidak dapat dilakukan terhadap sampel. Fenomena ini berlaku kerana masih terdapat sodium hidroksida di dalam sampel. Kenyataan ini disokong dengan kehadiran unsur sodium (Na) daripada sampel yang dianalisis menggunakan EDX dan ditunjukkan dalam Rajah 6.12(B). Larutan alkali sodium hidroksida (NaOH) adalah mengkakis dan mampu mengganggu kualiti SB. Ia dikomersilkan dalam bentuk pepejal atau cecair dengan pelbagai kepekatan. NaOH

merupakan larutan alkali kuat dan melarut dengan sempurna dalam air kepada ion sodium dan hidroksil. Proses pelarutan NaOH dalam air adalah eksotermik dan berlaku dengan pantas (www.inchem.org/documents/sids/sids/NAHYDROX.pdf).



Rajah 6.5 Kepingan SB kering pada minggu ke-3 penyimpanan yang dirawat secara KS

Rajah 6.6 pula menunjukkan sampel yang dirawat dengan kaedah KD. Sampel tersebut lebih cerah dan bersih berbanding KS. Tekstur permukaan sampel adalah licin dan lebih ringan. Analisis unsur oleh EDX menunjukkan unsur sodium telah berjaya disingkirkan oleh KD.



Rajah 6.6 Kepingan SB kering pada minggu ke-3 penyimpanan yang dirawat secara KD

Unit operasi merendam sangat penting kerana sifat morfologi SB yang unik iaitu struktur pelikel dan liang bersaiz nano yang mampu memerangkap kapasiti air yang banyak, sehingga 700 kali berat keringnya (Bielecki et al. 2002; Jung et al. 2007). Pelikel selulosa yang dikultur secara statik mempunyai berat satu peratus

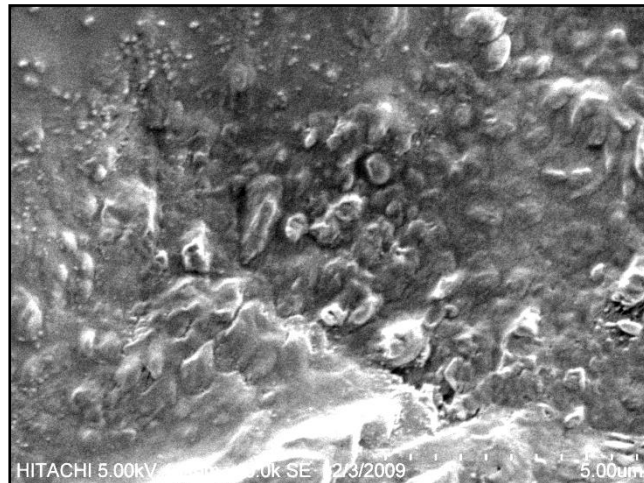
sahaja di mana yang lainnya adalah air (Yamanaka & Watanabe 1994). Larutan alkali masih terperangkap di antara pelikel dan tidak dapat disingkirkan dengan basuhan cepat. Cara terbaik ialah dengan merendam dalam air di mana proses penyingkiran tersebut akan berlaku secara perlahan-lahan. Proses ini dijustifikasikan sebagai osmosis di mana pengaliran pelarut dari larutan berkepekatan rendah ke larutan berkepekatan tinggi melalui membran separuh telap terjadi. Tujuan utama merendam SB adalah untuk memastikan alkali yang digunakan dalam pendidihan akan keluar sepenuhnya daripada SB. Ia juga bertujuan memastikan degradasi SB oleh alkali tidak berlaku kerana akan mempengaruhi nilai berat kering dan kualiti SB yang dihasilkan.

6.2.2 Kajian Morfologi dan Unsur Selulosa Bakteria

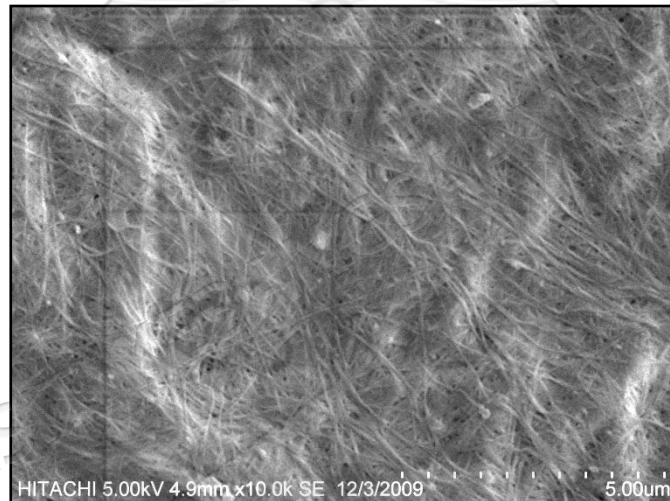
Kajian ini dijalankan ke atas tiga sampel iaitu SB yang dirawat secara KS, KD dan tanpa rawatan. Rajah 6.7 menunjukkan mikrograf SB tanpa rawatan yang dianalisa menggunakan SEM. Permukaan sampel tersebut agak padat dan langsung tidak kelihatan struktur fibril mikro atau pelikel SB. Permukaan SB telah diliputi sepenuhnya oleh satu lapisan bahan yang tidak dapat dikenalpasti. Rajah 6.8 menunjukkan imej SB selepas dirawat secara KS. Struktur kasar pada permukaan SB dapat dilihat dengan jelas dalam mikrograf ini. Rajah 6.9 menunjukkan imej SB yang dirawat secara KD. Struktur pelikel SB dapat dilihat dengan jelas dan dimensi pelikel dapat dikira melalui mikrograf ini.



Rajah 6.7 Imej sampel SB tanpa rawatan

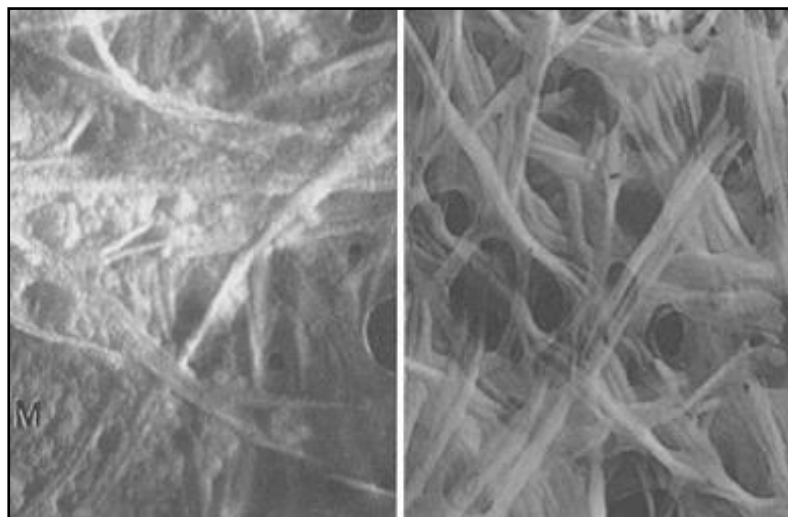


Rajah 6.8 Mikrograf SB yang dirawat secara KS



Rajah 6.9 Mikrograf SB yang dirawat secara KD

Keputusan ini adalah sama seperti yang diperolehi oleh Ohad et al. (1962) dan ditunjukkan dalam Rajah 6.10. Pelikel SB sebelum rawatan alkali (imej kiri) memperlihatkan serat komposit di antara matriks yang bergranul. Matriks amorfus mengelilingi pelikel SB baru dan lama dan bercantum antara satu sama lain. Matriks tersebut mempunyai tekstur bergranul dan morfologi sebegini dikenali sebagai tikar. Imej kanan pula memperlihatkan struktur permukaan setelah rawatan alkali NaOH 1.0 N dilakukan kepada SB. Rawatan alkali menyingkirkan sel daripada pelikel dan menyebabkan gelembung kepada unsur selulosa, tetapi masih mengekalkan serat dan matriks dalam keadaan teresolusi.



Rajah 6.10 Pelikel selulosa sebelum rawatan alkali (kiri), selepas rawatan alkali (kanan) pada pembesaran x70 000

Sumber: Diolah daripada Ohad et al. 1962

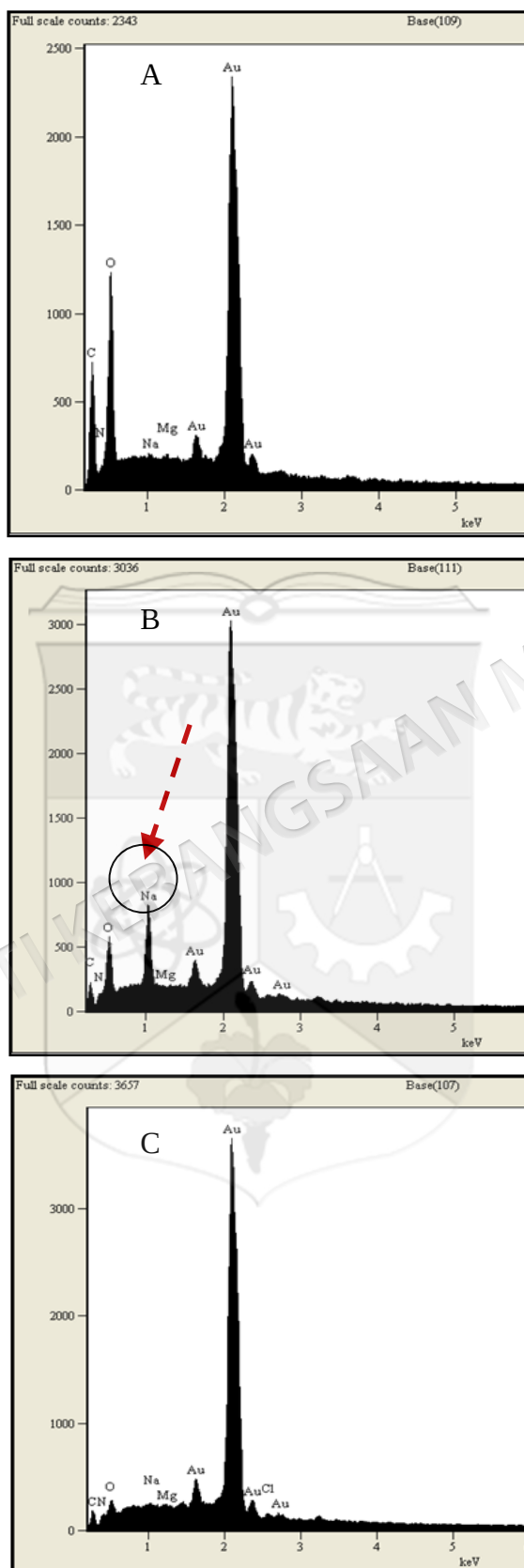
Rajah 6.11 menunjukkan dimensi pelikel SB yang diukur secara automatik oleh SEM. Nilai purata diameter pelikel bagi sampel SB ialah 51.483 nm. Daripada keputusan ini, SB dikategorikan sebagai bahan biopolimer bersaiz nano. Jenis unsur yang terdapat di dalam sampel ditunjukkan oleh spektrum EDX dalam Rajah 6.12 dan kuantiti unsur ditunjukkan dalam Jadual 6.2. Perbandingan ketiga-tiga sampel iaitu sampel tidak dirawat (A), sampel yang dirawat secara KS (B) dan sampel dirawat secara KD (C) telah dijalankan. Sampel tidak dirawat (A) bertindak sebagai nilai kawalan bagi unsur sodium (Na) yang terdapat dalam sampel SB. Graf (B) menunjukkan kuantiti sodium paling tinggi iaitu 0.99. Ini menunjukkan bahawa, KS tidak dapat menyingkirkan unsur sodium daripada SB. Kuantiti sodium bagi graf (A) dan (C) adalah sama iaitu 0.03. Daripada data ini telah disimpulkan bahawa, langkah merendam dalam KD adalah efektif dalam menyingkirkan larutan alkali yang masih tersisa di antara pelikel SB. KD mampu mengurangkan kuantiti unsur sodium menyamai nilai pada SB tanpa rawat (A).



Rajah 6.11 Pengiraan dimensi pelikel SB oleh SEM secara automatik

Jadual 6.2 Kuantitatif kandungan unsur dalam sampel SB oleh EDX

Unsur	Tanpa Rawat	KS	KD
C	0.94	0.27	0.23
N	0.07	0.09	0.09
O	1.53	0.71	0.26
Na	0.03	0.99	0.03
Mg	0.03	0.00	0.00



Rajah 6.12 Spektrum kajian unsur oleh EDX untuk (A) SB tanpa rawat, (B) KS dan (C) KD

6.3 KESIMPULAN

Proses perawatan SB dengan penambahan unit operasi rendaman berkesan untuk menyingkirkan kesuluruhan larutan sodium hidroksida daripada SB. KD merupakan prosedur rawatan paling efektif untuk menyingkirkan larutan alkali yang masih tersisa di antara pelikel SB. Kaedah ini juga efektif dalam menjamin kualiti SB terutama untuk disimpan dalam jangka masa yang lama dan aplikasi SB seterusnya. Data yang diperolehi daripada spektrum EDX membuktikan fenomena ini. Mikrograf SEM menerangkan bahawa sampel SB pada asalnya dilitupi dengan satu lapisan bahan yang tidak dikenalpasti. Mikrograf juga menunjukkan bahawa SB dikategorikan sebagai bahan biopolimer bersaiz nano yang mempunyai kelebihan aplikasi pelbagai bidang. Namun begitu, membran SB yang dirawat menggunakan alkali dapat diaplikasi dalam penyelidikan asas dan juga industri di mana kestabilan terma, kekuatan mekanikal dan sifat struktur menjadi kriteria penilaian utama.

BAB VII

PENCIRIAN PRODUK SELULOSA BAKTERIA

7.1 PENGENALAN DAN STRATEGI KAJIAN

Objektif kajian ini adalah untuk mendapatkan pencirian produk selulosa bakteria (SB) daripada tiga medium berbeza iaitu medium HS dalam air kelapa (CWHSM), medium kompleks (CM) dan medium Hestrin-Schramm (HSM). Sampel SB pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 yang telah dirawat menggunakan larutan alkali natrium hidroksida akan dianalisis dan dikaji. Peralatan yang digunakan adalah Kalorimetri Pengimbasan Pembezaan (DSC), Analisis Mekanikal Dinamik (DMA), Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM) dan Pembelauan Sinar-X (XRD).

Kalorimetri Pengimbasan Pembezaan (DSC) mengira perubahan haba secara endotermik dan eksotermik berfungsikan suhu. Selulosa mengandungi dua komponen utama iaitu amorfus dan kristal. Selulosa natif adalah komposit bagi dua atau lebih kristal terutamanya I_α dan I_β . Rawatan menggunakan larutan alkali menyebabkan perubahan fasa I_α kepada fasa yang lebih stabil secara terma iaitu I_β . Susunan molekul dalam kristal adalah tersusun padat. Takat cair '*melting point*' adalah suhu di mana struktur tersusun ini akan terpisah. Susunan molekul dalam amorfus pula adalah secara rawak dan ciri terpenting amorfus adalah suhu peralihan kaca '*glass transition*' iaitu T_g . T_g adalah suhu di mana molekul mempunyai tenaga keupayaan minimum yang diperlukan untuk perubahan struktur dan pada takat ini bahan akan menunjukkan ciri liat '*rubbery*'. Suhu yang kurang daripada suhu T_g akan memberikan sifat kaca '*glassy characteristic*'.

Kajian pencirian produk selulosa bakteria dijalankan ke atas produk daripada tiga medium iaitu CWHSM (Jadual 3.4), CM (Jadual 3.5) dan HSM (Jadual 3.6). Proses penuaian SB adalah sama seperti yang dinyatakan dalam Rajah 3.8. Proses penghasilan selulosa bakteria dilakukan secara fermentasi permukaan statik menggunakan kelalang kon bersaiz 250 mL dan medium berisipadu 100 mL. Setiap medium memerlukan tiga kelalang kon dan dilabelkan sebagai 4, 7 dan 10 yang mewakili bilangan hari di mana kelalang perlu dikeluarkan daripada inkubator untuk dituai dan dianalisis. Berat kering SB, profil pH medium sepanjang fermentasi dan produktiviti penghasilan SB dianalisis dan direkodkan.

Analisis menggunakan Kalorimetri Pengimbasan Pembezaan (DSC) dijalankan menggunakan dulang kosong beroperasi bersama gas nitrogen sebagai rujukan. Dulang yang berisi sampel dipanaskan dari -5°C sehingga 400°C dengan kenaikan suhu 10°C per minit untuk mendapatkan lengkung aliran haba. Peralatan digunakan ialah Mettler Toledo DSC 821e.

Analisis Mekanikal Dinamik (DMA) pula bertujuan mengkaji perubahan sifat-sifat mekanikal terhadap suhu dan tekanan ricih. Sampel berbentuk segiempat tepat (50×6.35 mm), dengan ketebalan yang diketahui disediakan daripada setiap SB untuk analisis menggunakan DMA. Pengiraan dilakukan dalam mod '*Temperature Ramp*' menggunakan Q800 DMA (TA Instruments, US). Sampel dipanaskan daripada 30°C - 250°C , pada kadar $2^{\circ}\text{C}/\text{minit}$. Modulus dinamik kompleks diplotkan melawan suhu untuk semua sampel. Modulus penyimpanan '*storage modulus*', modulus kehilangan '*loss modulus*' dan ' *$\tan \delta$* ' dikira serentak.

Modulus E , adalah mengira halangan keseluruhan sampel terhadap perubahan bentuk iaitu regangan terhadap terikan. Modulus Penyimpanan, E' atau Modulus Elastik adalah keupayaan bahan untuk menyimpan tenaga,

$$E' = (\text{regangan} / \text{terikan}) \cos \delta \quad \dots (7.1)$$

Modulus Kehilangan, E'' adalah keupayaan bahan untuk menyerak tenaga kepada haba,

$$E'' = (\text{regangan/terikan}) \sin \delta \quad \dots(7.2)$$

Tan Delta adalah mengira bahan '*damping*' kepada getaran atau bunyi,

$$\tan \delta = E'' / E' \quad \dots(7.3)$$

Kajian morfologi ke atas sampel kepingan SB kering dilakukan menggunakan Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM) dan Dispersi Elektron Sinar-X (EDX), Brand: Hitachi. Ltd, Model: S-3400. Saiz diameter liang, diameter pelikel dan kandungan unsur dianalisis untuk sampel pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 untuk ketiga-tiga medium.

Analisis alatan Pembelauan sinar-X (XRD) dijalankan ke atas sampel SB daripada fermentasi *A. xylinum* secara kultur permukaan statik. Sebanyak 3 kelalang kon bersaiz 250 mL berisipadu 100 mL medium diperlukan bagi setiap medium. Semua sampel SB dikeluarkan daripada inkubator pada hari ke-10 untuk penuaian dan analisis. Kepingan SB kering dikisar menggunakan pengisar makmal untuk mendapatkan sampel berbentuk serbuk. Sampel tersebut kemudiannya dipenuhi dalam bekas dan diletakkan pada pemegang di dalam peralatan XRD. Kuantiti sampel haruslah mencukupi bagi memenuhi keseluruhan bekas supaya analisis berjalan dengan sempurna dan meminimumkan ralat. Difraktogram SB direkodkan menggunakan XRD-6000 Shimadzu Difraktometer Sinar-X pada suhu bilik. Julat imbasan adalah dari 10°-60°, pada kadar 6° per minit menggunakan radiasi Cu/Ka1 (1.54056 Å) pada voltan, 40 kV dan kuasa, 30 mA.

Indeks Pengkristalan, CrI adalah pecahan kandungan kristal dalam sampel (Bansal et al. 2010) dikira dengan kaedah Segal et al. (1959) yang menggunakan kaedah ketinggian puncak '*peak-height*' dan masih digunakan dengan meluas sehingga kini,

$$\text{CrI} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad \dots(7.4)$$

CrI ialah darjah pengkristalan relatif, di mana I_{200} adalah intensiti maksima bagi pembelauan kekisi 200 pada $2\theta=22.5^\circ$ dan I_{am} adalah intensiti minimum mewakili kandungan amorfus pada $2\theta=18^\circ$. Pengiraan ketinggian puncak telah digunakan dengan jayanya oleh Herman dan Weidinger (1948), Clark dan Terford (1955), dan Palmer et al. (1956), seperti yang dilaporkan oleh Segal et al. (1959).

Jarak satah dalaman bagi kristal, d -spacings dikira menggunakan Bragg's Laws (1912) dalam unit Angstroms (Å) atau nm. Ia merupakan hukum penting dalam menginterpretasikan data pembelauan sinar-X.

$$\begin{aligned} n\lambda &= 2d \sin \theta \\ d &= n\lambda / 2 \sin \theta \\ &= 1 \times 1.54 / 2 \sin \theta \end{aligned} \quad \dots(7.5)$$

di mana n adalah integer bagi peringkat pantulan, λ adalah panjang gelombang bagi tuju sinar-X, d adalah jarak satah dalaman bagi kristal dan θ adalah sudut bagi sinar tuju tersebut.

Analisis jenis kristal selulosa dijalankan secara analisis diskriminasi 'discriminant', menggunakan data d -spacing daripada diffratogram sinar-X. Wada et al. (2001) menyatakan bahawa kaedah ini mudah dan objektif untuk mengklasifikasikan selulosa natif sebagai jenis I_α -kaya atau I_β -dominan menggunakan fungsi

$$Z = 1693 d_1 - 902 d_2 - 549 \quad \dots(7.6)$$

di mana $Z > 0$ (tanda positif) untuk jenis alga-bakteria (I_α -kaya) dan $Z < 0$ (tanda negatif) untuk kapas-ramie (I_β -dominan).

Saiz kristal, D bagi selulosa dikira menggunakan persamaan Scherrer di mana,

$$D = k\lambda / (B \cos \theta) \quad \dots(7.7)$$

D ialah saiz kristal yang bersudut tepat kepada satah, k ialah nombor Scherrer 0.94, λ ialah panjang gelombang sinar-X, B ialah lebar penuh pada separuh ketinggian dalam radians, dan θ ialah sudut Bragg.

Ciri SB yang dikehendaki dalam kajian ini adalah yang berkualiti dan berintegriti. Integriti yang dimaksudkan ialah keupayaan SB untuk menahan daripada perubahan suhu yang tinggi, keupayaan SB untuk menyimpan tenaga, ketinggian peratusan kandungan kristal dalam SB dan penghasilan SB yang bersaiz nano. SB yang diperlukan adalah dalam bentuk kepingan kerana mudah digunakan untuk pelbagai aplikasi.

7.2 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

7.2.1 Kalorimetri Pengimbas Pembezaan (DSC)

Rajah 7.1, 7.2 dan 7.3 menunjukkan histogram DSC untuk SB daripada medium CWHSM, CM dan HSM dan diringkaskan dalam Jadual 7.1. Suhu peralihan kaca, T_g bagi HSM tidak dapat ditentukan daripada histogram kerana kuantiti sampel yang terhad (5.7 mg). George et al. (2005) melaporkan bahawa nilai T_g bagi makromolekul yang tinggi kristal agak sukar ditentukan oleh DSC kerana keluk aliran haba agak lebar dan mendatar. Kuantiti sampel yang banyak (>10 mg) diperlukan untuk menghasilkan histogram yang lebih baik. Kajian oleh George et al. (2005) juga memberikan nilai T_g bagi SB natif, 13.94 °C manakala selepas rawatan NaOH nilai tersebut meningkat kepada 41.41 °C dan fenomena ini disebabkan oleh perubahan pergerakan molekul SB selepas rawatan kimia tersebut. Namun begitu, sumber substrat yang digunakan adalah sukrosa memungkinan perbezaan sifat SB yang terhasil serta SB hanya dibilas dengan air selepas dididih dalam larutan sodium hidroksida.

Suhu pengkristalan, T_c merujuk kepada suhu di mana bahan telah mempunyai cukup tenaga untuk bergerak kepada susunan tertentu yang dinamakan kristal. Proses ini ditunjukkan dengan puncak eksotermik dalam histogram. CWHSM paling cepat

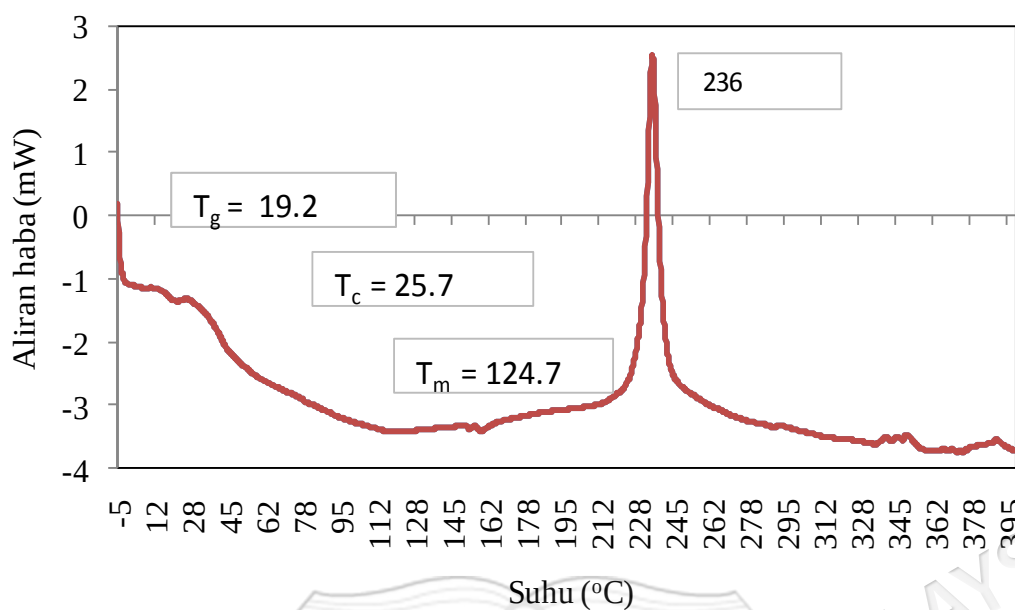
membentuk kristal iaitu pada suhu 25.7 °C, mencadangkan bahawa SB daripada CWHSM paling tinggi darjah pengkristalan berbanding CM dan HSM.

Suhu kristal mencair, T_m merujuk kepada suhu di mana kristal mula berpisah antara satu sama lain dan mencair. Proses ini menyerap tenaga yang diwakili oleh puncak endotermik. George et al. (2005) menyatakan bahawa suhu kristal mencair bagi SB adalah dalam julat 80-140 °C dan julat tersebut bersamaan dengan kajian ini di mana T_m adalah di antara 96-124.7 °C. SB daripada CWHSM memberikan suhu pengkristalan paling rendah (25.7 °C) dan suhu kristal mencair paling tinggi (124.7 °C) mencadangkan bahawa SB daripada CWHSM mempunyai sifat pengkristalan paling tinggi. Menurut George et al. (2005) keluk aliran haba iaitu suhu kristal mencair, T_m bagi SB ialah 106.48 °C. Sekiranya tiada rawatan kimia dilakukan ke atas SB (selulosa natif), akan wujud satu puncak endotermik tambahan selepas T_m pada 155.37 °C, yang merujuk kepada pencairan dan degradasi bahan berprotein dan bendasing yang terkandung dalam selulosa natif.

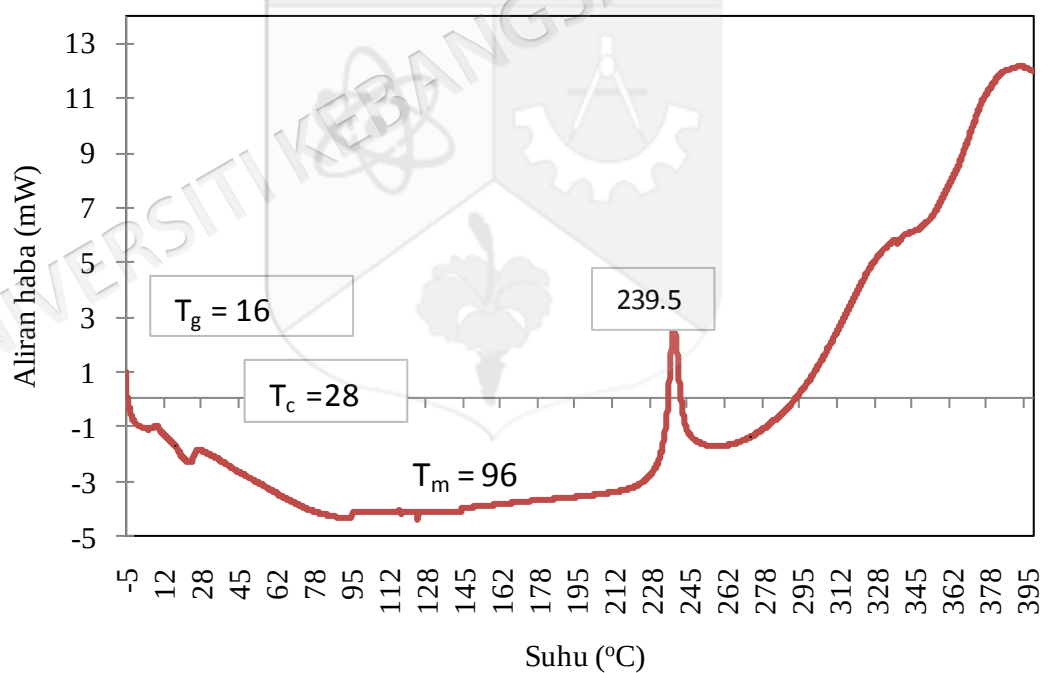
Selepas air disingkirkan, SB akan lebih stabil kepada suhu tinggi dan satu puncak eksotermik yang mewakili suhu penguraian selulosa diperolehi sekitar 236-240 °C bagi ketiga-tiga sampel SB. Ini menjelaskan bahawa kestabilan terma ketiga-tiga bahan adalah hampir sama. Julat suhu ini amat berbeza seperti yang dilaporkan oleh Barbara-Surma et al. (2007) iaitu suhu penguraian selulosa paling tinggi berlaku sekitar 350-370 °C. Terdapat beberapa puncak eksotermik yang ketara dalam CM dan HSM mencadangkan berkemungkinan wujudnya bahan pengukuhan dalam sampel SB tersebut.

Jadual 7.1 Ringkasan data yang diperolehi daripada DSC untuk sampel SB daripada medium berbeza

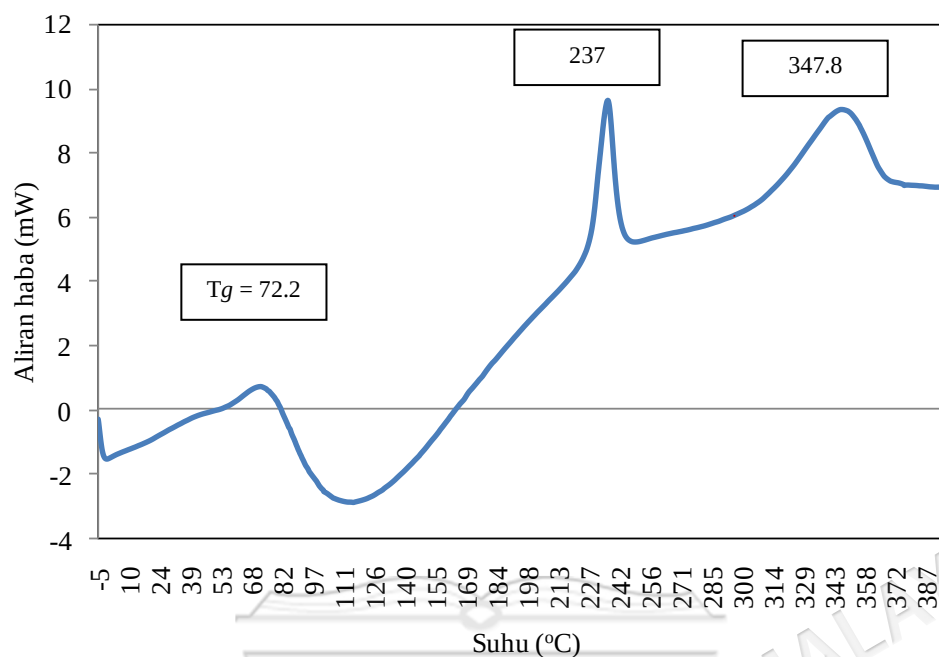
Sampel SB	Suhu peralihan kaca, T_g (°C)	Suhu pengkristalan, T_c (°C)	Suhu kristal mencair, T_m (°C)	Suhu penguraian selulosa, (°C)
CWHSM	19.2	25.7	124.7	236.0
CM	16.0	28.0	96.0	239.5
HSM	Tidak dapat ditentukan daripada histogram	72.2	114	237.0



Rajah 7.1 Histogram DSC untuk SB daripada CWHSM



Rajah 7.2 Histogram DSC untuk SB daripada CM



Rajah 7.3 Histogram DSC untuk SB daripada HSM

7.2.2 Analisis Mekanikal Dinamik (DMA)

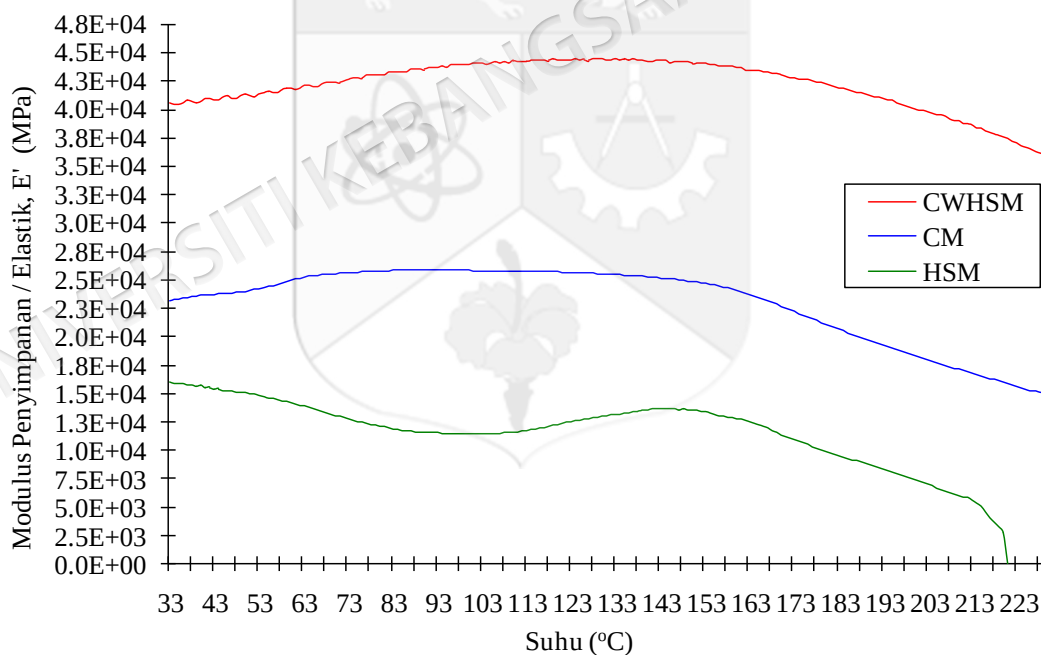
Secara umumnya DMA adalah mengira nilai kekakuan '*stiffness*' iaitu berapa elastik dan likatnya sesuatu bahan tersebut. Jadual 7.2 menunjukkan nilai modulus penyimpanan atau modulus elastik, E' pada suhu 128 °C iaitu nilai E' maksimum. Rajah 7.4 menunjukkan perbandingan nilai E' dalam CWHSM, CM dan HSM. SB daripada CWHSM mencatatkan nilai E' paling tinggi dengan 4.45×10^4 MPa, bermaksud SB ini mempunyai tenaga elastik tersimpan paling tinggi berbanding SB daripada medium yang lain. SB daripada CWHSM mempunyai kestabilan terma paling tinggi dan perintang haba yang terbaik.

Modulus penyimpanan amat berkait dengan sifat kristal dan amorfus bahan. SB daripada CWHSM mempunyai modulus penyimpanan maksimum mencadangkan bahawa SB daripada CWHSM mempunyai kandungan kristal paling tinggi berbanding SB daripada CM dan HSM. Penemuan ini adalah selari dengan George et al. (2005) iaitu ketahanan sifat-sifat mekanikal adalah kerana tingginya kandungan kristal dalam SB dan ketidakhadiran sifat rehat daripada rangkaian amorfus.

Elvie & Marie-Pierre (2007) menyatakan bahawa kajian terhadap sampel SB tulen tidak dapat dilakukan kerana kepingan mudah koyak dan berkedut. Namun begitu, apabila SB dicampur dengan PEO '*polyethylene oxide*' dan menjadi komposit nano SB/PEO, tiada kejatuhan modulus E' pada takat mencair PEO. Ini menunjukkan bahawa SB mampu memberikan kestabilan terma kepada matriks PEO tersebut. SB efektif dalam mengukuhkan matriks PEO semasa suhu peralihan kaca, meningkatkan takat mencair matriks melebihi takat mencair PEO.

Jadual 7.2 Nilai modulus penyimpanan pada suhu 128 °C

Sampel	Modulus Penyimpanan, E' (MPa)
CWHSM	4.45×10^4
CM	2.55×10^4
HSM	1.28×10^4



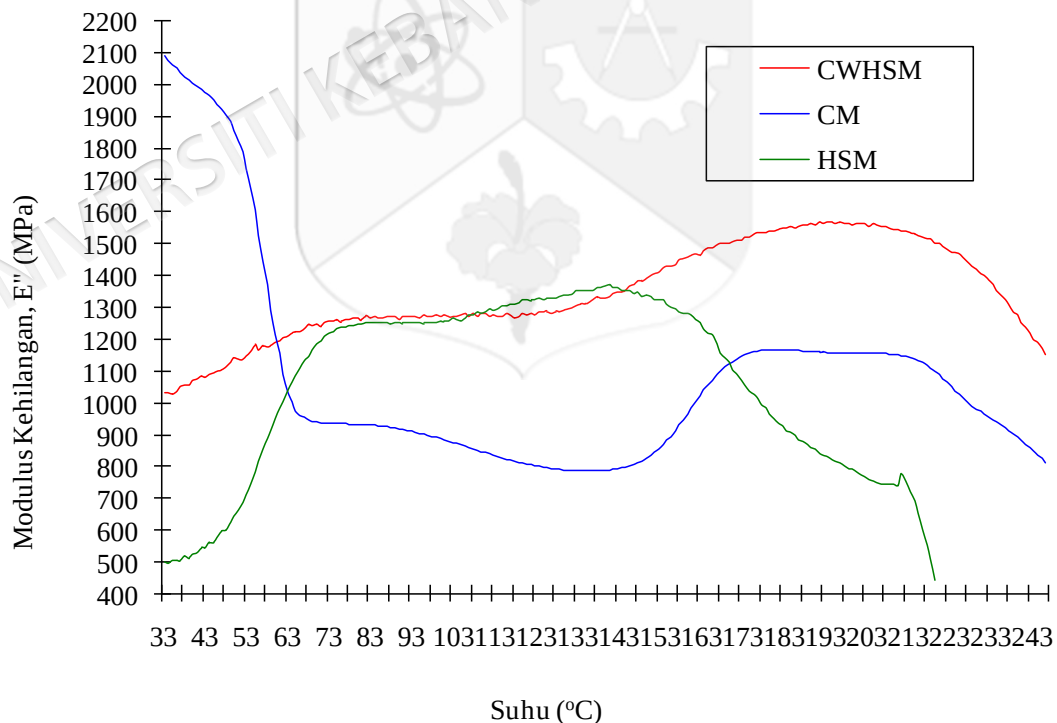
Rajah 7.4 Modulus Penyimpanan atau Modulus Elastik, E' SB daripada 3 medium

Jadual 7.3 menunjukkan nilai modulus kehilangan, E'' dan tan delta, $\tan \delta$ pada suhu 128 °C. Data ini diwakili oleh Rajah 7.5 dan 7.6. Modulus kehilangan dan tan delta menunjukkan sifat likat dan elastik sesuatu bahan, dan berkadaran antara satu sama lain. Modulus kehilangan paling rendah diperolehi daripada CM dengan

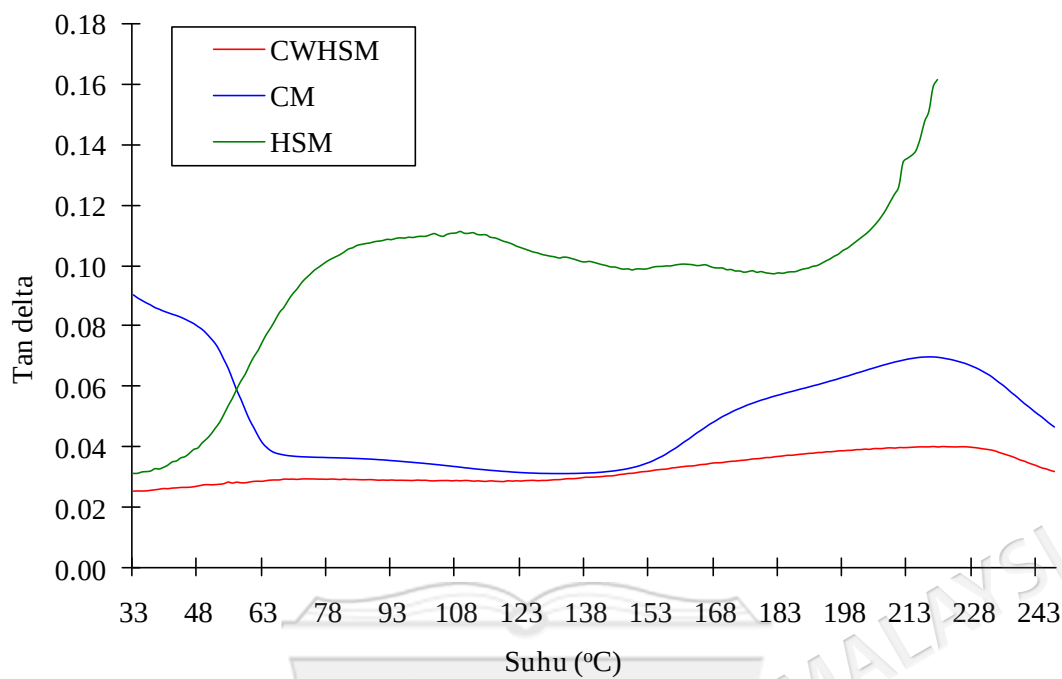
7.915×10^2 MPa. Nilai tan delta paling rendah iaitu 2.897×10^{-2} oleh SB daripada CWHSM menunjukkan bahawa SB tersebut adalah paling elastik berbanding SB daripada CM dan HSM. Tan delta paling tinggi pula daripada HSM menunjukkan bahawa SB tersebut paling likat '*viscous*'. Oleh itu SB adalah dikategorikan sebagai bahan viskoelastik iaitu mempunyai kedua-dua ciri likat dan elastik. Selepas rawatan kimia sodium hidroksida, nilai modulus kehilangan dan tan delta yang mewakili komponen likat dalam SB akan berkurangan (George et al. 2005). Komponen ini berperanan sebagai sifat viskoelastik bagi polimer.

Jadual 7.3 Nilai modulus kehilangan dan tan delta pada suhu 128°C

Sampel	Modulus Kehilangan, E'' (MPa)	Tan Delta, $\tan \delta$
CWHSM	1.288×10^3	2.897×10^{-2}
CM	7.915×10^2	3.099×10^{-2}
HSM	1.331×10^3	1.038×10^{-1}

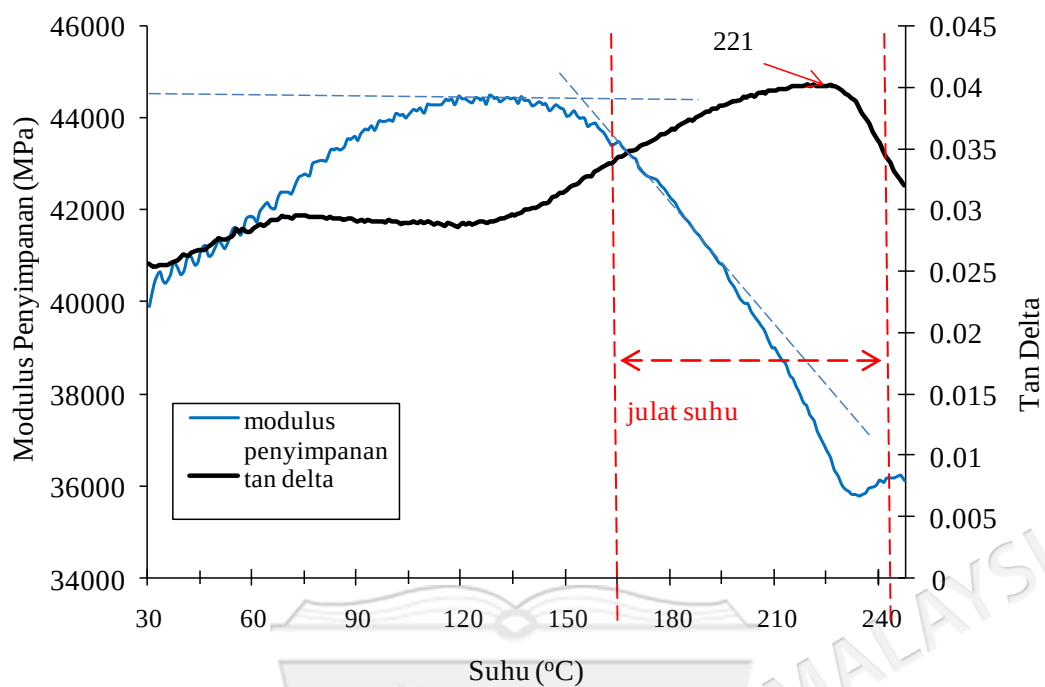


Rajah 7.5 Modulus Kehilangan, E'' SB daripada 3 medium

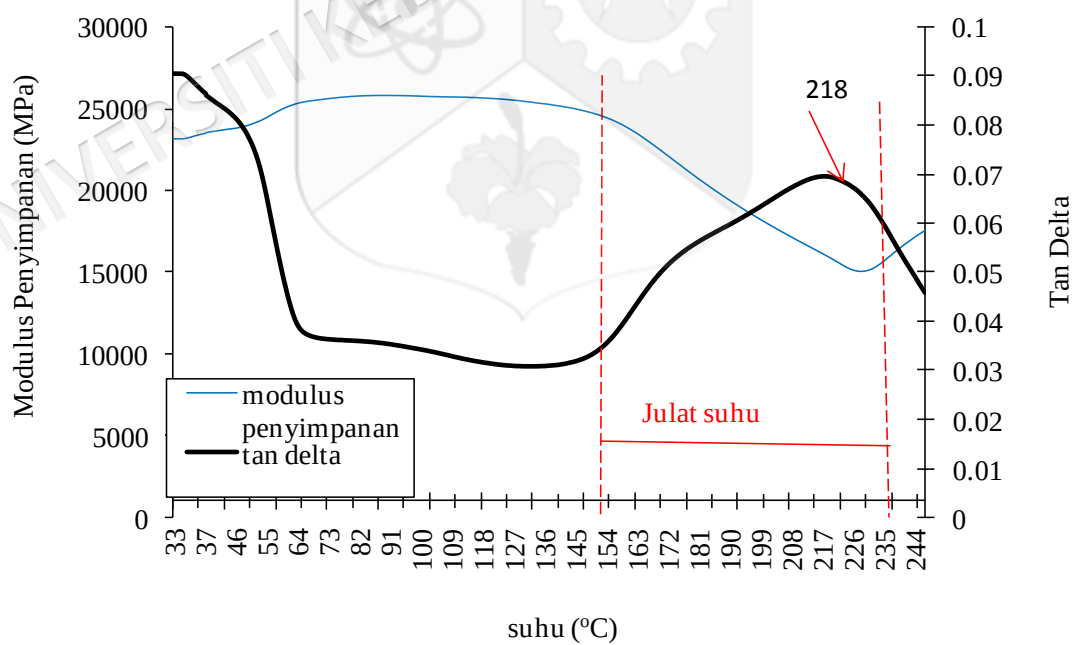


Rajah 7.6 Nilai Tan Delta, $\tan \delta$ SB daripada 3 medium

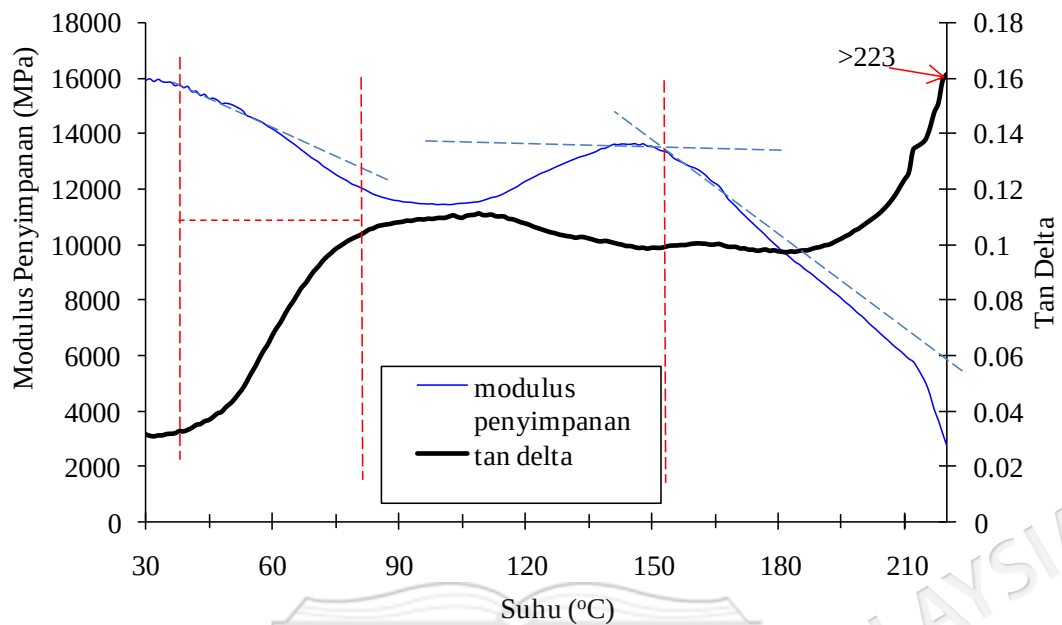
Rajah 7.7, 7.8 dan 7.9 menunjukkan bacaan nilai modulus penyimpanan dan tan delta dalam satu graf yang sama. Kombinasi kedua-dua nilai ini akan memberikan julat dan nilai suhu penguraian selulosa bagi setiap sampel SB. Daripada keluk modulus penyimpanan, julat suhu ditentukan bermula dari titik penurunan modulus sehingga ke akhir keluk. Selepas itu, puncak tertinggi oleh tan delta dalam julat tersebut dianggarkan sebagai nilai suhu penguraian selulosa bagi sampel. CWHSM dan CM mempunyai julat suhu yang sama iaitu antara 155-230 °C, dengan suhu penguraian selulosa masing-masing 221 °C dan 218 °C. HSM mempunyai dua julat suhu iaitu 37-82 °C dan 155->230 °C, tetapi suhu penguraian selulosa tidak dapat ditentukan daripada Rajah 7.11 dengan bacaan >223 °C.



Rajah 7.7 Spektrum SB daripada CWHSM



Rajah 7.8 Spektrum SB daripada CM

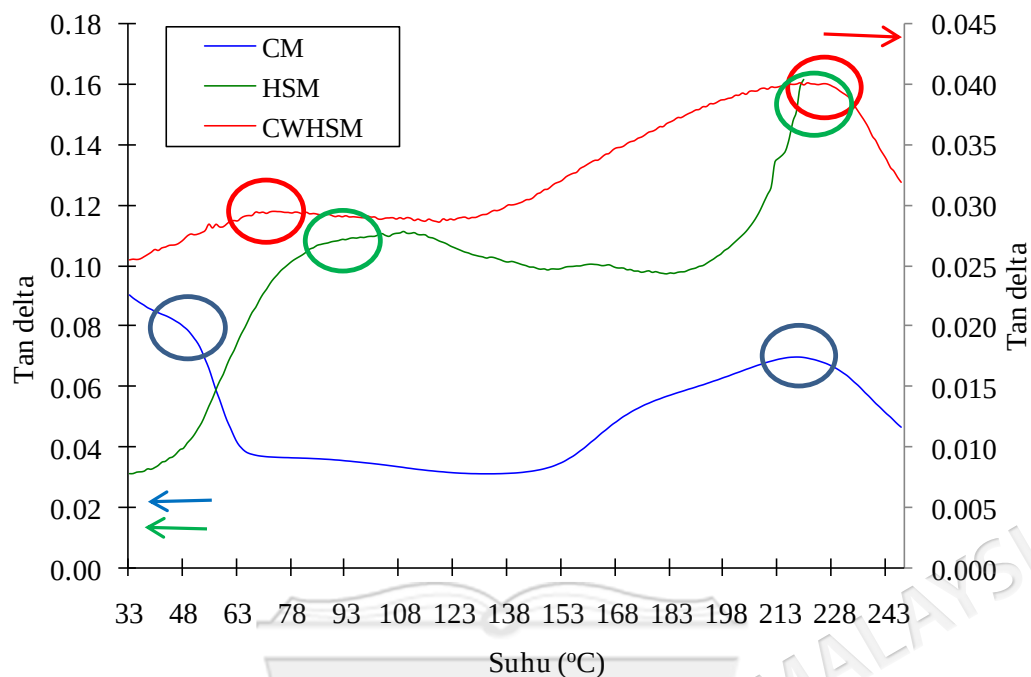


Rajah 7.9 Spektrum SB daripada HSM

Rajah 7.10 menunjukkan graf tan delta melawan suhu bagi ketiga-tiga sampel SB. Nilai tan delta bagi CWHSM ditunjukkan pada paksi-Y sekunder, manakala tan delta CM dan HSM diwakili oleh paksi-Y primer. Nilai tan delta ini akan memberikan suhu penguraian air dan suhu penguraian selulosa. Berpanduan kepada graf tersebut jelas menunjukkan bahawa suhu penguraian air dan penguraian selulosa maksimum oleh HSM dengan masing-masing 92 °C dan >223 °C. Nilai-nilai ini diringkaskan dalam Jadual 7.4.

Jadual 7.4 Aktiviti SB daripada 3 medium

Sampel	Penguraian air (°C)	Penguraian selulosa (°C)
CWHSM	73	221
CM	51	218
HSM	92	>223



Rajah 7.10 Profil tan delta bagi SB daripada tiga medium berbeza

7.2.3 Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM)

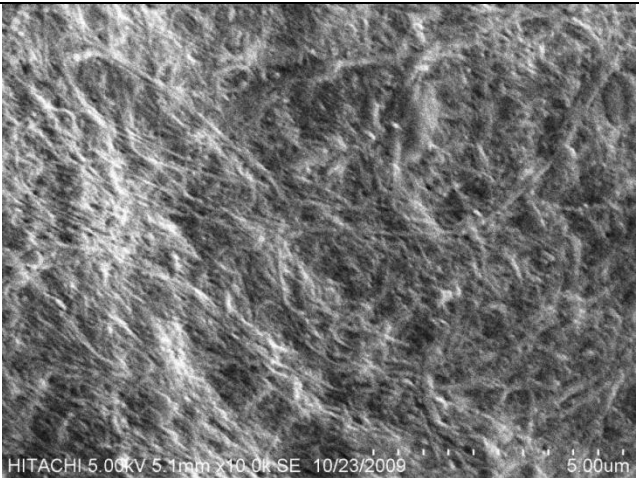
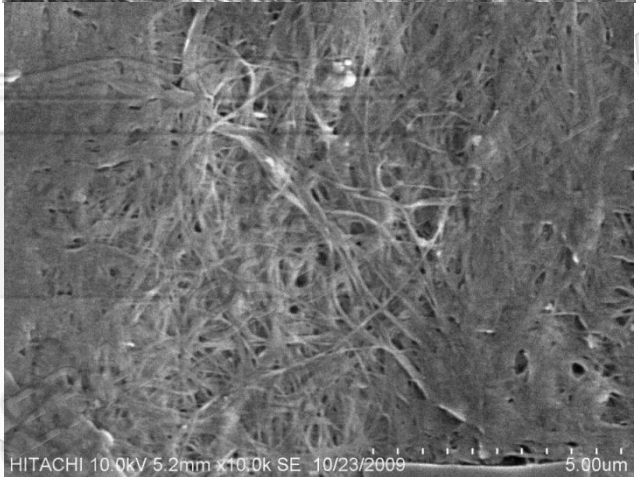
Rajah 7.11, 7.12 dan 7.13 menunjukkan mikrograf SB dalam CWHSM, CM dan HSM yang dianalisis menggunakan Mikroskop Pengimbas Elektron (SEM) pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi. Semua sampel dianalisis pada permukaan membran SB dengan skala pembesaran yang sama.

Rajah 7.11 menunjukkan pelikel SB daripada CWHSM dalam keadaan tidak tersusun, amat padat antara satu sama lain dan berselirat bagi ketiga-tiga sampel yang dikaji. Pada hari ke-7 amat jelas kelihatan liang antara pelikel dengan tekstur permukaan SB yang tidak sekata. Struktur poros dalam tiga dimensi adalah secara orientasi berpusat (Maneerung et al. 2007). Mikrograf juga menunjukkan keberhasilan rawatan alkali sodium hidroksida dalam menyingkirkan sel bakteria dan bendasing daripada membran SB. Diameter pelikel paling kecil diperolehi pada hari ke-4 dengan 46.8 nm, dikira secara purata daripada pengukuran automatik alatan SEM.

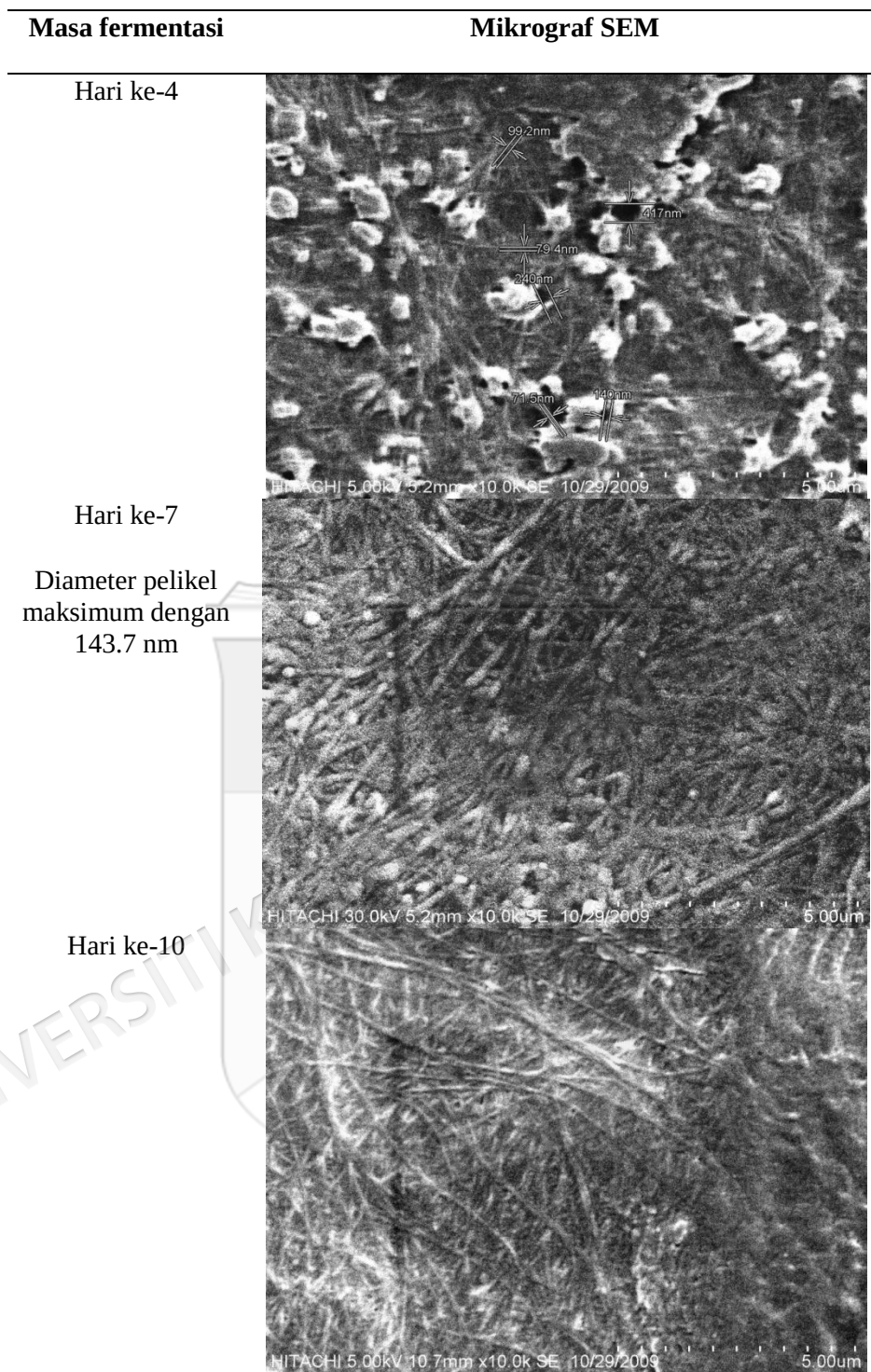
Rajah 7.12 menunjukkan pelikel SB daripada CM, lebih tersusun berbanding CWHSM dan tekstur permukaan SB lebih licin kecuali pada hari yang ke-4. Diameter pelikel maksimum diperolehi pada hari ke-7 dengan 143.7 nm. Pada hari ke-10 jelas kelihatan pelbagai saiz pelikel, halus dan besar berselirat antara satu sama lain. Keputusan ini membuktikan wujudnya beberapa lapisan penghasilan pelikel terhadap masa fermentasi (Ross et al. 1991, Klemm et al. 2001).

Rajah 7.13 menunjukkan pelikel SB daripada HSM, berselirat dengan saiz yang tidak sekata antara satu sama lain pada hari ke-4. Diameter liang maksimum dan minimum diperolehi masing-masing pada hari ke-7 dengan 225.5 nm dan hari ke-10 dengan 39.6 nm. Komposisi medium amat mempengaruhi susunan fibril SB pada peringkat mikroskopik dengan perbezaan ketara morfologi SB bagi CWHSM, CM dan HSM.

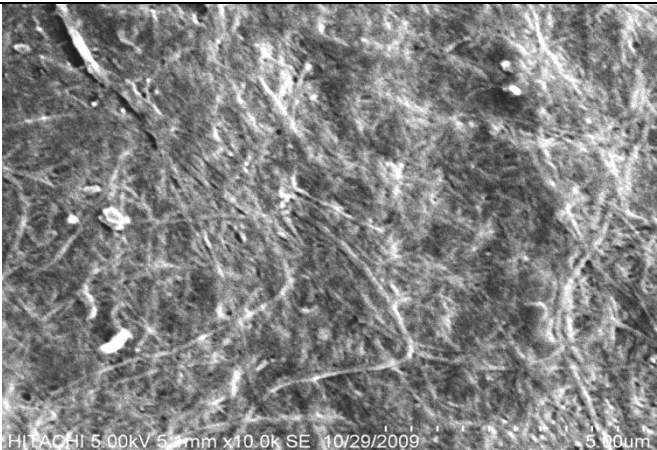
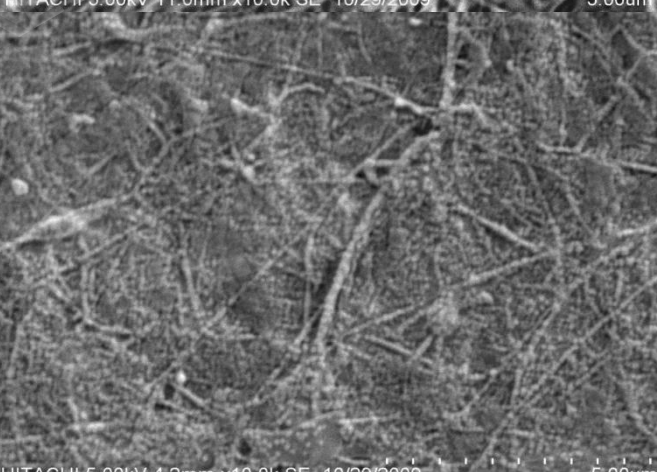
Semua mikrograf ini menggambarkan pemetaan penghasilan SB dalam CWHSM, CM dan HSM. Secara umumnya tren penghasilan SB adalah hampir sama walaupun medium penghasilan berbeza. Hari ke-4 iaitu peringkat awal fermentasi menunjukkan pelikel SB tidak mempunyai susunan khusus dan terdapat bahan sampingan lain, berkemungkinan bahan mentah yang masih banyak dalam medium penghasilan. Pada hari ke-7 iaitu fasa penghasilan SB maksimum, memberikan gambaran pelikel yang lebih besar dan jelas. Pada hari ke-10 pula memberikan kepelbagaian saiz pelikel kerana pelikel tersebut dihasilkan pada sela masa yang berbeza.

Masa fermentasi	Mikrograf SEM
Hari ke-4 Diameter pelikel minimum dengan 46.8 nm	
Hari ke-7	
Hari ke-10	

Rajah 7.11 Mikrograf SB dalam CWHSB pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi



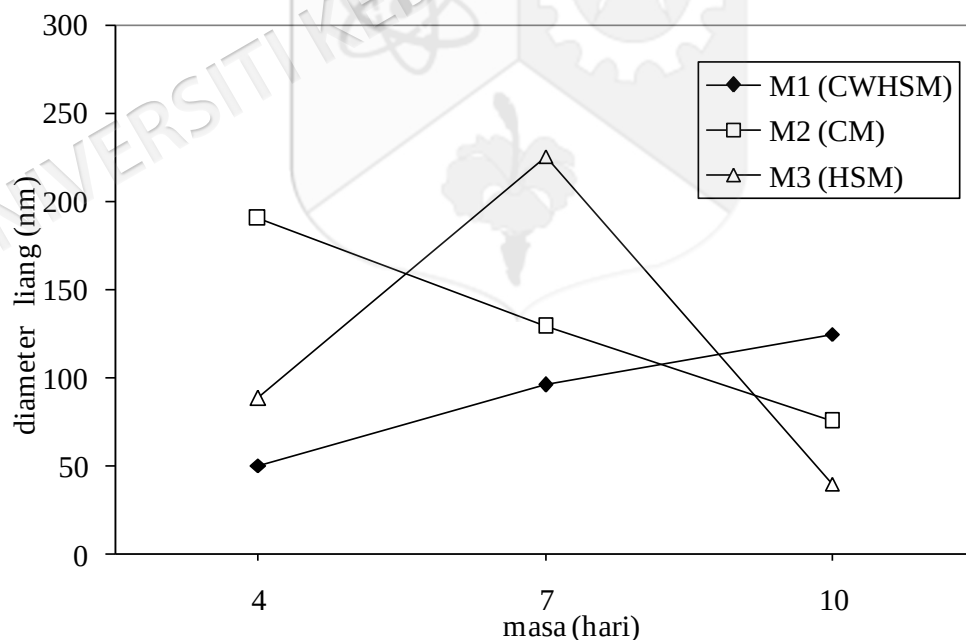
Rajah 7.12 Mikrograf SB dalam CM pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi

Masa fermentasi	Mikrograf SEM
Hari ke-4	
Hari ke-7 Diameter liang maksimum pada hari ke-7 dengan 225.5 nm	
Hari ke-10 Diameter liang minimum pada hari ke-10 dengan 39.6 nm.	

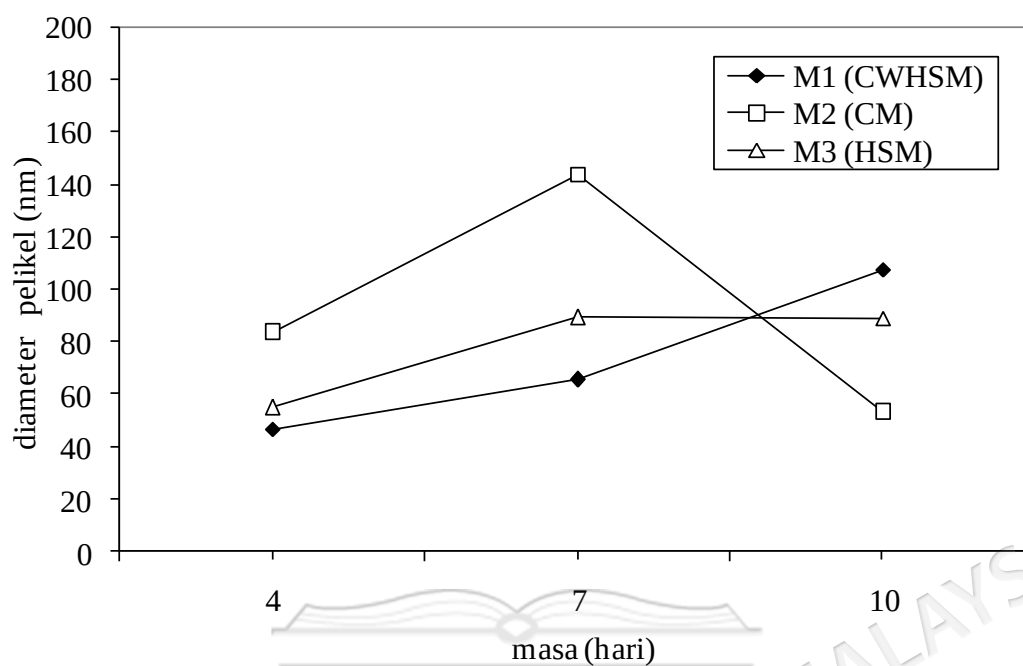
Rajah 7.13 Mikrograf SB dalam HSM pada hari ke-4, ke-7 dan ke-10 fermentasi

Diameter liang SB daripada tiga medium berbeza telah ditunjukkan dalam Rajah 7.14 dan diameter pelikel SB ditunjukkan dalam Rajah 7.15. Diameter liang adalah antara 39 ke 226 nm dan diameter pelikel adalah antara 52 ke 144 nm. Jika dibandingkan dengan diameter pelikel serat umum iaitu selulosa kapas adalah pada 16-22 μm (Choi et al. 2009), diameter pelikel SB dalam eksperimen ini iaitu 0.05-0.14 μm , secara puratanya adalah 190 kali lebih halus berbanding selulosa kapas.

Telah ditunjukkan dengan jelas bahawa diameter liang paling kecil (hari ke-10) dan paling besar (hari ke-7) daripada HSM. Tiada korelasi yang boleh dikaitkan dengan keputusan ini tetapi disimpulkan bahawa formulasi medium dan masa inkubasi memberikan kesan utama kepada morfologi SB yang terhasil. Setiap medium formulasi telah memberikan morfologi SB yang tersendiri. Bagi formulasi CWHSM, diameter liang dan diameter pelikel adalah berkadaran dengan masa inkubasi. Kenaikan diameter liang yang ketara ditunjukkan dari hari ke-4 hingga hari ke-10. Diameter liang bagi CWHSM adalah berkadaran dengan berat kering SB yang terhasil.



Rajah 7.14 Diameter liang bagi SB berbanding masa fermentasi



Rajah 7.15 Diameter pelikel bagi SB berbanding masa fermentasi



Rajah 7.16 Mikrograf SB pada hari ke-10 dalam CWHSM dengan dimensi

Rajah 7.16 menunjukkan mikrograf SEM pada hari ke-10 fermentasi bagi CWHSM. Purata diameter liang ialah 124.3 nm dan diameter pelikel ialah 107.6 nm. Mikrograf ini menunjukkan bahawa sintesis SB menghasilkan satu reben yang bertindih dalam struktur yang tidak teratur walaupun dalam kultur statik. Brown (1983) melaporkan bahawa apabila satu fibril mikro yang disintesis telah cukup panjang, ia akan berhubung dengan fibril mikro berdekatan untuk membentuk satu reben komposit fibril mikro selulosa. Arah sintesis sama ada satu arah atau kedua-dua arah, bergantung kepada strain yang digunakan untuk menghasilkan SB. Keputusan ini membuktikan bahawa formulasi medium dan pemilihan strain mempengaruhi susunan fibril selulosa yang terhasil.

7.2.4 Pembelaan Sinar-X (XRD)

Jadual 7.5 menunjukkan nilai produktiviti dan ketebalan basah bagi ketiga-tiga sampel SB. CWHSM adalah medium baru yang dicadangkan untuk penghasilan SB dan memberikan kesan besar kepada produktiviti SB. Sumber substrat utama adalah air kelapa daripada bahan buangan pertanian. Produktiviti CWHSM adalah dua kali ganda lebih tinggi berbanding CM dan HSM dengan $0.079 \text{ g/L.hari}^{-1}$. Produktiviti CM dan HSM adalah masing-masing $0.030 \text{ g/L.hari}^{-1}$ dan $0.024 \text{ g/L.hari}^{-1}$. Ketebalan basah BC diukur menggunakan angkup Vernier dan nilai tertinggi oleh CWHSM dengan 7.58 mm. CM dikenali sebagai medium kompleks dan dicadangkan oleh Institut Penyelidikan dan Pembangunan Pertanian Malaysia (MARDI), Serdang, Selangor, Malaysia. HSM adalah medium komersial dan digunakan dengan meluas oleh kebanyakan penyelidik dalam bidang ini.

Jadual 7.5 Data fermentasi SB pada hari ke-10

Sampel SB	Produktiviti (g/L.hari^{-1})	Ketebalan SB basah (mm)
CWHSM	0.079	7.58
CM	0.030	2.80
HSM	0.024	3.81

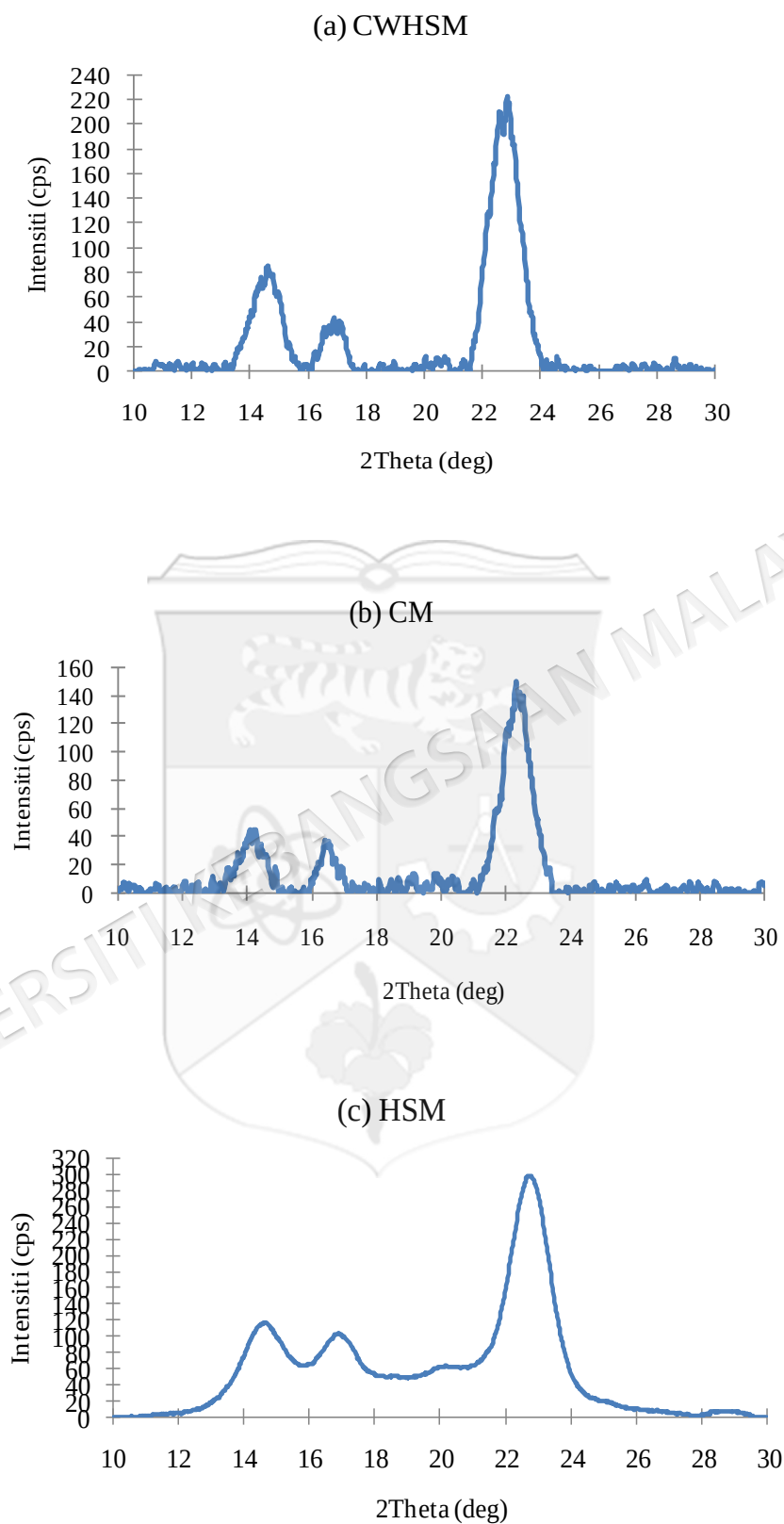
Jadual 7.6 menunjukkan data untuk jarak- d , saiz kristal, indeks pengkristalan relatif dan jenis kristal bagi sampel SB yang dianalisis menggunakan peralatan pembelauan sinar-X.

Jadual 7.6 Data sifat kristalografik bagi sampel SB

Jenis SB	Jarak- d (nm)			Saiz kristal (nm)			Indeks pengkristalan (CrI)	Indeks amorfus	Z
	d_1	d_2	d_3	cr1 (1 $\bar{1}$ 0)	cr2 (110)	cr3 (200)			
CWHSM	0.606	0.525	0.389	5.2	8.1	4.8	≈ 1.0	≈ 0	3.56
CM	0.620	0.537	0.394	6.3	10.0	5.7	0.993	0.072	17.35
HSM	0.604	0.524	0.391	7.1	8.0	4.7	0.807	0.193	0.64

Rajah 7.17 menunjukkan difraktogram sampel SB untuk nilai intensiti melawan 2θ . Unit intensiti yang digunakan ialah kiraan per saat '*count per second*' (cps). Jelas ditunjukkan bahawa puncak tajam diperolehi oleh sampel SB daripada CWHSM dan CM, manakala SB daripada HSM mempunyai puncak landai dan keluk sinar-X memberikan nilai maksimum yang lebar dalam satu atau dua titik. Cullity (1956) menyatakan bahawa perbezaan penyerakan sinar-X bergantung kepada jenis bahan. Keluk intensiti penyerakan terhadap 2θ untuk pepejal kristal adalah sifar kecuali pada beberapa sudut di mana puncak tinggi tajam terjadi yang dikenali sebagai sinaran terserak. Kedua-dua pepejal dan cecair amorfus berupaya untuk bertertib '*order*'.

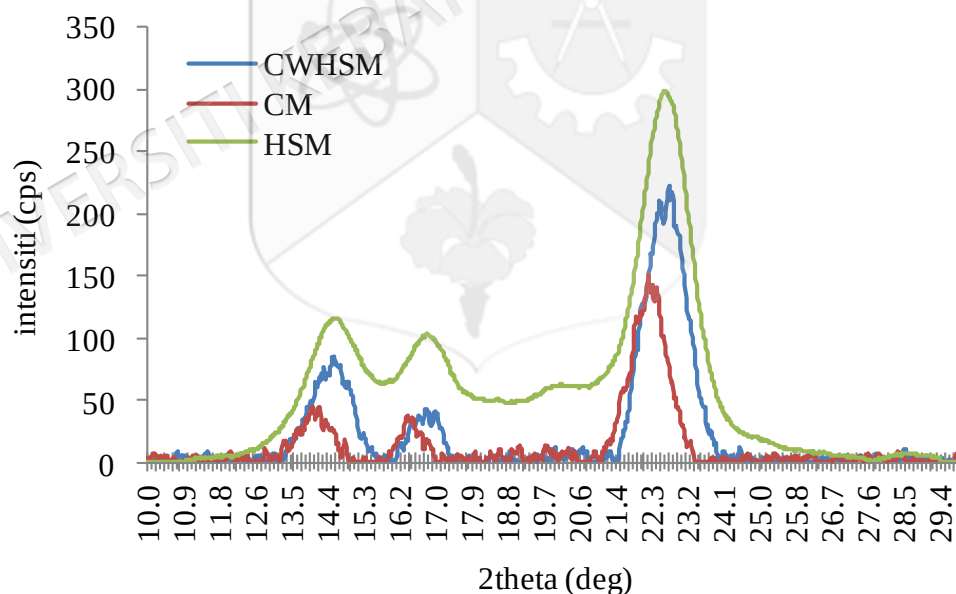
Rajah 7.18 menunjukkan berbezaan difraktogram bagi ketiga-tiga sampel SB. Sampel CWHSM dan CM menunjukkan persamaan manakala sampel SB daripada HSM agak berbeza antara satu sama lain. Indeks pengkristalan relatif bagi HSM adalah paling rendah dengan 0.807 (Jadual 7.6), menunjukkan bahawa bahan tersebut mempunyai lebih kandungan amorfus berbanding SB daripada CWHSM dan CM. Komposisi medium penghasilan memberikan kesan yang besar kepada sifat SB yang terhasil. Indeks pengkristalan daripada CWHSM menghampiri 1.0, menyarankan bahawa terlalu sedikit atau langsung tiada kandungan amorfus dalam SB. Ini juga ditunjukkan oleh CM yang mempunyai indeks pengkristalan 0.993.



Rajah 7.17 Spektra difraktogram sinar-X oleh sampel SB dalam (a) CWHSM, (b) CM dan (c) HSM

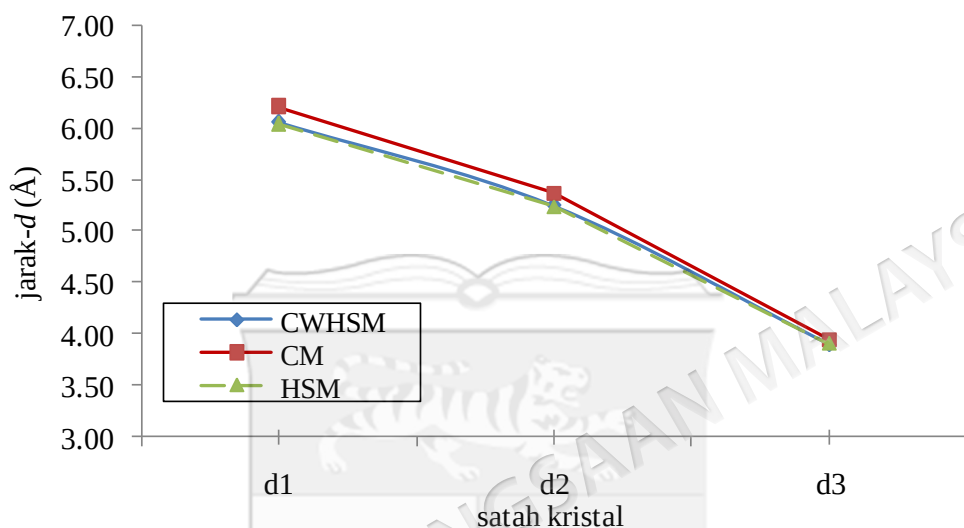
Daripada keputusan ini disimpulkan bahawa SB daripada CWHSM dikategorikan sebagai kristal dan mempunyai ruang antara puncak dalam difraktogram yang lebih lebar. Keluk intensiti melawan 2θ bagi CWHSM akan menjadi sifar kecuali beberapa titik di mana puncak maksimum terjadi. SB daripada HSM diklasifikasikan sebagai lebih amorfus yang diwakili dengan keluk lebih landai. Susunan atom dalam amorfus adalah tidak padat.

Bansal et al. (2010) menyatakan bahawa indeks pengkristalan adalah berkadar songsang dengan kadar hidrolisis enzim. Peningkatan dalam indeks pengkristalan akan menurunkan kadar hidrolisis. Pengkristalan selulosa telah diiktiraf sebagai salah satu daripada sifat substrat yang utama dalam mengira kadar hidrolisis. Pengkristalan dirujuk kepada kandungan kristal dalam selulosa dan memberikan gambaran perlakuan substrat terhadap pengaruh enzim. Berpanduan kepada fakta tersebut, sampel SB daripada CWHSM telah dikenalpasti mempunyai kadar hidrolisis paling rendah dan dominan kepada kesan enzim.



Rajah 7.18 Perbandingan profil penyerakan sinar-X bagi sampel SB dalam medium penghasilan berbeza

Rajah 7.19 dan Jadual 7.6 menunjukkan jarak- d untuk d_1 , d_2 dan d_3 . Jarak- d adalah ruang antara dua satah $10, 100$ dan 200 untuk selulosa. Jarak- d maksimum diperolehi daripada CM dan disimpulkan bahawa ruang antara atom dalam CM adalah lebih luas berbanding CWHSM dan HSM. Nilai d_3 adalah hampir sama untuk ketiga-tiga sampel SB dengan 0.39 nm dan jelas ditunjukkan dalam graf.

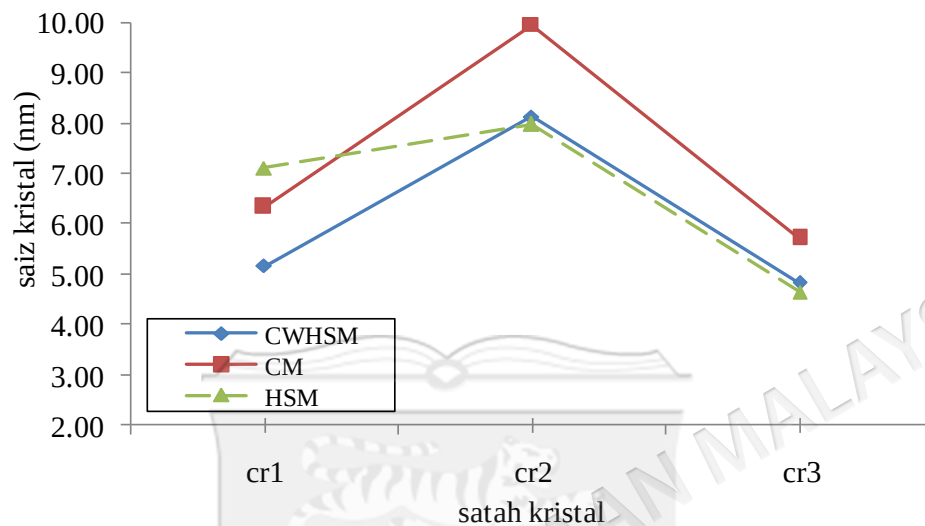


Rajah 7.19 Nilai jarak- d bagi sampel SB

Daripada keputusan jarak- d yang diperolehi, jelas menunjukkan bahawa sampel SB yang digunakan dalam kajian ini adalah dari jenis selulosa I_α -kaya. Keputusan ini dibuktikan dengan nilai positif nombor Z , iaitu lebih besar daripada sifar, dan dikategorikan sebagai jenis alga-bakteria (Wada et al. 2001). Struktur bagi selulosa I_α adalah dalam sistem triklinik (Sugiyama et al. 1991). Berpanduan kepada sistem kristal, sistem triklinik mempunyai tiga paksi yang tidak sama, kecondongan yang tidak sama dan semuanya tidak berada pada sudut yang betul. Kekisi Bravais bagi sistem triklinik dikategorikan sebagai 'ringkas' dengan simbol P (Cullity 1956) tanpa sebarang unsur simetri dalam sistem.

Rajah 7.20 menunjukkan saiz kristal bagi sampel SB pada satah kristal cr_1 , cr_2 dan cr_3 . Kebanyakan aplikasi oleh Scherrer menganggap bentuk kristal sebagai sfera. Saiz kristal kurang daripada 100 nm boleh dikira dengan mudah menggunakan teknik pembelauan serbuk. Berpanduan kepada graf, saiz kristal SB adalah di antara 4.65 -

9.97 nm. Saiz kristal pada satah cr2 menunjukkan bacaan paling tinggi berbanding satah cr1 dan cr3 untuk ketiga-tiga sampel. Kim et al. (2010) menyatakan bahawa penguraian terma bagi selulosa akan berpindah kepada suhu yang lebih tinggi dengan pertambahan saiz kristal.



Rajah 7.20 Saiz kristal bagi sampel SB

7.3 KESIMPULAN

SB daripada CWHSM mempunyai sifat pengkristalan paling tinggi, susunan pelikel paling padat, mempunyai tenaga elastik tersimpan paling tinggi seterusnya bersifat stabil terhadap suhu dan perintang haba yang terbaik. Indeks pengkristalan tertinggi diperolehi oleh SB daripada CWHSM menunjukkan bahawa biopolimer ini dominan kepada tindakan enzim. SB daripada HSM adalah paling likat '*viscous*' dan mempunyai kandungan amorfus paling tinggi menjadikannya kurang rintangan terhadap tindakan enzim. SB daripada CM pula mempunyai isipadu kristal terbesar (10.0 nm) yang maksimum pada satah 110. Komposisi medium penghasilan dan masa fermentasi merupakan faktor utama yang menyumbang kepada morfologi SB yang terhasil. Kesemua SB dalam kajian ini adalah selulosa I_{α} -kaya dalam kategori alga-bakteria dan berstruktur sistem triklinik.

BAB VIII

KESIMPULAN DAN CADANGAN

8.1 KESIMPULAN

Satu medium penghasil SB yang murah dan tinggi produktiviti bersumberkan bahan buangan pertanian iaitu air kelapa telah dapat ditentukan daripada kajian ini. Formulasi medium CWHSM berpotensi sebagai medium penghasil SB yang efektif dengan penghasilan berat kering SB tertinggi, 0.343 g/L dan produktiviti maksimum 0.044 g/L.hari⁻¹. Peratus kandungan SB paling tinggi (1.61%) diperolehi daripada CWHSM statik, peratus kandungan air paling tinggi (96.89%) diperolehi daripada HSM goncang manakala CM statik memberikan peratus kandungan sel paling tinggi (10.64%).

Lanjutan kajian penghasilan SB dalam CWHSM menyatakan bahawa penghasilan berat kering SB dalam kultur permukaan statik adalah 1.43 kali lebih tinggi berbanding kultur goncang. Kadar pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{mak}) bagi kultur statik adalah 0.380 hari⁻¹ dan masa penggandaan (t_d) ialah 1.82 hari, ditentukan secara anggaran daripada keluk penghasilan SB dengan anggapan biosintesis SB adalah pertumbuhan berkait '*growth associated*'. Yil tertinggi (0.127 g SB/g gula keseluruhan), berat kering SB maksimum (0.343 g/L) dan produktiviti maksimum (0.043 g/L.hari⁻¹) diperolehi daripada kultur permukaan statik pada hari ke-8 fermentasi. Nisbah luas permukaan kepada isipadu medium, $L/I=0.84$ menunjukkan kadar penghasilan SB lebih tinggi berbanding nisbah yang lain selepas hari ke-5 fermentasi sehingga mencapai maksimum pada hari ke-7 dengan 0.358 g/L. Luas permukaan medium adalah perkadaran dengan kadar penggunaan substrat oleh

strain *A. xylinum* 0416. Kadar penghasilan SB maksimum dan produktiviti maksimum diperolehi pada pH awalan 5.0 dengan 0.348 g/L dan 0.058 g/L.hari⁻¹.

Proses perawatan SB dengan penambahan unit operasi rendaman berkesan untuk menyingkirkan keseluruhan larutan sodium hidroksida daripada SB. Kaedah ini juga efektif dalam menjamin kualiti SB terutama untuk disimpan dalam jangka masa yang lama dan untuk aplikasi akan datang. SB juga dikategorikan sebagai biopolimer bersaiz nano yang mempunyai kelebihan aplikasi pelbagai bidang.

SB daripada CWHSM mempunyai sifat pengkristalan paling tinggi, susunan pelikel paling padat, mempunyai tenaga elastik tersimpan paling tinggi seterusnya bersifat stabil terhadap suhu dan perintang haba yang terbaik. Indeks pengkristalan tertinggi diperolehi oleh SB daripada CWHSM menunjukkan bahawa biopolimer ini dominan kepada tindakan enzim. SB daripada HSM adalah paling likat '*viscous*' dan mempunyai kandungan amorfus paling tinggi menjadikannya kurang rintangan terhadap tindakan enzim. SB daripada CM pula mempunyai isipadu kristal terbesar (10.0 nm) yang maksimum pada satah 110. Komposisi medium penghasilan dan masa fermentasi merupakan faktor utama yang menyumbang kepada morfologi SB yang terhasil. Kesemua SB dalam kajian ini adalah selulosa *I_α*-kaya dalam kategori alga-bakteria dan berstruktur sistem triklinik.

Sebagai kesimpulan daripada keseluruhan kajian ini ialah satu biopolimer baru yang mempunyai ciri berpotensi untuk pengkomersilan telah berjaya dihasilkan daripada bahan buangan pertanian tempatan iaitu air kelapa yang merupakan sumber karbon utama fermentasi. Satu biopolimer yang kompetitif, mesra alam, murah dan berinovatif mampu memberikan satu dimensi baru dalam bidang biobahan masa kini. Keistimewaan kajian ini ialah kualiti SB yang terhasil akan konsisten dari segi integriti dan strukturnya, medium penghasilan yang murah dan produktif dapat dibangunkan daripada sisa agro, satu kaedah pengukuran berat kering SB yang cepat telah diperolehi dan data pencirian SB yang spesifik berpanduan medium penghasilan telah dapat dihasilkan.

8.2 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

Kajian ini dapat dilanjutkan mengikut beberapa kategori iaitu pengoptimuman medium penghasilan seperti menambahkan penggalak etanol dan asid laktik di dalam medium semasa fasa awal fermentasi. Langkah ini dijangka dapat meningkatkan penghasilan SB dan pertumbuhan strain *A. xylinum* 0416 dalam sistem. Kajian sistem fermentasi untuk pempolimeran dan pengkristalan juga merupakan kriteria penting dalam memastikan pemahaman yang terperinci tentang fermentasi SB oleh *A. xylinum* 0416 secara keseluruhannya. Kajian terhadap sumber substrat tempatan yang lain seperti sisa buah-buahan dan makanan boleh dijadikan sumber substrat utama untuk penghasilan SB. Reka bentuk reaktor untuk penghasilan SB menggunakan CWHSM perlu dibangunkan untuk memastikan kelangsungan kajian ini dapat dikomersilkan.



RUJUKAN

- Alaban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for nata de coco bacterium or nata formation in coconut water. *Philippine Agriculturist* 45(9): 490-516.
- Alvarez, O.M., Patel, M., Booker, J. & Markowitz, L. 2004. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients. *Wounds* 16(7): 224-33.
- Ammon, H., Ege, W., Oppermann, M., Gopel, W. & Eisele, S. 1995. Improvement in the long term stability of an Amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. *Analytical Chemistry* 67: 466-471.
- Aschner, M. & Hestrin, S. 1946. Fibrillar structure of cellulose of bacterial and animal origin. *Nature* 157: 659.
- Atalla, R.H. & VanderHart, D.L. 1984. Native cellulose: A composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223: 283-285.
- Atalla, R.H. 1989. Patterns of aggregation in native celluloses: implication of recent spectroscopic studies. Dlm. Kenndey, J.F., Phillips, G.O. & Williams, P.A. (pnyt.). *Cellulose*, hlm. 61-73. Chichester: Ellis Horwood.
- Atalla, R.H. 1999a. Dlm: Barton, D. & Meth-Cohn, O. (pnyt.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Ed. ke-2. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.U.
- Atalla, R.H. 1999b. The individual structures of native celluloses. *10th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Main Symposium*, hlm. 608-614.
- Atalla, R.H., Hackney, H.M., Uhlin, I. & Thompson, N.S. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 15: 109-112.
- Azizi M.A.S., Chazeau, L., Alloin, F., Cavaille', J.Y., Dufresne, A. & Sanchez, J.Y. 2005. POE-based nanocomposite polymer electrolytes reinforced with cellulose whiskers. *Electrochim. Acta* 50(19): 3897-3903.
- Bae, S., Yasushi, S. & Makoto, S. 2004. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(1): 33-38.
- Bansal, P., Hall, M., Matthew, J.R., Jay, H.L. & Andreas, S.B. 2010. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose: A new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. *Bioresource Technology* 101: 4461-4471.

- Baranov, A.I., Anisimova, V.N. & Khripunov, A.K. 2002. Glass transition and dielectric properties of *Acetobacter xylinum* cellulose. *Proceedings of Seventh RCBJ Symposium on Ferroelectricity*, hlm. 90.
- Benziman, M., Haigler, C.H., Brown, Jr.R.M., White, A.R. & Cooper, K.M. 1980. Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 77: 6678-6682.
- Benziman, M., Ross, P., Amikam, D., Mayer, R., Weinhouse, H., Ohana, P. & Michaeli, D. 1989. Dlm. Schuerch, C. (pnyt.). *Cellulose and Wood-Chemistry and Technology*, hlm. 519. New York: Wiley and Sons Inc.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. & Kalinowska, H. 2002. Bacterial Cellulose. Dlm. Vandamme, E.J., De Baets, S. & Steinbuechel, A. *Biopolymers*, hlm. 37-90. Weinheim: Wiley-VCH.
- Birley, A.W., Haworth, B. & Batchelor, J. 1992. Physics of plastics processing, properties and material engineering. *Hanser*: 276-279.
- Borzani, W. & De Souza, S.J. 1995. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnology Letters* 17: 1271-1272.
- Brown, E.E. & Marie-Pierre, G.L. 2007. Bioengineering bacterial cellulose-polyethylene oxide nanocomposites. *Biomacromolecules* 8: 3074-3081.
- Brown, R.M., Willison, J.H.M. & Richardson, C.L. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, hlm. 4565-4569.
- Brown, R.M.Jr. 1983. The biosynthesis and degradation of cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* 37: 33-78.
- Brown, R.M.Jr. 1985. The microbial synthesis of cellulose. Dlm. *Bioexpo85*, hlm. 325-335. Massachusetts: Kahn's Exposition Group.
- Brown, R.M.Jr. 1988. Sheeted Products Formed From Reticulated Microbial Cellulose. *US Patent* 4,863,565.
- Brown, R.M.Jr. 1989. Bacterial cellulose. Dlm. Kennedy, Phillips, & Williams (pnyt.). *Cellulose: structural and functional aspects*, hlm. 145-151. Ellis Horwood Ltd.
- Brown, R.M.Jr. 1990. Algae as tools in studying the biosynthesis of cellulose, nature's most abundant macromolecule. Dlm: Wiessner, Robinson & Starr (pnyt.). *Experimental Phycology I: Cell walls and Surfaces, Reproduction, Photosynthesis*, hlm. 20-39. Berlin: Springer-Verlag.

- Brown, R.M.Jr. 1990. Microbial Cellulose Modified During Synthesis. *U.S. Patent* 4,942,128.
- Brown, R.M.Jr. 1991. Advances in cellulose biosynthesis. Dlm: Chum, H.L.D. (pnyt.). *Polymers from biobased materials*, New Jersey: Data Corporation.
- Brown, R.M.Jr. 1992. Emerging technologies and future prospects for industrialization of microbially derived cellulose. Dlm. Ladisch, M.R. & Bose, A. (pnyt.). *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*. ACS Conference Proceedings Series.
- Brown, R.M.Jr. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science* 42: 487-495.
- Budhiono, A., Rosidia B., Tahera, H. & Iguchib, M. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers* 40: 137-143.
- Bungay, H.R., Serafica, G. & Mormino, R. 1997. Environmental implications of microbial cellulose, hlm. 691-700. Dlm: Wise, D.L. (pnyt.) *Global Environmental Biotechnology*, hlm. 691-700. Amsterdam: Elsevier Science.
- Bureau, T.E. & Brown, Jr.R.M. 1987. In vitro synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(20): 6985-6989.
- Cannon, R.E. & Anderson, S.M. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Microbiology* 17: 435-447.
- Choi, C.N., Song, H.J., Kim, M.J., Chang, M.H. & Kim, S.J. 2009. Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(1): 136-140.
- Clark, G.L. & Terford, H.C. 1955. Quantitative X-ray determination of amorphous phase in wood pulp as related to physical and chemical properties. *Analytical Chemistry* 27: 888-895.
- Colvin, J.R. & Leppard, G.G. 1977. The Biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 701-709.
- Cullity, B.D. 1956. *Elements of X-ray diffraction*. United States of America: Addison-Wesley Publishing Company.
- Czaja, W., Kawecki, M., Krystynowicz, A., Wysota, K., Sakiel, S. & Wroblewski, P. 2004a. Application of bacterial cellulose in treatment of second and third degree burns. *The 227th ACS National Meeting*, Anaheim, CA, USA.

- Czaja, W., Romanovicz, D. & Brown, R.M.Jr. 2004b. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* 11: 403-411.
- De Jesus-Gallardo, E, Andres, R.M. & Magno, E.T. 1971. A study on the isolation and screening of microorganism for production of diversified textured Nata. *Philippine Journal of Science* 100(1): 41-51.
- De Wulf, P., Joris, K. & Vandamme, E.J. 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto) gluconate synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 67: 376-380.
- Debzi, E.M., Chanzy, H., Sugiyama, J., Tekely, P. & Excoffier, G. 1991. The I α →I β transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums *Macromolecules* 24: 6816-6822.
- Elvie, E.B. & Marie-Pierre, G.L. 2007. Bioengineering Bacterial Cellulose (ethylene oxide) Nanocomposites. *Biomacromolecules* 8: 3074-3081.
- Embuscado, M., Marks, J. & Miller, J. 1994a. Bacterial cellulose: I. Factors affecting the production of *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocolloids* 8(5): 407-418.
- Embuscado, M., Marks, J. & Miller, J. 1994b. Bacterial cellulose: II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology. *Food Hydrocolloids* 8(5): 419-430.
- Feidler, S., Fussel, M. & Shettler, K.Z. 1989. Production and application of bacterial cellulose. *Microbiol.* 144: 473-484.
- Fontana, J.D., Soaza, A.M., Fontana, C.K., Torriani, I.L., Mores, J., Galloti, B., Souza, S.J., Narcisco, G.P., Bichara, J.A., & Farah, L.F. 1990. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol* 24: 253-264.
- Fornig, E.R, Anderson, S.M. & Cannon, R.E. 1989. Synthetic medium for *Acetobacter xylinum* that can be used for isolation of auxotrophic mutants and study of cellulose biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 55(5): 1317-1319.
- George, J., Ramana, K.V., Sabapathy, S.N., Jagannath, J.H. & Bawa, A.S. 2005. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 37: 189-194.
- Geyer, U., Heinze, T., Stein, A., Klemm, D., Marsch, S., Schumann, D. & Schmauder, H.P. 1994a. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 16(6): 343.

- Geyer, U., Klemm, D. & Schmauder, H. 1994b. Kinetics of the utilization of different carbon sources and the cellulose formation by *Acetobacter xylinum*. *Acta Biotechnol.* 14(3): 261-266.
- Gostomski, P.A & Schrecker, S.T. 2005. Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnology Letters* 27: 1435-1438.
- Gromet-Elhanan, Z. & Hestrin, S. 1962. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: Growth on citric acid-cycle intermediates. *Journal Bacteriol* 85: 284-292.
- Hackney, J., Atalla, R. & VanderHart, D. 1994. Modification of crystallinity and crystalline structure of *Acetobacter xylinum* cellulose in the presence of water-soluble B-1,4-linked polysaccharides: ¹³C-NMR evidence. *Intl. J. Biol. Macromol* 16(4): 215-218.
- Haigler, C.H. 1985. Dlm. Nevell, T.P. & Zeronian, S.H. (pnyt.). *Cellulose chemistry and its applications*, hlm. 30-75. Chichester: Horwood Limited.
- Haigler, C.H. & Benziman, M. 1982. Dlm. Brown, R.M.Jr. (pnyt.). *Cellulose and other natural polymer systems*, hlm. 273-295. Plenum Press.
- Hermans, P.H. & Weidinger, A. 1948. Quantitative X-ray investigation on the crystallinity of cellulose fibre. *J. Applied Physics* 19: 491-506.
- Hessea, S. & Tetsuo, K. 2005. Behavior of cellulose production of *Acetobacter xylinum* in ¹³C-enriched cultivation media including movements on nematic ordered cellulose templates. *Carbohydrate Polymers* 60: 457-465.
- Hestrin, S., Aschner, M. & Mager, J. 1947. Synthesis of cellulose by resting cells of resting cells of *Acetobacter xylinum*. *Nature* 159: 64-65.
- Hestrin, S. & Schramm, M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* 58: 345.
- Hestrin, S. 1961. Biological structure and function. *Proceedings of IUB/IUBS International Symposium*, hlm. 315. London: Academic Press.
- Hirai, A., Tsuji, M., & Horii, F. 1997. Culture conditions producing structure entities composed of cellulose I and II in bacterial cellulose. *Cellulose* 4: 239-245.
- Hirai, A., Tsujii, Y., Tsuji, M., & Horii, F. 2004. AFM observation of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum*. *Biomacromolecules* 5(6): 2079-2081.

- Hong, F. & Qiu, K. 2007. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter acetii* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate Polymer* 72(3): 545-549.
- Horii, F., Yamamoto, H., Kitamaru, R., Tanahashi, M. & Higuchi, T. 1987. Transformation of native cellulose crystals induced by saturated steam at high temperatures. *Macromolecules* 20(11): 2946-2949.
- Hult, E.L., Shigeru, Y., Masaru, I. & Junji, S. 2003. Aggregation of ribbons in bacterial cellulose induced by high pressure incubation. *Carbohydrate Polymers* 53: 9-14.
- Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun Y.R. & Kim, Y.S. 1999. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRCS in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(2): 183-188.
- Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Ichimura, K., Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S. & Watanabe, K. 1988. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength, *US Patent* 4,742,164.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. & Budhiono, A. 2000. Review bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science* 35: 261-270.
- Johnson, D.C. & Winslow, A.R. 1990. Bacterial cellulose has potential application as new paper coating. *Pulp & Paper* May:105-107.
- Jonas, R. & Luiz, F.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59: 101-106.
- Joris, K. & Vandamme, E.J. 1993. Novel production and applications of bacterial cellulose. *Eur. Microbiol.* 1: 27-29.
- Jung, J.Y., Khan, T., Park, J.K. & Chang, H.N. 2007. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean J. Chem. Eng.* 24(2): 265-271.
- Jung, J.Y., Park, J.K. & Chang, H.N. 2005. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 347-354.
- Karla, S., Steffen, F. & Erica, B. 2005. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose* 12: 223-231.
- Keshk, S. & Sameshima, K. 2005. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology* 4: 478-482.

- Keshk, S. & Sameshima, K. 2006a. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 4-8.
- Keshk, S. & Sameshima, K. 2006b. The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 291-296.
- Kim, U., Seok, H.E. & Masahisa, W. 2010. Thermal decomposition of native cellulose: Influence on crystallite size. *Polymer Degradation and Stability* 95: 778-781.
- Klemm, D., Dieter, S., Ulrike, U. & Silvia, M. 2001. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26: 1561-1603.
- Kondo, T., Togawa, E. & Brown, R.M.Jr. 2001. Nematic ordered cellulose; A concept of glucan chain association. *Biomacromolecules* 2: 1324-1330.
- Kondo, T., Nojiri, M., Hishikawa, Y., Togawa, E., Romanovicz, D. & Brown, R.M.Jr. 2002. Biodirected epitaxial nanode-position of polymers on oriented macromolecular templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14008-14013.
- Kong, Y. & Hay, J.N. 2002. The measurement of crystallinity of polymers by DSC. *Polymer* 43: 3873-3878.
- Kouda, T., Takaak, N., Hisato, Y. & Fumihiro, Y. 1997a. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(2): 124-127.
- Kouda, T., Yano, H. & Yoshinaga, F. 1997b. Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83(4): 371-376.
- Koyama, M., Sugiyama, J. & Itoh, T. 1997. Systematic survey on crystalline features of algae cellulose. *Cellulose* 4(2): 147-160.
- Krassig, H.A. 1993. *Cellulose: Structure, accessibility and reactivity*, hlm. 44-49. Switzerland: Gordon and Breach Science Publishers.
- Krieg, N.R. & Holt, J.C. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, hlm. 267-274. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Krystynowicz, A., Bielecki, S., Czaja, W. & Rzycka, M. 2000a. Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. Dlm. Bielecki, S., Tramper, J. & Polak, J. (pnyt.) *Food Biotechnology*, hlm. 345. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

- Krystynowicz, A., Czaja, W., Pomorski, L., Koodziejczyk, M., Bielecki, S. 2000b. The evaluation of usefulness of microbial cellulose as wound dressing material. *Proceedings of the 14th Forum for Applied Biotechnology*, hlm. 213-220.
- Lapas, M.M., Gallardo, E.G. & Palo, M.A. 1967. The nata organism - cultural requirements, characteristics and identity. *Philippine Journal of Science* 96(2): 91-111.
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. & Yashinaga, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(4): 575-579.
- Maneerung, T., Seiichi, T., Ratana, R. 2007. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 72: 43-51.
- Marx-Figini, M. & Pion, B.G. 1974. Kinetic Investigations on biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 338: 382-393.
- Masahisa, W., Tetsuo, K. & Takeshi, O. 2003. Thermally induced crystal transformation from cellulose I_α to I_β. *Polymer Journal* 35(2): 155-159.
- Masaoka, S., Ohe, T. & Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75: 18-22.
- Mathot, V.B.T. 1994. Thermal characterization of state of matter. Dlm. Mathot, V.B.F. (pnyt.). *Calorimetry and thermal analysis of polymers*. Munich: Hanser.
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. & Yoshinaga, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 575-579.
- Nakai, T., Tonouchi, N., Konishi, T., Kojima, Y., Tsuchida, T., Yoshinga, F., Sakai, F. & Hayashi, T. 1999. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sco. USA* 96: 14-18.
- Naritomi, T., Tohru, K., Hisato, Y. & Fumihiro, Y. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85(1): 89-95.
- Naritomi, T., Tohru, K., Hisato, Y., Fumihiro, Y., Tohru, S., Shigeru, M. & Kenji, K. 2002. Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated-batch culture. *Process Biochemistry* 38: 41-47.

- Nevell, T.P. 1985. Dlm. Nevell, T.P. & Zeronian, S.H. (pnyt.). *Cellulose chemistry and its applications*, hlm. 181. Chichester: Horwood Ltd.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M. & Mitsuhashi, S. 1990. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2: Improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electro acoustic transducers. *Journal of Material Science* 25(6): 2997–3001.
- Ohad, I.D., Danon, M.D. & Hestrin, S. 1962. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: ultrastructure of polymer. *The Journal of Cell Biology* 12: 31-46.
- Oikawa, T., Morino, T. & Ameyama, M. 1995a. Production of cellulose from D-arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 1564-1565.
- Oikawa, T., Ohtori, T. & Ameyama, M. 1995b. Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 331-332.
- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H. & Yamanka, S. 1992. Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocolloids* 6(5): 471-477.
- Okiyama, A., Motoki, M. & Yamanka, S. 1993. Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food Hydrocolloids* 6(6): 503-511.
- Palmer, K. J., Dye, W. B., and Black, D., 1956. X-ray diffractometer and microscopic investigation of crystallization of amorphous sucrose. *Journal Agric. Food Chemistry* 4: 77-81.
- Roberts, E.M., Saxena, I.M. & Brown, Jr.R.M. 1989. Biosynthesis of cellulose II. Dlm: Schuerch, C. (pnyt.). *Cellulose and Wood - Chemistry and Technology*, hlm. 689-704. New York: John Wiley and Sons.
- Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, H., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Meyer, R. Braun, S., De Vroom, E., Van Der Marel, G.A., Van Boom, J.H. & Benziman, M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325: 279-281.
- Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., Benziman, M., De Vroom, E., Fidder, A., De Paus, P. & Sliedregt, L.A. 1990. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *Biol. Chem.* 265(31): 18933-18943.
- Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58: 35-58.

- Sakairi, N., Asano, H., Ogawa, M., Nishi, N. & Tokura, S. 1998. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* 35: 233-237.
- Saturnino, D. 1967. The nata de coco I. Characterization and identity of the causal organism. *Phil Agric.* 51(6): 462-474.
- Saxena, I.M. & Brown, R.M.Jr. 2001a. Biosynthesis of cellulose. Dlm: Morohoshi, N. & Komamine, A. (pnyt.). *Molecular Breeding of Woody Plants*, hlm. 69-76. Texas: Elsevier Science.
- Saxena, I.M., Brown, R.M.Jr. & Dandekar, T. 2001b. Structure-function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. *Phytochemistry* 57: 1135-1148.
- Schenzel, K., Fischer, S. & Brendler, E. 2005. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose* 12: 223-231.
- Schramm, M. & Hestrin, S. 1954a. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: micromethod for the determination of celluloses. *Journal Bacteriol.* 56: 163-166.
- Schramm, M. & Hestrin, S. 1954b. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 11: 123-129.
- Schramm, M., Gromet, Z. & Hestrin, S. 1957a. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. III Substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 67: 669-679.
- Schramm, M., Gromet, Z. & Hestrin, S. 1957b. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. IV Enzyme systems present in a crude extract of glucose grown cells. *Biochem. J.* 67: 679-689.
- Schroers, M., Kokil, A. & Weder, C. 2004. Solid polymer electrolytes based on nanocomposites of ethylene oxide-epichlorohydrin copolymers and cellulose whiskers. *J. Appl. Polym. Sci.* 93(6): 2883-2888.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E. & Conrad, C.M. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29: 786-794.
- Serafica, G.C. 1997. Production of bacterial cellulose using a rotating disk film bioreactor by *Acetobacter xylinum*. PhD Thesis. Renselaer Polytechnic Institute.
- Serafica, G., Mormino, R. & Bungay, H. 2002. Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 756.

- Seto, A., Yu, S., Mayumi, M., Hiroki, K., Yasuyuki, S., Naoto, T., Takayasu, T., Fumihiro, Y., Kenji, U. & Teruhiko, B. 2006. Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 915-921.
- Setyawati, M.I., Chien, L.J. & Lee, C.K. 2007. Expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in statically cultured *Acetobacter xylinum* with reduced O₂ tension maximizes bacterial cellulose pellicle production. *Journal of Biotechnology* 132: 38-43.
- Shah, J. & Malcolm, B.R.Jr. 2004. Compositions, methods and systems for making and using electronic paper. *US patent* 60/507,961.
- Shibazaki, H. Kuga, S. Fumihiko, O. & Usuda, M. 1993. Bacterial cellulose as separation medium. *Journal of Applied Polymer Science* 50: 965-969.
- Shibazaki, H., Saito, M., Kuga, S., & Okano, T. 1998. Native cellulose II production by *Acetobacter xylinum* under physical constrain. *Cellulose* 5(3): 165-173.
- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S., Ogawa, M., Nishi, N. & Tokura, S. 1994. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. *Intl. J. Biol. Macromol* 16(6): 297-300.
- Shoda, M. & Sugano, Y. 2005. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10: 1-8.
- Shpigel, E., Roiz, L., Goren, R. & Shoseyov, O. 1998. Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells. *Plant Physiol* 117: 1185-1194.
- Skinner, P.O. & Cannon, R.E. 2000. *Acetobacter xylinum*: an inquiry into cellulose biosynthesis. *The American Biology Teacher* 62(6):1.
- Sorj, B. & Wilkinson, J. 1988. Brazilian policies in biotechnologies - A Post – Ethanol strategy. *BioTechnology* 6(2): 150.
- Sperling, L.H. 1992. *Introduction to physical polymer science*. Ed. ke-2. New York: Wiley.
- Steiner, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. & Painter, P.R. 1987. *General microbiology* Ed. ke-5. London: Macmillan Education Limited.
- Sugiyama, J., Okano, T., Yamamoto, H. & Horri, F. 1990. Transformation of Valonia cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment. *Macromolecules* 23: 3196-3198.
- Sugiyama, J., Vuong, R. & Chanzy, H. 1991. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. *Macromolecules* 24: 4168-4175.

- Suwannapinunt, N., Burakorn, J. & Thaenthanee, S. 2007. Effect of culture conditions on bacterial cellulose (BC) production from *Acetobacter xylinum* TISTR976 and physical properties of BC parchment paper. *Suranaree J. Sci. Technol.* 14(4): 357-365.
- Takai, M., Nonomura, F., Inukai, T., Fujiwara, M. & Hayashi, J. 1991. Filtration and permeation characteristics of bacterial cellulose composite. *Sen'i Gakkaishi* 47: 119-129.
- Takai, M. 1994. Bacterial Cellulose Composites. Dlm. Gilbert, R.D. (pnyt.). *Cellulosic Polymers*, hlm. 233-240. Cincinnati OH: Hanser Publishers Inc.
- Thompson, D.N & Hamilton, M.A. 2000. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Proceeding of the 22nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, hlm. 5-05.
- Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E. & Kawamura, Y. 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(3): 228-231.
- Togawa, E. & Kondo, T. 1999. Change of morphological properties in drawing water-swollen cellulose films prepared from organic solutions - A view of molecular orientation in the drawing process. *Journal of Polymer Science B, Polymer Physics* 37: 451-459.
- Tokoh, C., Takabe, K., Fujita, M. & Saiki, H. 1998. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. *Cellulose* 5: 249-261.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T. & Horinouchi, S. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1377.
- Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K.-I., Yamada, Y. & Yoshinaga, F. 1995. The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. *J Gen Appl Microbiol* 41: 307-314.
- Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M., Tanticharoen, M. & Verduyn, C. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* SK-02. *Bioresource Technology* 98: 281-287.
- UNEPS Publications. Sodium hydroxide CAS N°: 1310-73-2. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/NAHYDROX.pdf> [30 June 2009]
- Valla, S. & Kjosbakken, J. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*, *Journal of General Microbiology* 128: 1401.

- Vandamme, E.J, Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. & Wulf, de.P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* 59: 93-99.
- Volman, G., Ohana, P. & Benziman, M. 1995. Biochemistry and molecular biology of cellulose biosynthesis. *Carbohydrates in Europe*, 12: 20-27.
- Wada, M., Sugiyama, J. & Okano, T. 1993. Native celluloses on the basis of two crystalline phase (I_α/I_β) system. *J Appl Polym Sci* 49:1491-1496.
- Wada, M., Sugiyama, J. & Okano, T. 1994. The monoclinic phase is dominant in wood cellulose. *Mokuzai Gakkaishi* 40:50-56.
- Wada, M., Sugiyama, J. & Okano, T. 1995 Two crystalline phase (I_α/I_β) system of native celluloses in relation to plant phylogenesis. *Mokuzai Gakkaishi* 41:186-192.
- Wada, M., Okano, T. & Sugiyama, J. 1997. Synchrotron-radiated X-ray and neutron cellulose I by CP/MAS ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr Res.* 312: 123-129.
- Wada, M., Okano, T. & Sugiyama, J. 2001. Allomorphs of native crystalline cellulose I evaluated by two equatorial d-spacings. *J Wood Sci* 47: 124-128.
- Watanabe, K., Eto, Y., Takano, S., Nakamori, S., Shibata, H. & Yamanaka, S. 1993. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. *Cytotechnol.* 13: 107-114.
- Watanabe, K., & Yamanaka, S. 1995. Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(1): 65-68.
- Webb, T.E. & Colvin, J.R. 1967. The extracellular proteins of *Acetobacter xylinum* and their relationship to protein synthesis. *Can. J. Biochem.* 111: 325.
- Weyershaeuser Company. 1999. Reticulated cellulose product, sheets formed therefrom, methods and microorganisms for the production thereof. *European Paten* 86308092.5.
- White, D.G. & Brown, R.M.Jr. 1989. Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose. Dlm. Schuerech, C. (pnyt.), *Cellulose and Wood-Chemistry and Technology*, hlm. 573. New York: John Wiley & Sons.
- Wickholm, K, Larsson, P.T. & Iversen, T. 1998. Assignment of noncrystalline forms in diffraction study of native cellulose. *Cellulose* 4: 221-232.
- Williams, W.S. & Cannon, R.E. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(10): 2448-2452.

- Yamanaka, S., Watanabe, K. & Kitamura, N. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Material Science* 24: 3141-3145.
- Yamanaka, S. & Watanabe, K. 1994. Applications of bacterial cellulose. Dlm: Gilbert, R. (pnyt.). *Cellulosic Polymers Chapter 11*. Cincinnati OH: Hanser Publishers Inc.
- Yamanaka, S., Ishihara, M. & Sugiyama, J. 2000. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* 5(3): 213-225.
- Yang, Y.K., Park, S.H., Hwang, J.W., Pyun, Y.R. & Kim, Y.S. 1998. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRCS under agitated condition. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 312-317.
- Yoshino, T., Asakura, T. & Toda, K. 1996. Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81(1): 32-36.
- Zaar, K. 1979. Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*. *J. Cell Biology* 80: 773-777.

LAMPIRAN A

VIABILITI STRAIN *ACETOBACTER XYLINUM* 0416 TERHADAP MASA PENYIMPANAN

Viabiliti strain terhadap masa penyimpanan dikaji menggunakan teknik pertumbuhan strain di atas piring petri. Masa penyimpanan adalah selama empat minggu bersesuaian dengan masa penyelenggaraan medium oleh MARDI. Medium penyelenggaraan seperti Jadual 3.1 disediakan dan disimpan di dalam peti sejuk setelah tiga hari inkubasi. Tiga piring petri diperlukan untuk setiap minggu. Untuk minggu pertama kajian, setiap piring petri diletakkan 0.5 mL inokulum dari medium penyelenggaraan dan dieramkan selama tiga hari. Koloni yang terbentuk akan dipantau setiap hari. Prosedur ini diulangi setiap minggu sehingga minggu ke empat menggunakan inokulum daripada medium penyelenggaraan yang sama.

Viabiliti strain terhadap masa penyimpanan 4 minggu ditunjukkan dalam Jadual 1. Bilangan koloni meningkat mengikut hari pengamatan sehingga 'TMTC' pada hari yang ke-3. Daripada data ini disimpulkan bahawa masa penyimpanan 4 minggu iaitu sebulan adalah bersesuaian untuk strain *A. xylinum* (0416) dan dipraktikkan oleh MARDI dalam menjamin viabiliti strain untuk kegunaan kajian ini. Maklumat ini amat penting dalam menentukan ciri bakteria *A. xylinum* serta tahap viabilitinya untuk digunakan dalam kajian ini.

Jadual 1 Bilangan koloni *A. xylinum* atas piring petri

	HARI 1			HARI 2			HARI 3		
Minggu 1	0	0	1	1	1	4	TMTC	TMTC	TMTC
Minggu 2	0	0	0	1	2	2	14	18	TMTC
Minggu 3	0	0	0	1	2	4	3	TMTC	15
Minggu 4	0	0	0	0	1	2	TMTC	8	TMTC

TMTC = terlalu banyak untuk dikira

LAMPIRAN B

MENENTUKAN KINETIK PERTUMBUHAN *ACETOBACTER* *XYLINUM* 0416

Bahan: air kelapa, gula, ammonium nitrat, inokulum, asid asetik dan air suling

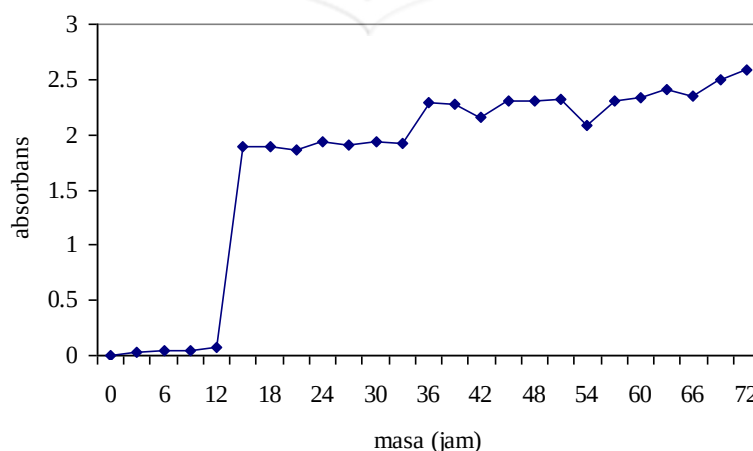
Kaedah:

1. Medium penyelenggaraan disediakan seperti komposisi di bawah:

Bahan	Berat
Air kelapa	200 mL
Gula	16 g
Ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
Asid asetik	Penukar pH

Air kelapa, gula dan ammonium sulfat dicampurkan menggunakan penggoncang plat pemanas. Asid asetik digunakan untuk menentukan nilai pH kepada 4.5. Medium dibahagikan kepada dua bahagian yang berisipadu 100 mL tiap satu. Medium kemudiannya diautoklaf pada 15 psia selama 15 minit.

2. Selepas medium disejukkan kepada suhu bilik, 2 mL inokulum dimasukkan ke dalam medium. Masa penahanan direkodkan sebagai t_0 .
3. Selepas 3 jam inkubasi pada 30 °C, 1 mL brot kultur diambil untuk bacaan absorbans menggunakan UV-spectrophotometer pada panjang gelombang 250 nm.
4. Bacaan absorbans diambil setiap 3 jam selama 72 jam. Satu graf absorbans terhadap masa penahanan diplotkan.



Rajah 1 Keluk pertumbuhan bakteria pada panjang gelombang 250 nm

LAMPIRAN C

KESAN SELULOSA BAKTERIA MENTAH TERHADAP FERMENTASI

Objektif:

Mengkaji kesan selulosa bakteria (SB) mentah ke atas fermentasi strain *Acetobacter xylinum* 0416

Kaedah:

1. Dua kelalang kon bersaiz 100 mL untuk setiap medium disediakan untuk tiga medium berbeza seperti ditunjukkan dalam Jadual 1.
2. Fermentasi dijalankan selama 10 hari secara kuLtur permukaan statik dengan isipadu medium 50 mL.
3. SB dihancurkan menggunakan 'lab mill' sehingga menjadi serbuk seperti dalam Rajah 1.
4. Selepas itu SB hancur tersebut ditimbang sebanyak 0.125 g dan dimasukkan ke dalam medium. Proses antoklaf dan inokulasi 10% inokulum dijalankan.
5. Pemerhatian dilakukan setiap hari manakala purata pH medium dan berat kering SB dikira untuk hari ke-10.

Jadual 1 Komposisi tiga medium

1. CWHSM – medium kawalan		2. SB + air suling		3. SB + nutrien + air suling	
Kuantiti		Kuantiti		Kuantiti	
Sodium hidrogen fosfat, Na ₂ HPO ₄	0.270 g/L	SB	0.125 g + 0.125 g	SB	0.125 g + 0.125 g
Bakto pepton	0.5 g/L	Air suling	100 mL	Sodium hidrogen fosfat, Na ₂ HPO ₄	0.270 g/L
Ekstrak yis	0.5 g/L			Bakto pepton	0.5 g/L
Asid sitrik	0.115 g/L	pH	6.0	Ekstrak yis	0.5 g/L
Air kelapa bertapis	100 mL	Inokulum	5 mL + 5 mL	Asid sitrik	0.115 g/L
pH	6.0			Air suling	100 mL
inokulum	5 mL + 5 mL			pH	6.0
				inokulum	5 mL + 5 mL

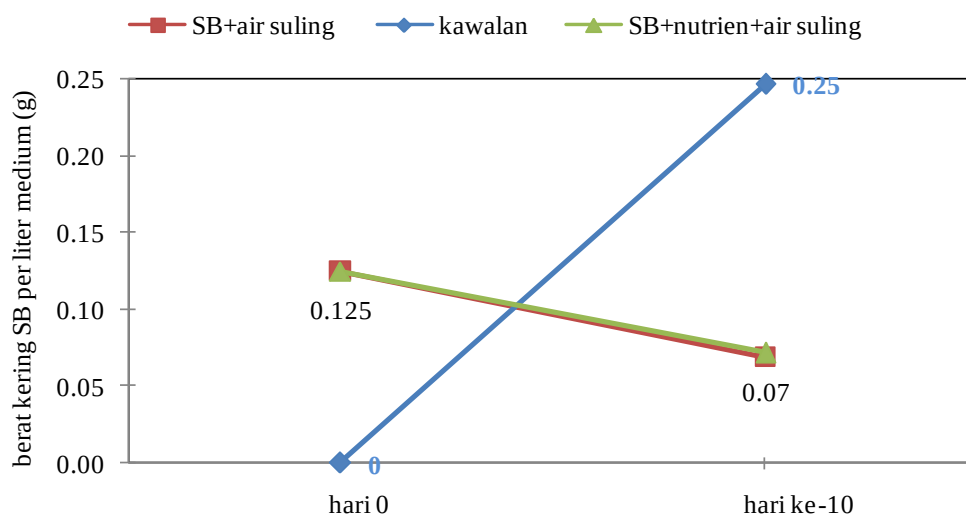


Rajah 1 Selulosa bakteria hancur

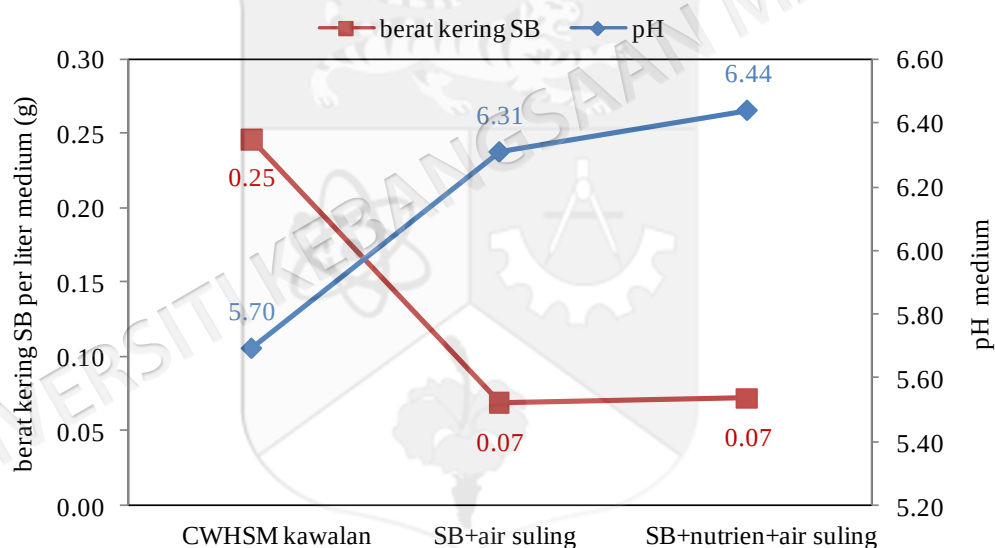
Keputusan dan Perbincangan

Rajah 2 menunjukkan purata berat kering SB dalam medium CWHSM (medium kawalan), medium SB+air suling dan medium SB+nutrien+air suling pada hari ke-10. Medium kawalan memberikan nilai berat kering 0.25 g per liter medium, menunjukkan bahawa SB dapat dihasilkan pada keadaan fermentasi yang optimum. Berat kering SB pada hari ke-10 bagi medium SB+air suling dan SB+nutrien+air suling memberikan nilai yang sama iaitu 0.07 g per liter medium, nilai yang kurang daripada berat SB hancur pada awal fermentasi. Keputusan ini menunjukkan bahawa SB hancur telah digunakan sebagai sumber karbon oleh strain *Acetobacter xylinum* 0416, sekiranya sumber karbon tidak dibekalkan kepada medium atau telah habis digunakan semasa fermentasi. Kandungan nutrien dalam medium tidak mempengaruhi kuantiti SB hancur yang digunakan sepanjang fermentasi.

Kesan pH medium ke atas fermentasi pada hari ke-10 ditunjukkan dalam Rajah 3. Nilai pH medium bagi kawalan adalah dalam julat lebih berasid, 5.7 berbanding dua medium yang lain di mana memberikan nilai pH lebih tinggi menghampiri neutral dengan purata 6.375. Keputusan ini mencadangkan bahawa kurang asid organik dihasilkan oleh sel sekiranya SB menjadi sumber karbon. Keadaan ini juga berkemungkinan kerana kurangnya sel yang masih hidup menyebabkan kurangnya respirasi oleh sel dalam medium tersebut.



Rajah 2 Purata berat kering SB bagi ketiga-tiga medium pada hari ke-10



Rajah 3 Perkaitan antara pH medium dan berat kering SB bagi ketiga-tiga medium pada hari ke-10

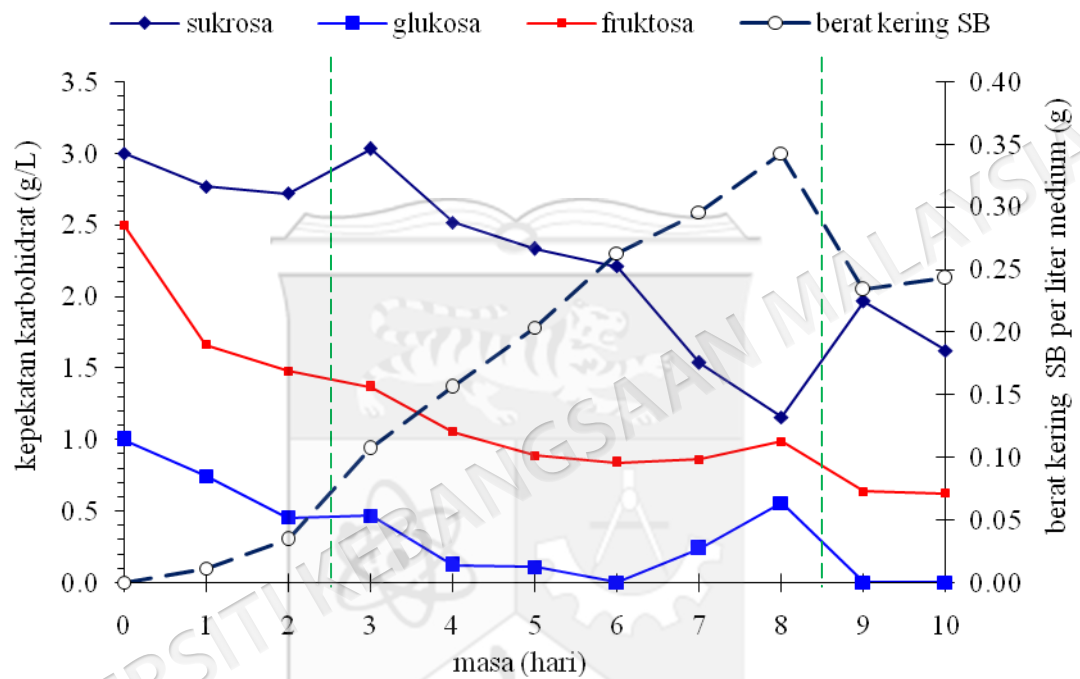
Kesimpulan

Kesimpulan daripada eksperimen ini ialah telah dibuktikan bahawa strain *Acetobacter xylinum* 0416 akan menggunakan SB sebagai sumber karbon sekiranya tiada sumber karbon dalam sesuatu medium fermentasi. Keadaan ini akan mengurangkan berat kering SB yang terhasil.

LAMPIRAN D

**KADAR PERTUMBUHAN SPESIFIK MAKSIMUM (μ_{mak}) DAN MASA
PENGGANDAAN (t_d) BAGI STRAIN *ACETOBACTER XYLINUM* 0416
DALAM CWHSM**

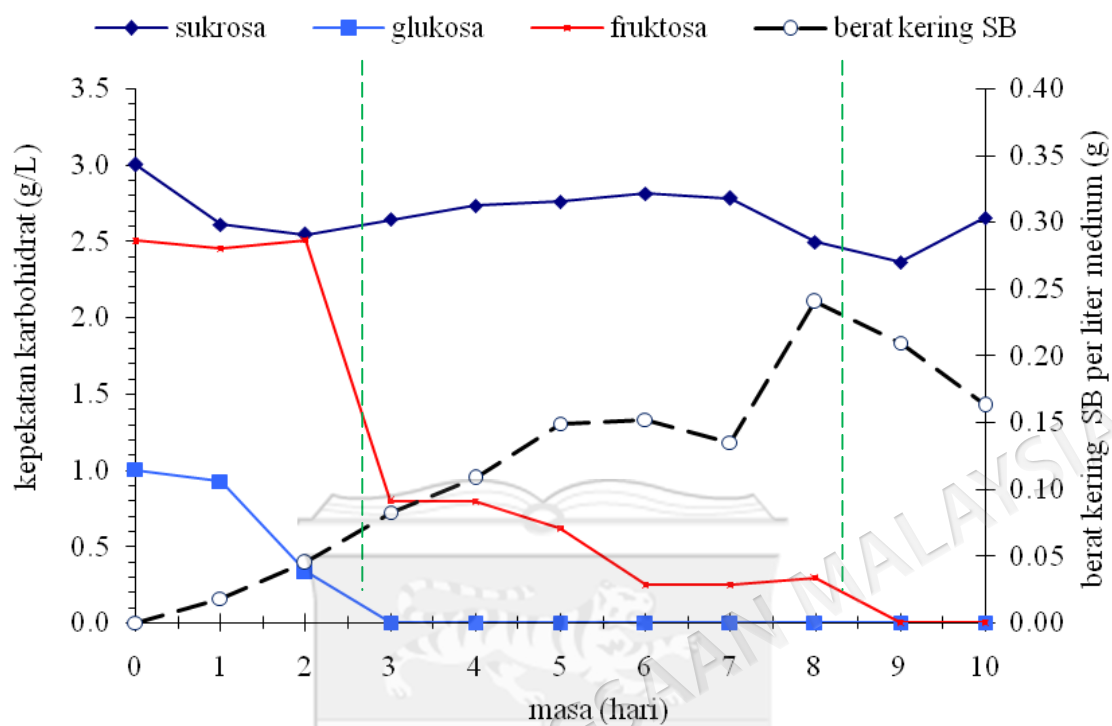
Berdasarkan Rajah 5.6 bagi CWHSM statik,



$$\begin{aligned}
 \mu_{\text{mak}} &= \frac{\ln N_t / N_0}{t} \\
 &= \frac{\ln 0.343 / 0.035}{6} \\
 &= 0.380 \text{ hari}^{-1}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 t_d &= \ln 2 / \mu_{\text{mak}} \\
 &= 0.693 / 0.380 \\
 &= 1.82 \text{ hari}
 \end{aligned}$$

Berdasarkan Rajah 5.7 bagi CWHSM gancang,



$$\mu_{\text{mak}} = \frac{\ln N_t / N_0}{t}$$

$$= \frac{\ln 0.24/0.045}{6}$$

$$= 0.279 \text{ hari}^{-1}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{mak}}}$$

$$= 0.693/0.279$$

$$= 2.48 \text{ hari}$$