

## Optimasi Produksi *Bacterial Nanocellulose* dengan Metode Kultur Agitasi

<sup>1</sup>Prima Besty Asthary\*, <sup>1</sup>Saepulloh, <sup>1</sup>Ayu Sanningtyas, <sup>1</sup>Gian Aditya Pertiwi,  
<sup>1</sup>Chandra Apriana Purwita, <sup>2</sup>Krisna Septiningrum

<sup>1</sup>Balai Besar Pulp dan Kertas, Jl. Raya Dayeuhkolot No 132 Bandung, Indonesia

<sup>2</sup>Balai Besar Industri Agro, Jl. Ir. H. Juanda No.11, Kota Bogor, Indonesia

Diterima : 7 Juli 2020, Revisi akhir : 24 Desember 2020, Disetujui terbit : 30 Desember 2020

### *Optimization of Bacterial Nanocellulose Production in Agitation Culture Methods*

#### *Abstract*

Almost 90% of pharmaceutical industry in Indonesia still uses imported raw material. However, Indonesia has one of the abundant raw materials which is cellulose. Bacterial nanocellulose (BNC) is a pure form of nanocellulose biopolymer material synthesized by microbes such as acetic acid bacteria of *Gluconacetobacter* spp. as pure cellulose and having diameter in nano scale. BNC used in pharmaceutical industry is in the slurry form/high viscose nanocellulose. The purpose of this study is to determine the bacteria and the optimum conditions to produce BNC. The bacteria used were *Gluconacetobacter xylinus* and *Gluconacetobacter intermedius* from InaCC-LIPI and *Gluconacetobacter* sp. from nata industry. The inoculums were cultivated for 7 days in liquid Hestrin & Schramm (HS) medium using static and agitation culture with a stirring speed of 150 rpm at pH 5 and temperature 25 °C. The production of BNC has been conducted by using *Gluconacetobacter* sp., because it has the highest yield. Then it was inoculated at different variation of agitation speed (100, 150, and 200 rpm), pH (4.0; 4.5; 5.0; and 6.0), and temperature (25-30 °C). This research shows that *Gluconacetobacter* sp. has optimum conditions at the agitation speed of 150 rpm, pH 5.5, and temperature 27 °C.

*Keywords: Bacterial nanocellulose, Gluconacetobacter, agitation*

#### **Abstrak**

Hampir sebanyak 90% industri farmasi di Indonesia masih menggunakan bahan baku impor. Indonesia memiliki salah satu bahan baku yang cukup melimpah yaitu selulosa. *Bacterial nanocellulose* (BNC) adalah hasil sintesis dari bakteri *aerobic* seperti bakteri asam asetat *Gluconacetobacter* spp. yang berbentuk selulosa murni dengan diameter berukuran nano. Bahan baku BNC yang digunakan dalam industri farmasi adalah BNC dalam bentuk *slurry* atau *high viscose nanocellulose*. Tujuan penelitian ini adalah untuk memilih bakteri dan kondisi optimum dalam memproduksi BNC. Bakteri yang digunakan adalah *Gluconacetobacter xylinus* dan *Gluconacetobacter intermedius* yang berasal dari InaCC-LIPI dan *Gluconacetobacter* sp. dari industri *nata de coco*. Inokulum dari ketiga jenis kultur bakteri tersebut dikultivasi selama 7 hari dalam medium Hestrin&Schramm (HS) cair menggunakan kultur statis dan agitasi dengan kecepatan pengadukan 150 rpm pada pH 5 dan suhu 25 °C. Isolat bakteri *Gluconacetobacter* sp. dipilih sebagai bakteri penghasil BNC karena memiliki nilai *yield* paling tinggi. Kemudian isolat tersebut ditumbuhkan pada variasi kecepatan agitasi (100, 150, dan 200 rpm), variasi pH (4,0; 4,5; 5,0; dan 6,0), dan variasi suhu (25-30 °C). Penelitian ini menunjukkan bahwa *Gluconacetobacter* sp. memiliki kondisi optimum pada kecepatan agitasi 150 rpm, pH 5,5, dan suhu 27 °C.

Kata kunci: *Bacterial nanocellulose, Gluconacetobacter, agitasi*

## **Pendahuluan**

Peningkatan pendapatan per kapita dan penggunaan obat pada masyarakat semakin menunjang pertumbuhan farmasi di Indonesia. Obat adalah komponen yang penting dalam memenuhi kesehatan masyarakat pada suatu negara. Semakin meningkatnya penggunaan obat tersebut menjadi salah satu faktor pertumbuhan pada industri farmasi. Pasar farmasi Indonesia saat ini mencapai  $\pm 27\%$  dari total pasar ASEAN, dengan nilai pasar mencapai Rp 69,07 triliun pada tahun 2016 dan Rp 102,05 triliun pada tahun 2020. Namun, sampai saat ini Indonesia masih memenuhi kebutuhan 90% bahan baku farmasi dalam negeri dengan melakukan impor dari negara Tiongkok (60%), India (30%), dan Eropa (10%) (Simanjuntak, 2016).

Untuk mengurangi ketergantungan impor bahan obat tersebut perlu pengembangan lebih lanjut baik dalam bidang teknologi maupun bahan baku yang dapat digunakan. Indonesia mempunyai sumber daya berupa sumber daya manusia (SDM) dan keanekaragaman hayati yang dapat digunakan sebagai bahan baku serta potensi ekonomi yang besar. Salah satu sumber terbesar tersebut adalah biomassa berbasis selulosa, sehingga Indonesia perlu mengembangkan industri farmasi berbasis selulosa (*Cellulose Based Pharmacy*). Selulosa ini dapat digunakan sebagai sediaan produk biologik untuk industri farmasi. Salah satu contoh aplikasi tersebut adalah sebagai pembentuk hidrogel yang memiliki potensi untuk penutup luka (Gupta *et al.*, 2020).

Sumber selulosa adalah tanaman dan bakteri (*Bacterial cellulose*, BC) (Jozala *et al.*, 2014). BC adalah polisakarida ekstraselular (biomaterial berukuran nano) yang diproduksi oleh bakteri asam asetat dari genus seperti *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, dan *Gluconacetobacter* (Gullo *et al.*, 2017). *Gluconacetobacter* adalah bakteri Gram negatif, yang bersifat aerobik, berbentuk batang (M. Iguchi *et al.*, 2000), non toksik dan merupakan bakteri yang paling efisien untuk menghasilkan selulosa (Shoda & Sugano, 2005). Bakteri ini memproduksi pelikel BC yang memiliki struktur nanofibril dengan permukaan yang lebih padat di satu sisi, dan lapisan mirip gelatin di sisi lainnya (A.N. Nakagaito *et al.*, 2005).

*Bacterial nanocellulose* (BNC) hasil sintesis dari bakteri aerobik seperti bakteri asam asetat

yaitu *Gluconacetobacter* spp. yang berbentuk selulosa murni dengan diameter berukuran nano. BNC memiliki karakteristik yang unik jika dibandingkan dengan selulosa tanaman yaitu selulosa dari bakteri merupakan selulosa murni (Gatenholm & Klemm, 2010) memiliki derajat polimerisasi yang tinggi yaitu mencapai 2000 sampai 6000 (Klemm *et al.*, 2001), memiliki kapasitas menahan air yang tinggi dibandingkan dengan selulosa tanaman, karena memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat dan lebih banyak jika dibandingkan dengan selulosa tanaman (Watanabe *et al.*, 1998), mempunyai kekuatan tarik yang baik (M. Iguchi *et al.*, 2000; Nakagaito *et al.*, 2005), memiliki bentuk kristal Ia dan Ib, tidak seperti selulosa tanaman yang terutama menyajikan struktur Ib (Atalla & Vanderhart, 1984), non toksik, mudah dibiodegradasi dan tidak menyebabkan alergi (Jozala *et al.*, 2016), memiliki diameter serat 20 – 200 nm dengan luas permukaan yang besar (Fu *et al.*, 2013; Numata *et al.*, 2015) sehingga mampu menyerap air dalam jumlah besar, dan memiliki *adherence* yang baik (Fu *et al.*, 2013; Numata *et al.*, 2015).

Berdasarkan karakteristik tersebut BNC dapat digunakan pada berbagai macam jenis industri seperti industri tekstil, industri kertas, industri farmasi, dll. Industri farmasi menggunakan bahan baku BNC dalam bentuk *slurry*. Penelitian dalam memproduksi BNC bentuk *slurry* dengan produktivitas yang baik diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap kemajuan penelitian BNC di masa depan terutama aplikasi BNC di bidang nanoteknologi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memilih bakteri penghasil BNC dan memperoleh kondisi optimum produksi BNC skala laboratorium.

## **Bahan dan Metode**

### **Bahan**

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah tiga jenis kultur bakteri yaitu dua kultur bakteri murni dari InaCC-LIPI *Gluconacetobacter xylinus* dan *Gluconacetobacter intermedius* dan satu kultur bakteri berasal dari industri *nata de coco* di Jawa Barat; medium Hestrin&Schramm (HS) yang terdiri dari glukosa, pepton, ekstrak ragi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , dan  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; agar; akuades; etanol teknis; NaCl; spiritus; dan bahan kimia untuk melakukan uji *Total Plate Count* (TPC), uji

karbon organik, dan uji total nitrogen. Peralatan penelitian yang digunakan adalah cawan petri, labu Erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, tips, blender, autoklaf, *shaker incubator*, *incubator*, *microcentrifuge*, *waterbath*, penangas air, pH meter, spektrofotometer VIS, *magnetic stirrer*, neraca analitis dan semi analitis, *vortex mixer*, *refrigerated centrifuge*, dan *laminar air flow*.

### Skrining Bakteri Penghasil BNC

Penentuan bakteri penghasil BNC dilakukan dengan memurnikan terlebih dahulu kultur yang berasal dari industri *nata de coco* (JUM), kemudian diidentifikasi secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada 16 S rDNA. Inokulum dari ketiga jenis kultur bakteri dikultivasi selama 7 hari dalam medium HS cair menggunakan kultur statis dan agitasi dengan kecepatan pengadukan 150 rpm pada pH 5 dan suhu ruang (25 °C) untuk menghasilkan BNC. BNC yang diperoleh dihitung berat basah dan berat kering yang dinyatakan dengan satuan g/L.

Setelah diketahui nilai *yield* dari ketiga jenis bakteri tersebut dipilih bakteri yang menghasilkan nilai *yield* tertinggi, lalu BNC yang diperoleh dari inokulum bakteri terpilih tersebut dilakukan analisis karakterisasi BNC. Analisis karakteristik BNC dilakukan dengan melakukan pengujian menggunakan *Scanning Electrom Microscopy* (SEM) JEO KSM 6510 untuk mengetahui formasi permukaan BNC, *X-ray diffraction* (XRD) Rigaku SmartLab untuk mengetahui pengaruh pengadukan terhadap struktur kristal selulosa, *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) 4200TypeA untuk mengetahui gugus fungsional BC (*Bacterial Cellulose*), dan *particle size analyzer* HORIBALB-550 untuk mengetahui ukuran partikel.

### Penentuan Kondisi Optimum dan Kecepatan Agitasi Produk BNC

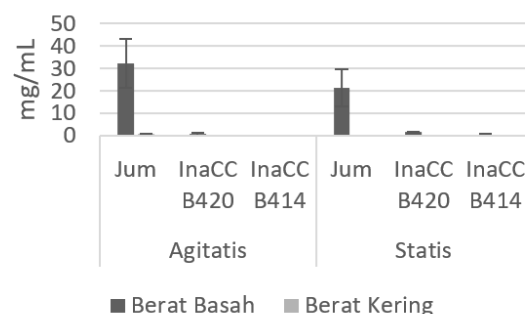
Inokulum mikroba sejumlah 1-4 % (v/v) dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/mL diinokulasikan ke dalam medium HS Kultur kemudian diinkubasi selama 7 hari pada variasi kecepatan agitasi (100, 150, dan 200 rpm), variasi pH (4,0; 4,5; 5,0; dan 6,0), dan variasi suhu (25-30 °C). Kultur disampling setelah 7 hari. Parameter uji pada proses fermentasi adalah rendemen BNC yang diperoleh dan pH.

## Hasil dan Pembahasan

### Penentuan Isolat Bakteri Penghasil BNC

Hasil identifikasi kultur JUM yang dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada 16 S rDNA menunjukkan isolat bakteri berasal dari genus *Acetobacter* sp. PA2.2 (*Gluconacetobacter* sp.) dengan nomor *accession* AF062474.2. Selulosa dapat dihasilkan oleh bakteri, terutama dari genus *Gluconacetobacter*. Berbagai spesies dari genus *Gluconacetobacter* mampu menghasilkan *bacterial cellulose*, salah satunya adalah *Gluconacetobacter xylinus* (dulu dikenal dengan *Acetobacter xylinus*) yang merupakan spesies yang paling banyak digunakan secara komersial (Kost *et al.*, 1998; Tanskul *et al.*, 2013).

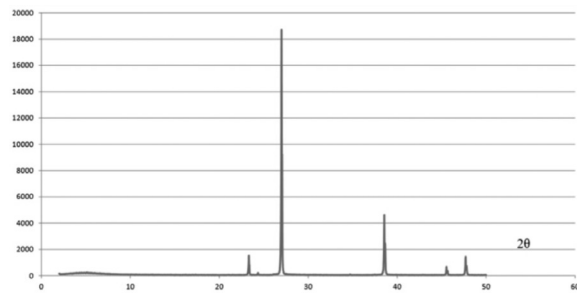
Berat kering dan berat basah selulosa yang dihasilkan oleh ketiga jenis isolat bakteri *Gluconacetobacter* dengan metode kultur agitasi dan statis disajikan pada **Gambar 1**. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan selulosa dengan kedua metode kultur tersebut adalah kultur yang diperoleh dari industri *nata de coco* (JUM) dan *Gluconacetobacter xylinus* (B420) yang diperoleh dari InaCC-LIPI. Sementara itu, isolat JUM mampu menghasilkan selulosa dengan berat basah dan berat kering paling tinggi di antara seluruh isolat bakteri, yaitu sebesar 32,143 mg/mL dan 0,6 mg/mL untuk metode agitasi dan 21,314 mg/mL dan 0,013 mg/mL untuk metode statis. Metode agitasi mampu menghasilkan selulosa dengan berat basah dan berat kering lebih tinggi dibandingkan metode statis. Tujuan dilakukannya agitasi adalah menjaga pasokan



**Gambar 1.** Berat Basah dan Berat Kering Selulosa dari Proses Fermentasi oleh Isolat JUM, InaCC B414 dan InaCC B420 dengan Metode Kultur Agitasi dan Statis

dan distribusi oksigen dapat tetap homogen dibanding dengan kondisi statis yang dilakukan tanpa putaran. Menurut Hwang *et al.*, (1999) laju produksi dan *yield* pada selulosa sebanding dengan laju transfer oksigen dan koefisien transfer oksigen. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi oksigen terlarut yang ada di dalam sel pada matrik selulosa merupakan faktor penting dalam penentuan kenaikan *yield* (Joseph *et al.*, 2003).

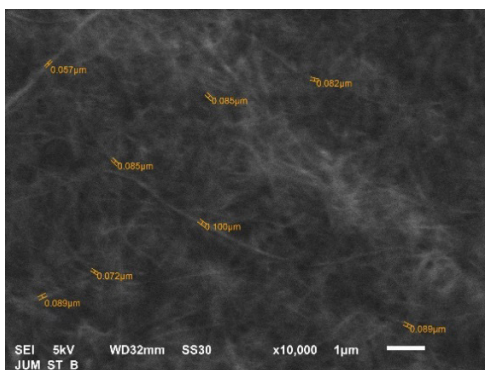
Selulosa yang dihasilkan oleh isolat JUM baik metode agitasi maupun metode statis memiliki morfologi serat seperti yang ditampilkan pada **Gambar 2**. Serat selulosa yang dihasilkan pada kedua metode memiliki rentang diameter hingga 200 nm. Namun, serat selulosa metode agitasi memiliki diameter cenderung lebih besar 56% dibandingkan dengan metode statis. Menurut (Fu *et al.*, 2013) *bacterial cellulose* mengandung serat berukuran nano dengan kisaran 20-100 nm. Hasil analisis *crystallinity* BNC ditampilkan pada **Gambar 3** menunjukkan bahwa BNC yang dihasilkan oleh isolat JUM dengan kultur agitasi



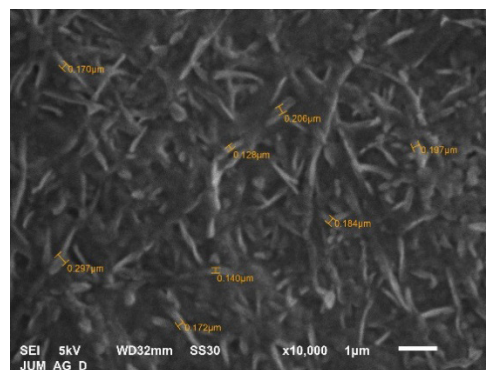
**Gambar 3.** Hasil Analisa *Crystallinity* BNC dari Isolat Terpilih (JUM) dengan Kultur Agitasi

adalah kristalin dengan puncak pada sudut difraksi  $2\theta$ : 23,33; 27,18; 38,56; 45,54; dan 47,69°.

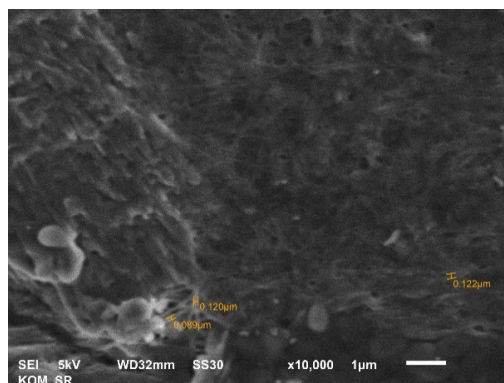
Karakterisasi struktur molekuler (gugus fungsi) pada sampel *bacterial nanocellulose* hasil penelitian dilakukan dengan analisis secara spektrofotometri menggunakan FTIR pada rentang bilangan gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dengan resolusi 16  $\text{cm}^{-1}$ . Berdasarkan spektrum FTIR dari sampel *bacterial cellulose* seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 4** terdapat pita



(a)

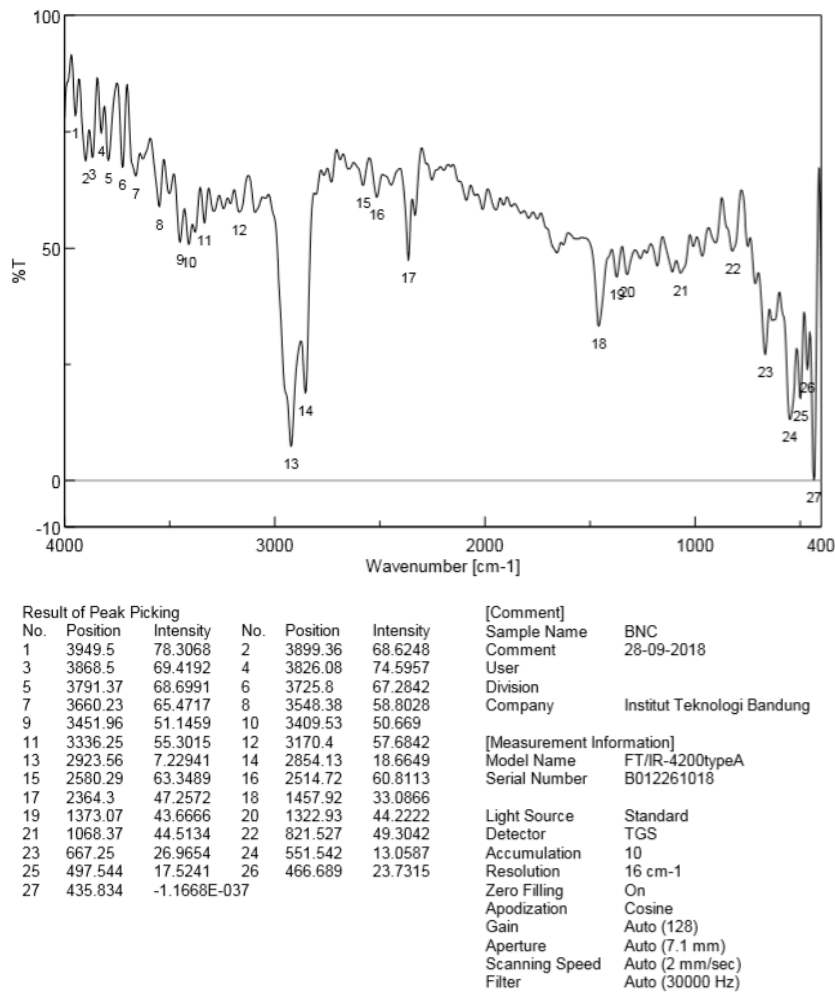


(b)



(c)

**Gambar 2.** Morfologi *Bacterial Nanocellulose* yang dihasilkan oleh Isolat Terpilih (JUM) dari Kultur Statis (a), dan Kultur Agitasi (b), dan *Bacterial Nanocellulose* Komersial Sebagai Pembanding (c)



**Gambar 4.** Hasil Analisis Gugus Fungsional BNC dengan Menggunakan FTIR

*transmittant* pada beberapa bilangan gelombang yang menjadi ciri khas dari *bacterial cellulose*, yaitu pita *transmittant* pada bilangan gelombang 3726, 3452, 3410, 2923, 2854, 2364, 1458, 1373, 1323, dan 1066  $\text{cm}^{-1}$ . *Transmittant* pada bilangan gelombang 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  pada spektrum FTIR *bacterial cellulose* merupakan serapan karena renggangan dari gugus hidroksil (-OH) yang terlibat dalam ikatan hidrogen baik antar gugus-gugus hidroksi yang ada dalam satu molekul *bacterial cellulose* (intramolekuler) maupun antara gugus hidroksil dari satu molekul *bacterial cellulose* dengan gugus hidroksil pada molekul *bacterial cellulose* lainnya atau dengan molekul lainnya yang dapat membentuk ikatan hidrogen seperti molekul air (inter molekuler) (Dima *et al.*, 2017; Mohammadkazemi, 2015; Yue *et al.*, 2015). Pada umumnya, spektrum FTIR pada bilangan gelombang 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  dari selulosa atau *bacterial cellulose* yang masih basah berupa lembah yang lebar dengan intensitas

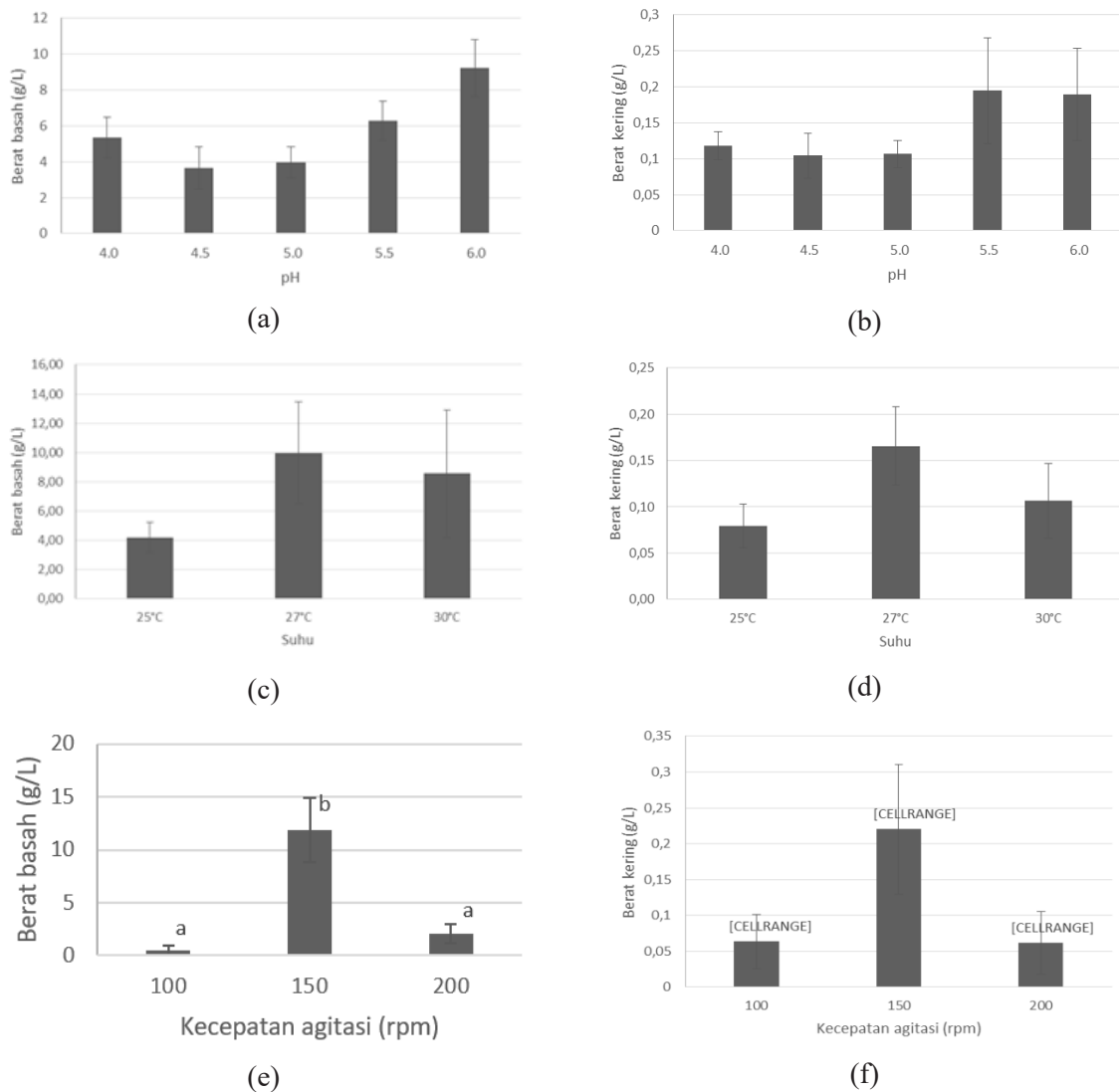
yang rendah (serapan dengan intensitas tinggi) yang menunjukkannya banyaknya ikatan hidrogen baik inter maupun intra molekuler (Gayathry & Gopalswamy, 2014). Hal itu berbeda dengan spektrum FTIR sampel *bacterial cellulose* dimana pada bilangan gelombang 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  pita *transmittant* berupa lembah yang tidak melebar dengan intensitas *transmittant* yang tinggi (serapan dengan intensitas rendah). Hal ini diperkirakan karena sampel *bacterial cellulose* sudah dikeringkan sehingga ikatan hidrogen yang terbentuk terutama ikatan hidrogen intermolekuler antara gugus hidroksil *bacterial cellulose* dengan molekul air menjadi berkurang. Hal itu juga didukung dengan tingginya nilai persen *transmittant* (rendahnya nilai serapan) pada bilangan gelombang 3726  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan sedikitnya serapan oleh gugus hidroksil bebas (-OH) dari molekul air (Pavaloiu *et al.*, 2014). Pita *transmittant* pada bilangan gelombang 2923 dan 2854  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan regangan  $-\text{CH}_2$

(Dima *et al.*, 2017; Gayathry & Gopalswamy, 2014; Mohammadkazemi, 2015). Pada spektrum FTIR sampel *bacterial cellulose*, pita *transmittant* pada bilangan gelombang 2923 dan 2854  $\text{cm}^{-1}$  berupa lembah tajam dengan *transmittant* rendah yang menunjukkan tinggi serapan pada bilangan gelombang tersebut karena banyaknya gugus  $-\text{CH}_2$ . Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Dima *et al.*, (2017) hal tersebut diperkirakan karena terjadinya pembentukan ujung rantai baru akibat pemendekan fibril-fibril selulosa. Pita *transmittant* pada bilangan gelombang 1458  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya serapan karena tekukan C-H atau gugus karbonil (Gayathry & Gopalswamy, 2014; Mohammadkazemi, 2015). Pita *transmittant*

pada 1373  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan karena deformasi gugus  $-\text{CH}$ , sedangkan pita *transmittant* pada 1323  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan karena deformasi gugus  $-\text{OH}$  (Dima *et al.*, 2017; Pandey, 1999). Pita *transmittant* pada bilangan gelombang 1066  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan karena adanya renggangan gugus C-O-C pada rantai utama *bacterial cellulose* (Dima *et al.*, 2017; Gayathry & Gopalswamy, 2014; Mohammadkazemi, 2015).

### Penentuan Kondisi Optimum Produksi BNC

Pada percobaan optimasi pH, nilai rata-rata berat basah dan berat kering BNC dapat dilihat pada **Gambar 5a** dan **Gambar 5b**. *Yield* BNC



**Gambar 5.** Nilai Rata-Rata Berat Basah (a) dan Berat kering (b) Produk BNC pada Variasi pH 4,0-6,0, Nilai Rata-Rata Berat Basah (c) dan Berat Kering (d) Produk BNC pada Variasi Suhu 25-30 °C, dan Nilai Rata-rata Berat Basah (e) dan Berat Kering (f) Produk BNC pada Variasi Kecepatan Agitasi

**Tabel 1.** Hasil Analisis Statistik Berat Basah dan Berat Kering Produk BNC pada Variasi pH 4,0-6,0

pH	Berat Basah (g/L)	Berat Kering (g/L)
4,0	5,33820 bc	0,11780 a
4,5	3,65060 a	0,10420 a
5,0	3,98240 ab	0,10680 a
5,5	6,29260 c	0,19460 b
6,0	9,23920 d	0,18920 b

Keterangan: Angka dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada taraf 5%

terendah dihasilkan pada pH 4,5, kemudian mengalami peningkatan hingga pH 5,5, kemudian mengalami penurunan pada pH 6,0. Berdasarkan hasil analisis statistik (**Tabel 1**), hasil BNC berbeda nyata pada pH 5,5 dan 6,0. Berat basah BNC paling tinggi (9,24 g/L) dihasilkan pada pH 6,0, sedangkan berat kering BNC paling tinggi (0,19 g/L) dihasilkan pada pH 5,5.

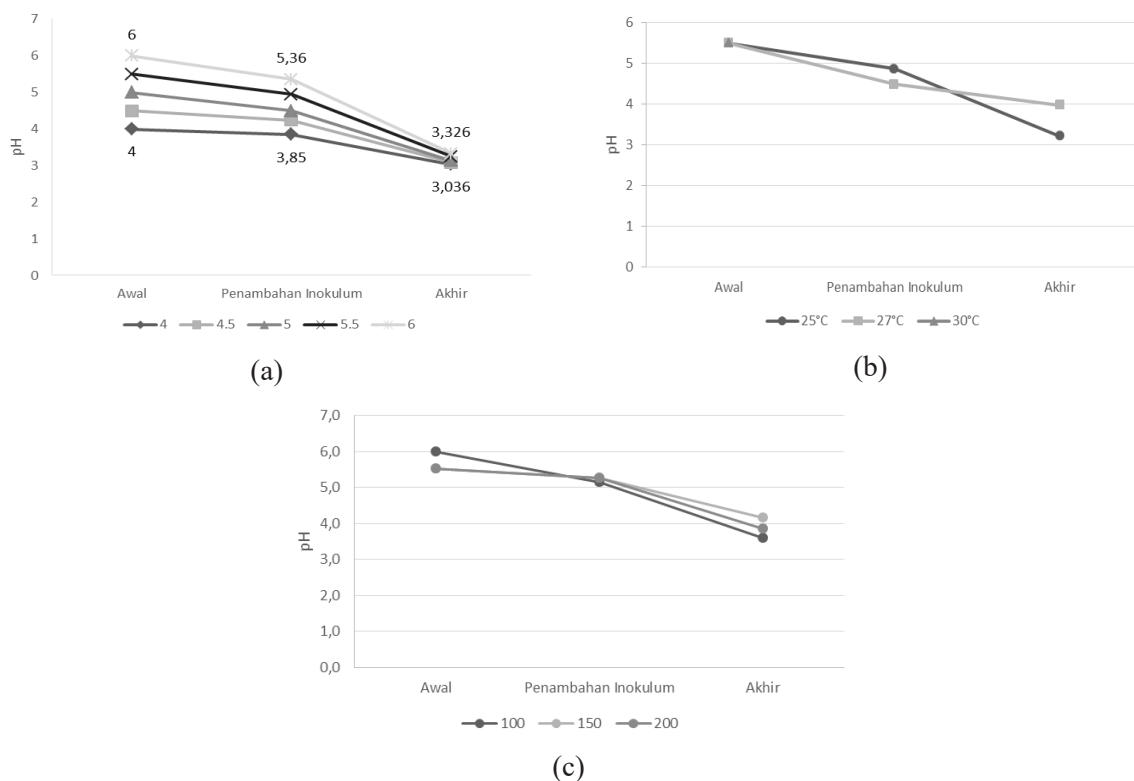
pH menggambarkan konsentrasi ion hidrogen di media tumbuh mikroorganisme tersebut. Konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi kemampuan mikroorganisme dalam mensintesis enzim yang dibutuhkan untuk metabolisme. Pertumbuhan mikroorganisme paling baik adalah pada kondisi pH optimal. Pada umumnya selulosa dihasilkan oleh bakteri pada kondisi pH netral mendekati asam. Setiap *strain* bakteri penghasil selulosa memiliki pH optimal yang berbeda (Benson 2001; Castro *et al.* 2012). Castro *et al.*, (2012) memproduksi *bacterial cellulose* dari *Gluconacetobacter medellensis* yang optimal pada pH 3,5 sehingga bakteri tersebut dikategorikan sebagai *strain* baru *Gluconacetobacter* tahan asam. Sedangkan beberapa penelitian menunjukkan *Acetobacter xylinum* memiliki pH optimal pada pH 5,0 (Zahan *et al.*, 2015) dan pH 6,5 (Coban & Biyik, 2011).

Penelitian ini menggunakan sumber karbon berupa glukosa sehingga interaksi antara glukosa dengan pH 5,5 dan 6,0 menghasilkan BNC dengan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan pH lainnya. pH optimum yang dibutuhkan oleh tiap *strain* bakteri untuk menghasilkan selulosa berbeda-beda. Interaksi antara jenis sumber karbon dan pH juga mempengaruhi produksi selulosa. Hutchens *et al.*, (2008) menyatakan bahwa pH sendiri tidak mempengaruhi produksi selulosa secara signifikan, tetapi produksi bakteri dipengaruhi oleh interaksi antara pH dan sumber

karbon. Interaksi glukosa dan pH 6,5 menghasilkan selulosa yang lebih tinggi dibandingkan pH 5,5. Berdasarkan hasil percobaan, pH 5,5 dipilih sebagai pH optimal produksi BNC dengan isolat JUM. Selain berat kering produk BNC yang dihasilkan paling tinggi, pertimbangan lainnya adalah biaya medium produksi. Pada dasarnya medium HS memiliki pH awal dengan kisaran 5,0. Untuk meningkatkan pH medium HS memerlukan larutan basa yaitu NaOH. Jika pH yang diinginkan semakin tinggi maka semakin banyak bahan kimia yang digunakan. Hal ini akan berdampak pada peningkatan biaya untuk medium produksi BNC.

**Gambar 6a** menampilkan pH medium awal, setelah penambahan inokulum, dan setelah inkubasi selama 7 hari pada percobaan dengan variasi pH. Pada medium dengan sumber karbon glukosa, sintesis selulosa akan bersaing dengan peristiwa oksidasi glukosa oleh glukosa dehidrogenase yang ada di membran sel. Oksidasi glukosa menghasilkan asam ketoglukonat sebagai produk samping. Asam ketoglukonat yang dilepaskan ke medium menyebabkan penurunan pH medium selama kultivasi (Vandamme *et al.*, 1998) sampai pada kisaran pH 3 di akhir kultivasi. Pada medium dengan pH awal 4 dan 4,5 mengalami penurunan pH hingga mencapai 3,0 di akhir kultivasi. Medium dengan pH awal 5,0; 5,5; dan 6,0 mengalami penurunan hingga masing-masing mencapai pH 3,1; 3,2; dan 3,3 di akhir kultivasi. Penurunan pH kemungkinan dapat menghambat produksi selulosa. Penggunaan medium dengan pH awal yang lebih basa dapat mengurangi penurunan pH sehingga meningkatkan produksi BNC. Karena *A. xylinum* adalah bakteri asidofilik tetapi jika berada pada lingkungan yang terlalu asam (< pH 4,0) dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga produksi BC semakin turun (Hwang *et al.*, 1999). Sehingga pH media pada kisaran pH 5,0 perlu dipertahankan dalam meningkatkan produksi selulosa bakteri dan meningkatkan pertumbuhan *A. xylinum* pada saat fermentasi (Zahan *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa dengan menggunakan medium yang memiliki nilai awal pH yang rendah (pH 4,5 dibandingkan pH 6) dapat meningkatkan *yield* dan produktivitas BNC.

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menumbuhkan isolat terpilih (JUM) dalam medium HS dengan tiga variasi suhu (25, 27, dan



**Gambar 6.** pH Kultur Produksi BNC pada Percobaan Variasi pH (a), Variasi Suhu 25-30 °C (b), dan Variasi Kecepatan Agitasi (c)

30 °C) dengan *yield* BNC disajikan pada **Gambar 5c** dan **Gambar 5d**. Produk BNC dengan berat basah dan berat kering paling rendah dihasilkan pada suhu 25 °C, yaitu sebesar 3,95 g/L dan 0,0744 g/L. Pada suhu 30 °C BNC yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan produk BNC pada suhu 25 °C dengan berat basah dan berat kering sebesar 8,5534 g/L dan 0,1066 g/L. Produksi BNC tertinggi dicapai pada suhu 27 °C dengan berat basah dan berat kering sebesar 9,9760 g/L dan 0,1658 g/L secara berurutan.

Suhu memiliki peranan yang penting dalam pertumbuhan bakteri. Enzim yang digunakan untuk metabolisme bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan. *Gluconacetobacter* penghasil selulosa termasuk jenis bakteri mesofil yang hidup pada rentang suhu 10 - 47 °C (Benson, 2001). Variasi suhu yang digunakan untuk produksi BNC isolat terpilih JUM (25, 27, dan 30 °C) termasuk dalam rentang suhu optimal produksi selulosa. Produksi selulosa oleh *Gluconacetobacter* dilaporkan optimum pada kisaran suhu 25 - 30 °C dan tidak ada perbedaan signifikan antara kedua suhu tersebut (Mohite *et al.*, 2013). Namun, hasil analisis statistik produk BNC pada **Tabel 2**

menunjukkan hasil yang tidak sejalan dengan pernyataan tersebut. Berat basah BNC pada suhu 27 °C dan 30 °C berbeda signifikan dengan berat basah BNC pada suhu 25 °C, sedangkan untuk berat kering BNC, suhu 27 °C menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Son *et al.*, (2001) melaporkan hasil produksi selulosa *Acetobacter xylinum* pada berbagai variasi suhu kisaran 20-40 °C. Produksi selulosa meningkat seiring kenaikan suhu dan mulai menurun pada suhu 35 °C. Kenaikan suhu meningkatkan kecepatan reaksi kimia dalam sel bakteri sehingga bakteri tumbuh lebih cepat. Pada penelitian ini, produksi BNC mengalami peningkatan hingga suhu 27 °C

**Tabel 2.** Hasil Analisis Statistik *Yield* BNC pada Variasi Suhu 25-30 °C

Suhu	Berat Basah (g/L)	Berat Kering (g/L)
25	3,9500 a	0,0744 a
27	9,9760 b	0,1658 b
30	8,5534 b	0,1066 a

Keterangan : Angka dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada taraf 5%



dimana dapat dikatakan suhu 27 °C merupakan suhu optimal bagi isolat JUM untuk tumbuh dan menghasilkan selulosa.

**Gambar 6b** menampilkan pH medium awal, setelah penambahan inokulum, dan setelah inkubasi selama 7 hari pada percobaan penentuan suhu optimum. Dapat terlihat bahwa pH pada tiap perlakuan mengalami penurunan hingga akhir inkubasi dan berakhir pada kisaran pH 3,2-3,9. Fenomena ini sesuai dengan percobaan penentuan pH optimum yang dilakukan sebelumnya.

**Gambar 5e** dan **Gambar 5f** menyajikan berat basah dan berat kering BNC yang dihasilkan dengan variasi kecepatan agitasi 100, 150, dan 200 rpm. Dapat terlihat bahwa produk BNC yang dihasilkan pada kecepatan agitasi 150 rpm memiliki berat basah dan berat kering paling tinggi di antara semua perlakuan, yaitu sebesar 11,8378 dan 0,2204 g/L. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan 150 rpm berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Dapat disimpulkan bahwa kecepatan agitasi optimal untuk produksi BNC dengan isolat JUM adalah 150 rpm. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Zywicka *et al.*, (2015) bahwa kecepatan pengadukan selama kultivasi adalah salah satu parameter penting yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas BC yang disintesis. Pada penelitian yang dilakukan oleh Zywicka *et al.*, (2015) berat BC tertinggi pun diperoleh pada kecepatan agitasi 150 rpm.

**Gambar 6c** menunjukkan pH medium awal, setelah penambahan inokulum, dan kultur setelah inkubasi selama 7 hari. Terjadi penurunan pH setelah penambahan inokulum. Setelah inkubasi selama 7 hari, pH kultur pada semua perlakuan kecepatan agitasi mengalami penurunan hingga kisaran pH 3,5-4,2. Menurut Jozala *et al.*, (2014), pH akhir medium setelah fermentasi cenderung asam, yaitu berkisar antara 3,5-5. Menurut (Kouda *et al.*, 1997) pertumbuhan *Gluconacetobacter* dipengaruhi oleh suplai oksigen yang dipengaruhi oleh konfigurasi agitator, termasuk parameter level pencampuran, kecepatan, dan kekuatan agitasi.

Oksigen adalah salah satu faktor penting dalam menghasilkan selulosa. Kondisi agitasi meningkatkan luas permukaan dengan udara dan media dan juga meningkatkan produksi selulosa (Mohite *et al.*, 2013). Tetapi pada kecepatan 200 rpm nilai *yield* yang didapat menjadi turun. Pa'e *et al.* (2011) menyatakan bahwa konsentrasi oksigen terlarut semakin

meningkat seiring dengan meningkatnya kecepatan perputaran rotasi tetapi semakin cepat perputaran rotasi akan menurunkan produksi selulosa karena kultur semakin tidak stabil. Semakin tinggi kecepatan agitasi semakin kecil pula ukuran partikel selulosa yang terbentuk (Hu & Catchmark, 2010).

Produksi BC yang efektif dan efisien menggunakan kultur agitasi terus berkembang. Hal ini disebabkan *strain* bakteri dan kondisi kultur fermentasi yang digunakan dapat mempengaruhi *yield* BNC yang dihasilkan (Singhsa *et al.*, 2018). Dalam penelitian ini *strain* bakteri dari industri nata sesuai untuk metode agitasi. Faktor terpenting selain komponen medium yang digunakan dan temperatur, keefektifan *strain Gluconacetobacter* dalam memproduksi selulosa adalah pasokan oksigen dan sumber karbon (seperti D-Glukosa) (Klemm *et al.*, 2011). Glukosa adalah satu-satunya sakarida yang ditemukan dalam air kelapa yang disimpan dalam 3 hari. Dalam membuat *nata de coco* industri menambahkan gula sebanyak kurang lebih 1-2% dalam komposisi medium yang digunakan (Budhiono *et al.*, 1999). Namun penambahan gula sebanyak 5% juga dapat meningkatkan pertumbuhan *A. xylinum* pada medium air kelapa (Indrianingsih *et al.*, 2017). Selain dari air kelapa, *A. xylinum* juga dapat memproduksi selulosa dengan sumber glukosa dari buah nenas (Malvianie *et al.*, 2014). Czaja *et al.* (2004) mengemukakan bahwa *strain* bakteri *A. xylinum* lebih efektif melakukan sintesa selulosa di dalam kultur agitasi.

Salah satu aplikasi BNC pada bidang farmasi adalah sebagai *drugs delivery systems*. Pötzing *et al.*, (2017) melaporkan bahwa BNC yang dihasilkan pada kultur agitasi dapat digunakan sebagai pembawa obat (*drug carrier*) dalam bentuk sediaan oral. Pengembangan BNC sebagai *drugs delivery systems* tergantung kepada kesediaan biopolimer yang cukup dengan harga yang terjangkau (Muller *et al.*, 2013). Sampai saat ini produksi BNC masih tinggi karena menggunakan medium yang mahal untuk mencapai rendemen tinggi sehingga dapat memenuhi kebutuhan selulosa dunia (Donini *et al.*, 2010).

## Kesimpulan

BNC yang diproduksi melalui perlakuan agitasi menghasilkan selulosa dengan berat basah

dan berat kering lebih tinggi dibanding perlakuan statis. Isolat bakteri *Gluconacetobacter* sp. dengan kode JUM yang diperoleh dari industri *nata de coco* telah dipilih sebagai bakteri penghasil *bacterial nanocellulose* (BNC). Kondisi optimum isolat bakteri ini dalam menghasilkan selulosa terjadi pada kondisi pH 5,5, suhu 27 °C, dan kecepatan agitasi 150 rpm.

## Daftar Pustaka

- Atalla, R. H., & Vanderhart, D. L. (1984). Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, *223*, 283–285.
- Benson, H. . (2001). *Microbiological Application* (8th ed.). Boston: The McGraw-Hill Companies.
- Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, *40*(2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00050-8)
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I., & Gañán, P. (2012). Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*, *89*(4), 1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.045>
- Chen, G., Wu, G., Chen, L., Wang, W., Hong, F. F., & Jönsson, L. J. (2019). Performance of nanocellulose-producing bacterial strains in static and agitated cultures with different starting pH. *Carbohydrate Polymers*, *215*(February), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.080>
- Coban, E. P., & Biyik, H. (2011). Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(9), 1037–1045. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.008>
- Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R. malcolm. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, *11*(3/4), 403–411. <https://doi.org/10.1023/b:cell.0000046412.11983.61>
- Dima, S. O., Panaitescu, D. M., Orban, C., Ghiurea, M., Doncea, S. M., Fierascu, R. C., Nistor, C. L., Alexandrescu, E., Nicolae, C. A., Trica, B., Moraru, A., & Oancea, F. (2017). Bacterial nanocellulose from side-streams of kombucha beverages production: Preparation and physical-chemical properties. *Polymers*, *9*(8), 5–10. <https://doi.org/10.3390/polym9080374>
- Donini, Í. A. N., De Salvi, D. T. B., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*, *35*(4), 165–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>
- Fu, L., Zhang, J., & Yang, G. (2013). Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>
- Gatenholm, P., & Klemm, D. (2010). Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications. *MRS Bulletin*, *35*(3), 208–213. <https://doi.org/10.1557/mrs2010.653>
- Gayathry, G., & Gopalaswamy, G. (2014). Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, *39*(1), 93–96.
- Gullo, M., Sola, A., Zanichelli, G., Montorsi, M., Messori, M., & Giudici, P. (2017). Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(22), 8115–8127. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8539-3>
- Gupta, A., Briffa, S. M., Swingler, S., Gibson, H., Kannappan, V., Adamus, G., Kowalczyk, M., Martin, C., & Radecka, I. (2020). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin-Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications. *Biomacromolecules*, *21*(5), 1802–1811. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01724>
- Hu, Y., & Catchmark, J. M. (2010). Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by *acetobacter xylinum* JCM 9730 strain. *Biomacromolecules*, *11*(7), 1727–1734. <https://doi.org/10.1021/bm100060v>
- Hutchens, S. A., León, R. V., O'Neill, H. M., & Evans, B. R. (2008). Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Letters in Applied Microbiology*, *44*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02055.x>
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R. (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.

- Indrianingsih, A., Rosyida, V., Jatmiko, T., Prasetyo, D. J., Peloengasih, C. D., Apriyana, W., Nisa, K., Nurhayati, S., Hernawan, H., Darsih, C., Pratiwi, D., Suwanto, A., & Ratih, D. (2017). Preliminary study on biosynthesis and characterization of bacteria cellulose films from coconut wate. *Iopscience.Iop. Org*, 8(February 2018), 68–74. <https://doi.org/10.1088/1755-1315>
- Joseph, G., Rowe, G. E., Margaritis, A., & Wan, W. (2003). Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by Acetobacter xylinum. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 970(April), 964–970. <https://doi.org/10.1002/jctb.869>
- Jozala, A. F., de Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., Grotto, D., Gerenutti, M., & Chaud, M. V. (2016). Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2063–2072. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>
- Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A. (2014). Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1181–1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(24), 5438–5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- Kost, J., Wiseman, D., & Domb, A. J. (1998). *Handbook of biodegradable polymers*. CRC Press.
- Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1997). Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4), 371–376. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80144-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80144-4)
- M. Iguchi, S. Yamanaka, & A. Budhiono; (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270. <https://doi.org/10.1023/A>
- Malvianie, E., Pratama, Y., & Salafudin, S. (2014). Fermentasi Sampah Buah Nanas menggunakan Sistem Kontinu dengan bantuan Bakteri Acetobacter Xylinum. *Reka Lingkungan*, 2(1), 1–11.
- Mohammadkazemi, F. (2015). Surface Properties of Bacterial Nanocellulose Using Spectroscopic Methods and X-Ray Diffraction. *American Journal of Applied and Industrial Chemistry*, 1(2), 10–13. <https://doi.org/10.11648/j.ajaic.20150102.11>
- Mohite, B. V., Salunke, B. K., & Patil, S. V. (2013). Enhanced production of bacterial cellulose by using gluconacetobacter hansenii NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(5), 1497–1511. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0092-7>
- Muller, A., NI, Z., Nadine, H., Wesarg, F., Muller, F. A., Kralisch, D., & Fischer, D. (2013). The Biopolymer Bacterial Nanocellulose as Drug Delivery System: Investigation of Drug Loading and Release using the Model Protein Albumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(7), 579–592. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Nakagaito, A. N., Iwamoto, S., & Yano, H. (2005). Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Applied Physics A*, 80(1), 93–97. <https://doi.org/10.1007/s00339-004-2932-3>
- Numata, Y., Sakata, T., Furukawa, H., & Tajima, K. (2015). Bacterial cellulose gels with high mechanical strength. *Materials Science and Engineering C*, 47, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.026>
- Pa'e, N., Zahan, K. A., & Muhamad, I. I. (2011). Production of Biopolymer from Acetobacter xylinum Using Different Fermentation Methods. *International Journal of Engineering & Technology, IJET-IJENS*(October), 90–98.
- Pandey, K. K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 71(12), 1969–1975. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19990321\)71:12<1969::aid-app6>3.3.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19990321)71:12<1969::aid-app6>3.3.co;2-4)
- Pavaloiu, R. D., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., & Dobre, T. (2014). Use of bacterial cellulose as reinforcement agent and as coating agent in drug release applications. *Revista de Chimie*, 65(7), 852–855.
- Pöttinger, Y., Kralisch, D., & Fischer, D. (2017). Bacterial nanocellulose: The future of controlled drug delivery? *Therapeutic Delivery*, 8(9), 753–761. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0059>

- Shoda, M., & Sugano, Y. (2005). Recent Advance in Bacterial Cellulose Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 1–8.
- Simanjuntak, R. (2016). Pengawasan Bahan Baku Obat Untuk Mendukung Kemandirian Bahan Baku Obat. In *Seminar Pentahelix Kemandirian Bahan Baku Farmasi serta Lanching Information and Data Center*. Jatinangor: Universitas Padjajaran.
- Singhsa, P., Narain, R., & Manuspiya, H. (2018). Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose*, 25(3), 1571–1581. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., & Lee, S.-J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), 1. <https://doi.org/10.1042/ba20000065>
- Tanskul, S., Amornthatree, K., & Jaturonlak, N. (2013). A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.017>
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 93–99. [https://doi.org/10.1016/s0141-3910\(97\)00185-7](https://doi.org/10.1016/s0141-3910(97)00185-7)
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Yasushi, M., & Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, 5, 187–200.
- Yue, Y., Han, J., Han, G., Zhang, Q., French, A. D., & Wu, Q. (2015). Characterization of cellulose I/II hybrid fibers isolated from energycane bagasse during the delignification process: Morphology, crystallinity and percentage estimation. *Carbohydrate Polymers*, 133, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.058>
- Zahan, K. A., Pa'e, N., & Muhamad, I. I. (2015). Monitoring the Effect of pH on Bacterial Cellulose Production and *Acetobacter xylinum* 0416 Growth in a Rotary Discs Reactor. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1881–1885. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1712-z>
- Zywicka, A., Peitler, D., Rakoczy, R., Konopacki, M., Kordas, M., & Fijałkowski, K. (2015). The Effect of Different Agitation Modes on Bacterial Cellulose Synthesis. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 14(1), 137–150.