



Optimalisasi Media *Gellan Gum* untuk Penyimpanan Bakteri: Analisis Viabilitas pada Berbagai Konsentrasi

Nabila Utami¹, Diah Ayu Prawitasari^{1,2}, Annisa Nur Lathifah^{1,2*}

¹ Program Studi Teknik Lingkungan Program Sarjana, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55584.

² Laboratorium Bioteknologi Lingkungan, Jurusan Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55584.

*Korespondensi: annisa.lathifah@uii.ac.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi teknik penyimpanan isolat bakteri dalam media *gellan gum* dengan variasi konsentrasi 2,5% dan 3%. Viabilitas koloni bakteri dievaluasi dengan metode *Total Plate Count* (TPC), serta pengamatan morfologi sel diamati melalui teknik pewarnaan gram. Sampel bakteri yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia, yang memiliki potensi dalam aplikasi bioremediasi dan bioteknologi. Kultur bakteri diinokulasikan ke dalam media semi padat DNB (*Dilute Nutrient Broth*) ditambah *gellan gum* dengan konsentrasi 2,5% dan 3%. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan pertumbuhan koloni bakteri yang signifikan antara kedua konsentrasi. Pada konsentrasi 2,5%, jumlah koloni yang terhitung dalam sampel isolat lebih rendah dibandingkan pada konsentrasi 3%. Selain itu, dilakukan pengamatan morfologi sel dengan pengecatan gram. Teknik ini menunjukkan bahwa bakteri yang diuji termasuk gram positif. Pengamatan morfologi makroskopis meliputi bentuk sel, tepi, dan elevasi bakteri yang diteliti, sehingga memberikan informasi tambahan mengenai karakteristik bakteri tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media DNB ditambah *gellan gum* dengan konsentrasi 3% lebih efektif dalam mendukung pertumbuhan koloni bakteri. Hasil penelitian ini dapat dijadikan alternatif penyimpanan bakteri dalam jangka panjang dengan mempertahankan viabilitas dan morfologi selnya, sehingga berpotensi untuk mendukung aplikasi bioremediasi dan bioteknologi di masa mendatang.

Kata Kunci: bioteknologi, *gellan gum*, isolat bakteri, viabilitas

1. PENDAHULUAN

Penyimpanan mikroba berperan penting dalam mendukung aplikasi bioremediasi, terutama ketika terdapat jeda waktu dan perbedaan lokasi antara produksi dan penggunaannya. Berdasarkan jangka waktunya, penyimpanan dapat dilakukan dalam dua kategori, yaitu jangka penyimpanan pendek untuk kebutuhan laboratorium rutin, serta jangka panjang untuk konservasi stok mikroba agar dapat ditumbuhkan kembali dengan viabilitas dan kinerja optimal (Najmiyati & Akhadi, 2013). Prinsip utama dalam penyimpanan adalah menekan aktivitas metabolisme sehingga energi sel tetap terjaga, memungkinkan mikroba tetap viabel dan dapat tumbuh kembali (McDaniel & Bailey, 1968).

Salah satu pendekatan yang digunakan adalah enkapsulasi, yang bertujuan melindungi sel dari kondisi lingkungan yang tidak stabil. Bahan enkapsulan yang banyak digunakan antara lain alginat, karagenan, *xanthan gum*, dan *gellan gum* (Aali & Al-Sahlany, 2024). *Gellan gum* merupakan polisakarida alami hasil fermentasi *Sphingomonas elodea* dengan kemampuan membentuk gel yang stabil, memperlambat pelepasan nutrisi, serta melindungi protein penting bagi viabilitas bakteri (Nasrollahzadeh et al., 2021).

Konsentrasi *gellan gum* menjadi faktor penting yang menentukan efektivitas penyimpanan. Konsentrasi berlebih dapat menghambat pertumbuhan, sedangkan konsentrasi terlalu rendah tidak mampu menjaga viabilitas dalam jangka panjang. Oleh karena itu, eksplorasi variasi konsentrasi diperlukan untuk menemukan formulasi optimal yang dapat mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup mikroba (Mac et al., 2017).

Sejumlah penelitian telah membuktikan efektivitas *gellan gum* sebagai pengganti agar. Mac et al. (2017), melaporkan peningkatan kultur bakteri laut hingga 40 kali lipat dibanding media agar konvensional, sementara Janssen et al. (2002), menunjukkan peningkatan jumlah koloni bakteri tanah hingga 7,5% dari total sel terdeteksi. Selain itu, *gellan gum* juga mampu mengurangi faktor toksisitas agar sehingga memungkinkan isolasi bakteri yang sulit dikulturkan, termasuk *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, dan *Proteobacteria*.

Berdasarkan kondisi tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi *gellan gum* terhadap viabilitas dan pertumbuhan koloni bakteri selama penyimpanan. Penelitian ini juga bertujuan menentukan konsentrasi optimal yang mendukung pertumbuhan koloni tertinggi setelah penyimpanan melalui metode *Total Plate Count* (TPC), serta mengidentifikasi perubahan morfologi sel dengan pengecatan gram.

2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas standar laboratorium (cawan petri, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, pipet ukur, dan tabung reaksi), alat inokulasi (jarum ose, mikropipet, batang pengaduk, karet penghisap, kaca preparat), serta peralatan lainnya seperti bunsen, *cryovial*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, autoklaf, inkubator 30°C, *Laminar Air Flow Cabinet*, lemari pendingin, timbangan digital, dan *colony counter*. Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu Media *Gellan Gum* (GG), *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Plate Count Agar* (PCA), serta akuades steril. Bahan kimia lain yang digunakan yaitu spirtus, alkohol 70%, serta reagen pewarnaan gram: Kristal Violet, Iodine, dan Safranin.



Gambar 1. Sediaan Media *Gellan Gum*

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan meliputi *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), serta *Dilute Nutrient Broth* (DNB) dengan penambahan *Gellan Gum* 2,5% dan 3%. NB dibuat dengan melarutkan 0,8 g serbuk NB ke dalam 100 mL akuades, dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dan *hot plate*, kemudian dibagi ke tabung reaksi (5 mL), ditutup dengan kapas, disterilisasi dengan autoklaf 121°C, dan disimpan 24 jam pada suhu 4°C untuk uji sterilitas. NA dibuat dengan 2 g serbuk NA dalam 100 mL akuades, dipanaskan hingga homogen, kemudian dimasukkan ke tabung (5 mL), disterilisasi, dan dicetak sebagai agar miring. DNB dibuat dengan pengenceran 100× (1 mL stok NB dalam 99 mL akuades), lalu ditambahkan *gellan gum* 2,5% atau 3%. Campuran dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, dibagi ke dalam cryovial (3 mL), disterilisasi, dan disimpan hingga digunakan (Usman & Osuji, 2007). Secara umum, *gellan gum* dapat digunakan pada kisaran 0,2–1,0% tergantung tujuan kultur; konsentrasi tinggi digunakan untuk kebutuhan penyimpanan jangka panjang (Mac et al., 2017).

Setiap pengujian disertai dengan kontrol negatif berupa media tanpa inokulasi bakteri untuk mendeteksi kemungkinan kontaminasi (Sangkoy et al, 2023). Media yang menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba pada kontrol dianggap tidak steril sehingga data perlakuan tidak bisa dianalisis lebih lanjut.

2.2.2. Inokulasi dan Inokulasi Sample Bakteri

Sampel bakteri diperoleh dari hasil isolasi tanah endapan vulkanik Gunung Merapi (2013), setelah letusan tahun 2010. Tanah hasil endapan lahar tersebut diketahui memiliki sifat fisik yang sangat porus dengan kadar air rendah, sekitar 1–3% volume (Dedi et al., 2012 dikutip dalam Prakasa, 2024). Pengambilan sampel dari lokasi deposit vulkanik dilakukan untuk memahami peran komunitas mikroba dalam proses biogeokimia serta dinamika perkembangan tanah di lingkungan ekstrem pasca-erupsi. Selain itu, keberadaan komunitas mikroba tanah berperan penting dalam siklus ekosistem, termasuk siklus karbon dan nitrogen, serta dapat menjadi indikator awal pemulihan lingkungan (Prakasa, 2024).

Kulturasasi bakteri diawali dengan inokulasi satu ose isolat ke dalam 5 mL NB dan inkubasi 18–24 jam pada 30°C dalam *waterbath shaker* hingga terlihat kekeruhan sebagai tanda pertumbuhan (Septiani, 2019). Selanjutnya, suspensi dipindahkan ke media NA miring dengan metode gores (*streak plate*) untuk mendapatkan koloni tunggal yang diamati secara morfologi. Koloni tunggal murni kemudian dipindahkan ke media DNB + *gellan gum* (2,5% dan 3%) sebagai media semi-padat untuk penyimpanan isolat jangka panjang.

2.3 Analisis Data

2.3.1 Identifikasi Morfologi Sel dengan Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk membedakan bakteri menjadi kelompok gram positif dan gram negatif berdasarkan karakteristik dinding selnya. Bakteri gram positif akan berwarna ungu hingga biru kehitaman, sedangkan gram negatif berwarna merah setelah proses pewarnaan (Lay, 1994). Mulai dari isolat diambil secara aseptik dengan jarum ose, diletakkan pada kaca preparat yang telah ditetesi akuades, difiksasi di atas api bunsen, kemudian melalui tahapan pewarnaan: kristal

violet (1 menit), iodine (1 menit), dekolorisasi dengan alkohol 96% (30 detik), dan safranin (1 menit). Preparat diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x dengan bantuan minyak imersi (Yusmaniar et al., 2017).

2.3.2 Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan koloni dilakukan setelah isolat diinkubasi pada media DNB dengan *gellan gum* dalam rentang waktu 7 hari. Koloni diamati menggunakan *colony counter* untuk menilai jumlah, bentuk, warna, elevasi, dan margin koloni. Pengamatan total koloni dilakukan dengan metode teknik tuang *Total Plate Count* (TPC) menggunakan pengenceran serial 10^{-1} – 10^{-6} . Sebanyak 1 mL suspensi dari pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} dipipet ke cawan petri dan dituang *Plate Count Agar* (PCA) 15-20 ml, kemudian dihomogenisasi ke depan belakang dan kanan kiri selanjutnya diinkubasi 24–48 jam pada suhu 30°C. Jumlah koloni dihitung dalam satuan CFU/mL untuk menilai viabilitas dan efektivitas media *gellan gum* sebagai penyimpanan isolat (Madigan et al., 2018).

2.3.3 Perhitungan Pertumbuhan Koloni Bakteri

Analisis densitas pertumbuhan koloni dihitung dengan rumus, sebagai berikut.

$$TPC(CFU/mL) = \frac{(\text{jumlah koloni}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume sampel}} \quad (1.1)$$

Koloni yang digunakan dalam perhitungan adalah jumlah representatif, yaitu 30–300 koloni sesuai standar mikrobiologi (Fatayati et al., 2023). Hasil ini menjadi dasar untuk mengevaluasi keberhasilan kulturisasi serta ketahanan isolat dalam media penyimpanan berbasis *gellan gum*.

2.3.4 Uji Mann Whitney-U

Uji Mann-Whitney-U merupakan uji statistik non-parametrik yang digunakan untuk membandingkan dua kelompok independen guna mengetahui adanya perbedaan signifikan, terutama ketika data tidak terdistribusi normal. Uji ini merupakan alternatif dari *Independent Sample T-Test* dan menguji hipotesis apakah kedua sampel berasal dari populasi dengan median yang sama (Trimawartinah, 2020). Data yang digunakan umumnya berskala ordinal, namun dapat pula berupa interval atau rasio apabila asumsi normalitas tidak terpenuhi (Heryana, 2020). Terdapat dua pendekatan perhitungan, yakni untuk jumlah sampel kecil (n_1 atau $n_2 < 20$) dan untuk jumlah sampel besar (n_1 atau $n_2 \geq 20$) (Yanti, 2007). Kriteria pengujian didasarkan pada nilai signifikansi (Asymp. Sig. 2-tailed) berikut.

- Jika $p < 0,10$ menunjukkan adanya perbedaan signifikan (hipotesis nol ditolak),
- Jika $p > 0,10$ menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan (hipotesis nol diterima).

3. HASIL DAN DISKUSI

Sampel isolat bakteri diperoleh dari koleksi Laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia yang kemudian dikultur didalam media NB. Media ini dipilih karena mengandung nutrisi dasar yang mendukung pertumbuhan berbagai bakteri yang ditunjukkan dengan perubahan kekeruhan (turbiditas) selama inkubasi pada *waterbath shaker* (Sumardi & Untara, 2020).

Selanjutnya, kultur dipindahkan ke media NA miring dengan teknik *streak* untuk memperbanyak koloni, sebagai sediaan bakteri untuk identifikasi pewarnaan gram. Berikut merupakan isolat bakteri yang digunakan:

Tabel 1. Nama-nama Isolat Bakteri

Kode Bakteri	Nama Bakteri
BR-1	<i>Arthrobacter aureus</i>
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>
BR-36	<i>Masilia abidiflava</i>
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

3.1 Penyimpanan Isolat pada Media *Gellan Gum*

GG merupakan heteropolisakarida linear yang mengandung muatan negatif, yang dikenal sebagai polyanion, yang tersusun atas empat unit dasar (tetrasakarida): 2 molekul β -D-glucose, 1 molekul β -D-glucuronate, dan 1 molekul α -L-rhamnose (Aali dk., 2024). Komposisi polimer GG mencakup glukosa 60%, dengan rhamnosa dan asam glukoronat masing-masing sebesar 20%. GG yang diproduksi dibagi menjadi dua macam: tipe alami, dengan kandungan asilnya yang tinggi (GG high-acyl); dan asil rendah, dimana gugus asil dihilangkan (GG low acyl). Perbedaannya dilihat dari keberadaan dua gugus asil, gliserida dan asetat. Selama proses pemurnian GG alami, gugus asil dapat dihilangkan dengan larutan basa panas, yang kemudian mempengaruhi sifat reologinya.

Dalam mempertahankan viabilitas dan kestabilan isolat untuk jangka panjang, koloni murni dari media agar miring dipindahkan ke media semi-padat berupa *Dilute Nutrient Broth* (DNB) + *gellan gum* pada konsentrasi 2,5–3%. Media ini disiapkan dengan mencampurkan bubuk *gellan gum* ke dalam DNB, dipanaskan hingga homogen, kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah media dingin, inokulasi dilakukan dengan menanamkan koloni murni ke dalam medium tersebut dan diinkubasi pada suhu 30°C. Media semi-padat ini mendukung penyimpanan bakteri yang lebih stabil dibandingkan medium agar konvensional (Septiani, 2019).

Penggunaan inkubasi pada suhu 30 °C membantu mencapai kondisi optimal pertumbuhan. Konsentrasi *gellan gum* berpengaruh terhadap struktur gel; semakin tinggi konsentrasi, semakin rapat jaringan gel sehingga difusi nutrisi dan oksigen melambat. Hal ini menurunkan laju pertumbuhan, namun meningkatkan daya simpan sel karena metabolisme bakteri menjadi lebih efisien (Nair et al., 2019).

Beberapa studi menunjukkan bahwa *gellan gum* lebih unggul dibanding agar karena lebih murni dan tidak mengandung senyawa toksik. Janssen et al. (2002), melaporkan bahwa media DNB+GG dapat meningkatkan proporsi sel yang tumbuh hingga 7,5% dibanding agar (5,2%), bahkan mencapai 14,1% setelah perlakuan prasonikasi. Pada kultur bakteri laut, substitusi agar dengan GG mampu meningkatkan viabilitas hingga 3–40 kali, tergantung jenis media dan kondisi kultur (Rygaard et al., 2017). Temuan ini menegaskan bahwa pemilihan konsentrasi *gellan gum* yang tepat berperan penting dalam mempertahankan viabilitas dan keberhasilan pertumbuhan isolat.

3.2 Identifikasi Koloni Bakteri dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Metode *Total Plate Count* (TPC) digunakan untuk menghitung jumlah mikroba melalui pembentukan koloni pada media padat. Media *Plate Count Agar* (PCA) mengandung *casein enzymic hydrolysate*, *yeast extract*, *dextrose*, dan agar, sehingga mampu mendukung pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan koloni dipengaruhi oleh faktor abiotik, meliputi suhu, pH, kelembaban,

cahaya, serta ketersediaan nutrisi. Faktor-faktor ini menentukan keberhasilan pembentukan koloni karena mikroba bersifat sangat peka terhadap lingkungannya (Haastuti, 2008).

Metode TPC dengan teknik tuang (*pour plate*), yaitu 1 ml sampel hasil pengenceran serial dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan 15–20 ml media PCA cair steril yang telah didinginkan (47–50 °C). Campuran digoyangkan hingga homogen, kemudian diinkubasi pada 30 °C selama 48 jam (Dwidjoseputro, 2005), dan dihitung total koloni yang tumbuh di *colony counter*.

Tabel 2. Perhitungan koloni pada media PCA dalam CFU/ml hari ke-12

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan Gum</i>	Total Plate Count (CFU/ml)
BR-1	<i>Arthobacter aurescens</i>	2,5%	$2,0 \times 10^6$
		3%	$1,2 \times 10^7$
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%	$3,0 \times 10^7$
		3%	$3,2 \times 10^7$
BR-36	<i>Masilia abidiflava</i>	2,5%	$2,9 \times 10^7$
		3%	$1,7 \times 10^7$
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%	$5,9 \times 10^6$
		3%	$1,9 \times 10^7$

Tabel 3. Perhitungan koloni pada media PCA dalam CFU/ml hari ke-28

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan Gum</i>	Total Plate Count (CFU/ml)
BR-1	<i>Arthobacter aurescens</i>	2,5%	$1,0 \times 10^7$
		3%	$3,8 \times 10^7$
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%	$3,0 \times 10^7$
		3%	$5,0 \times 10^7$
BR-36	<i>Masilia abidiflava</i>	2,5%	$7,0 \times 10^7$
		3%	$3,0 \times 10^7$
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%	$4,5 \times 10^7$
		3%	$3,0 \times 10^7$

3.3 Uji Mann Whitney-U

Data yang dipakai merupakan hasil analisis total koloni bakteri (CFU/mL) pada pengujian TPC secara duplo di dua konsentrasi *gellan gum*. Berdasarkan hasil analisis Uji Mann Whitney U, menunjukkan nilai signifikansi pada hari ke-12 sebesar 0,077 dan nilai signifikansi pada hari ke-28 yaitu 0,062, nilai tersebut kurang dari 0,1. Maka, hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat signifikansi yang berbeda dari nilai total koloni antara konsentrasi 2,5% dan konsentrasi 3% pada taraf nyata atau ambang toleransi (*false positive*) 10%. Taraf ini dipakai karena ukuran sampel yang kecil dengan data yang sangat bervariasi. Karena adanya perbedaan yang signifikan maka

"Hipotesis Ditolak" yang mengonfirmasi bahwa konsentrasi *gellan gum* yang dipakai memberikan pengaruh terhadap total koloni bakteri yang tumbuh pada media *gellan gum*.

Perbedaan ini mengindikasikan bahwa respons fisiologis bakteri terhadap kepadatan matriks gel berbeda secara nyata antara kedua konsentrasi yang diuji. Hal ini dapat membuktikan tentang dugaan bahwa kerapatan media juga berperan dalam mengatur ketersediaan nutrisi, difusi oksigen, dan ruang gerak sel, yang mempengaruhi dinamika populasi bakteri.

3.4 Analisis Viabilitas pada Konsentrasi *Gellan Gum* yang Optimal

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi optimal *gellan gum* dalam penyimpanan berbeda terhadap antar strain bakteri. Untuk bakteri BR-1, BR-12, dan BRU-12 pada konsentrasi 3% menunjukkan viabilitas bakteri yang lebih tinggi, sementara bakteri BR-36 justru menunjukkan viabilitas optimalnya pada konsentrasi 2,5%. Berikut perbandingan konsentrasi DNB+GG terhadap viabilitas pertumbuhan bakteri:

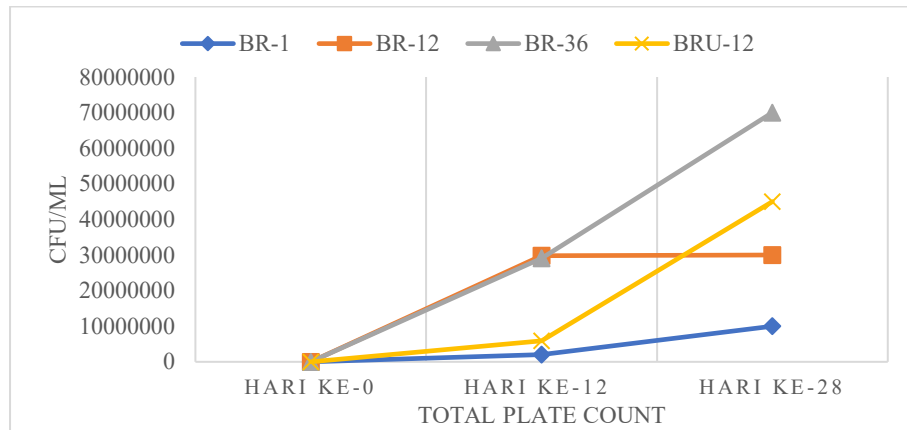
Tabel 4 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG dari TPC hari ke-12

Kode Bakteri	Konsentrasi DNB+GG 2,5%	Konsentrasi DNB+GG 3%
BR-1	2×10^6	1×10^7
Br-12	3×10^7	3×10^7
BR-36	3×10^7	2×10^7
BRU-12	6×10^6	2×10^7

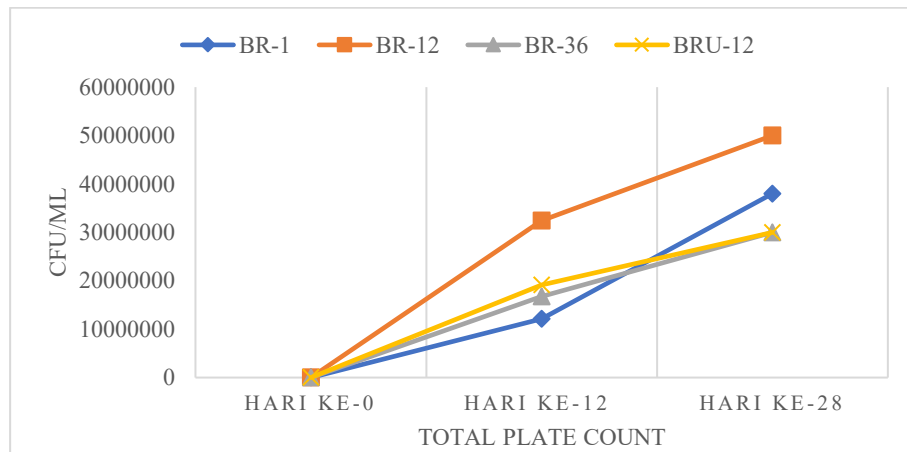
Tabel 5 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG hari ke-28

Kode Bakteri	Konsentrasi DNB+GG 2,5%	Konsentrasi DNB+GG 3%
BR-1	1×10^7	4×10^7
Br-12	3×10^7	5×10^7
BR-36	7×10^7	3×10^7
BRU-12	5×10^7	3×10^7

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi *gellan gum* memengaruhi viabilitas bakteri selama penyimpanan. Pada konsentrasi rendah (0,5%), gel yang terbentuk lunak dan kurang stabil, sehingga meski nutrisi mudah diakses, perlindungan sel terhadap tekanan lingkungan rendah dan viabilitas menurun setelah periode simpan tertentu. Konsentrasi menengah (1,5%) memberikan kestabilan mekanik yang lebih baik sekaligus mempertahankan difusi nutrisi, sehingga mendukung pertumbuhan bakteri secara optimal. Pada konsentrasi tinggi (2,5 dan 3%), media menunjukkan kestabilan fisik yang lebih kuat dan mampu melindungi sel dari fluktuasi lingkungan jangka panjang, meskipun difusi nutrisi sedikit terhambat. Respons antar-isolat berbeda; *Pseudomonas spp.* tetap viabel pada konsentrasi 2,5–3%, sedangkan isolat lain lebih optimal pada konsentrasi menengah. Secara keseluruhan, konsentrasi 1,5–3% terbukti lebih efektif dibandingkan 0,5% dalam mempertahankan viabilitas, dengan pemilihan konsentrasi optimal bergantung pada karakteristik isolat. Temuan ini konsisten dengan Janssen et al. (2002), yang menegaskan peran *gellan gum* dalam meningkatkan isolasi bakteri tanah, serta Mac et al. (2017), yang melaporkan peningkatan hingga 40 kali lipat jumlah bakteri terkultur dengan media *gellan gum* dibanding agar. Kenaikan viabilitas bakteri dapat dilihat pada grafik pertumbuhan dibawah (Gambar 2 dan Gambar 3).



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Koloni Bakteri pada Media Gelllan Gum Konsentrasi 2,5%



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Koloni Bakteri pada Media Gelllan Gum Konsentrasi 3%

Secara statistik, konsentrasi 3% DNB+gellan gum menghasilkan pertumbuhan optimal untuk isolat bakteri BR-1 (4×10^7 CFU/mL), BR-12 (5×10^7 CFU/mL), dan BRU-12 (3×10^7 CFU/mL) pada hari ke-28. Sementara itu, BR-36 menunjukkan pola berbeda, dengan pertumbuhan tertinggi (7×10^7 CFU/mL) pada konsentrasi 2,5%, dibandingkan hanya 3×10^7 CFU/mL pada 3%.

Isolat BR-1 (*A. aurescens*) mengalami fase adaptasi hingga hari ke-12 sebelum memasuki fase eksponensial yang lebih signifikan pada media 3%. Pada hari ke-28, jumlah koloni masih meningkat tanpa ada tanda fase kematian, mengindikasikan karakteristik bakteri dengan pertumbuhan lambat namun konsisten (Jones & Keddie, 2006).

BR-12 (*M. loti*) menunjukkan pertumbuhan cepat pada kedua konsentrasi, menandakan masuknya fase eksponensial sejak awal. Pada hari ke-28, pertumbuhan pada 2,5% stabil di 3×10^7 CFU/mL (fase stasioner), sedangkan pada 3% meningkat hingga 5×10^7 CFU/mL, menandakan media yang lebih padat memperpanjang fase eksponensial. Hal ini sejalan dengan sifat *M. loti* sebagai bakteri simbiotik yang responsif terhadap lingkungan organik (Zhang et al., 2011).

Isolat BR-36 (*M. abidiflava*) justru menunjukkan pertumbuhan lebih tinggi pada media 2,5%, dengan peningkatan signifikan hingga 7×10^7 CFU/mL pada hari ke-28, mengindikasikan fase

eksponensial lanjutan. Sebaliknya, pada media 3% pertumbuhan hanya mencapai 3×10^7 CFU/mL, menunjukkan transisi ke fase stasioner. Tidak ada indikasi fase kematian, sehingga konsentrasi 2,5% dapat dianggap sebagai kondisi optimal bagi isolat ini.

BRU-12 memperlihatkan pola pertumbuhan lebih lambat dan dinamis. Pertumbuhan awal lebih tinggi pada 3%, tetapi pada hari ke-28 jumlah koloni lebih besar pada 2,5% (5×10^7 CFU/mL) dibandingkan 3% (3×10^7 CFU/mL). Hal ini mengindikasikan bahwa media terlalu padat dapat membatasi difusi nutrisi dan oksigen pada fase lanjut, sehingga isolat lebih stabil pada konsentrasi yang lebih rendah.

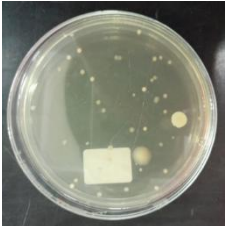
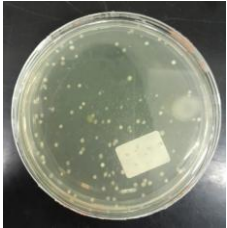
Perbedaan respons antar isolat menunjukkan bahwa media semi-padat *gellan gum* berperan dalam menjaga stabilitas fisik dan kelembaban sel, tetapi konsentrasi optimal bergantung pada karakteristik spesies. Menurut Brinke et al. (2011), *gellan gum* meningkatkan retensi viabilitas organisme, sedangkan Prajapati et al. (2013), menekankan bahwa variasi konsentrasi memengaruhi sifat mekanis gel dan daya hidup sel. Dengan demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi *gellan gum* dengan konsentrasi 3% lebih efektif bagi sebagian bakteri. Respons BR-36 menunjukkan bahwa titik konsentrasi optimalnya pada konsentrasi 2,5%, Lee et al. (2020), melaporkan bahwa konsentrasi $>2,8\%$ dapat membentuk matriks terlalu padat bagi sebagian besar bakteri gram negatif. Hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memahami mekanisme terkait viabilitas dan karakteristik morfologinya.

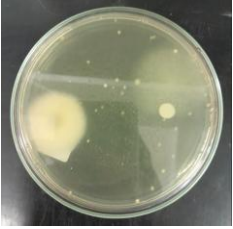
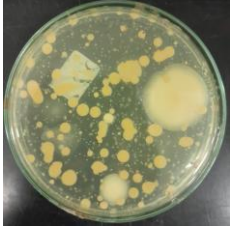
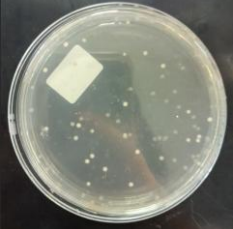
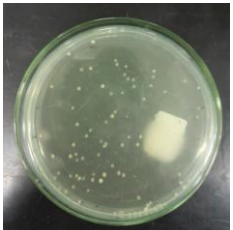
3.5 Identifikasi Morfologi Bakteri

3.5.1 Pengamatan Makroskopis Sel Bakteri pada Media PCA

Pengamatan makroskopis meliputi bentuk, tepim dan permukaan koloninya, yang menunjukkan bahwa koloni tersebut memiliki morfologi yang sesuai dengan spesiesnya. Hasil pengamatan keempat isolat yang ditampilkan dalam Tabel 7.

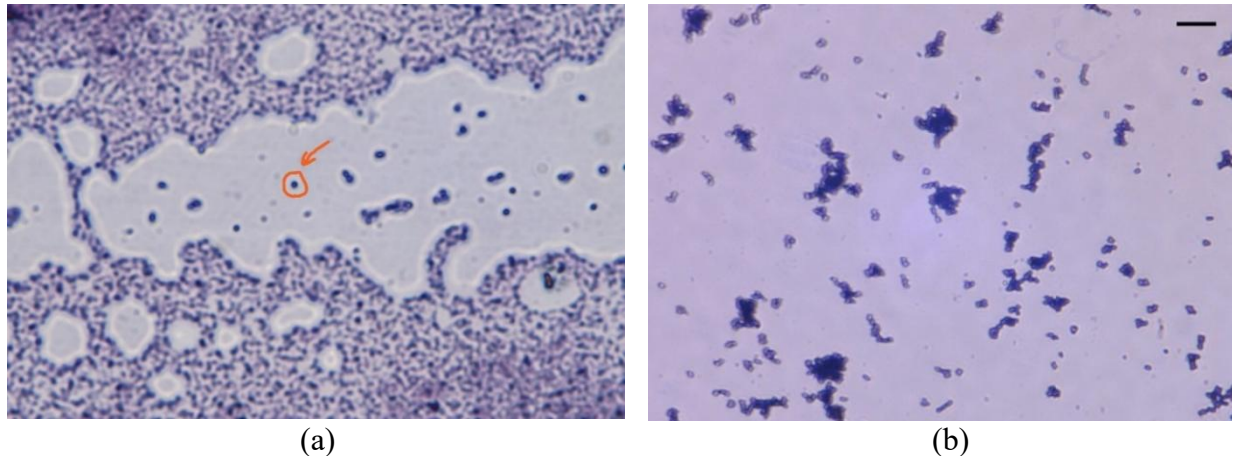
Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan Gum</i>	Gambar	Morfologi Koloni Bakteri			
			Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
<i>Arthobacter aureus</i>	2,5%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
	3%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>

Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan Gum</i>	Gambar	Morfologi Koloni Bakteri			
			Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%		kuning	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
	3%		kuning	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>
<i>Masilia abidiflava</i>	2,5%		kuning	<i>irregular</i>	<i>lobate</i>	<i>convex</i>
	3%		kuning	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>convex</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
	3%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>

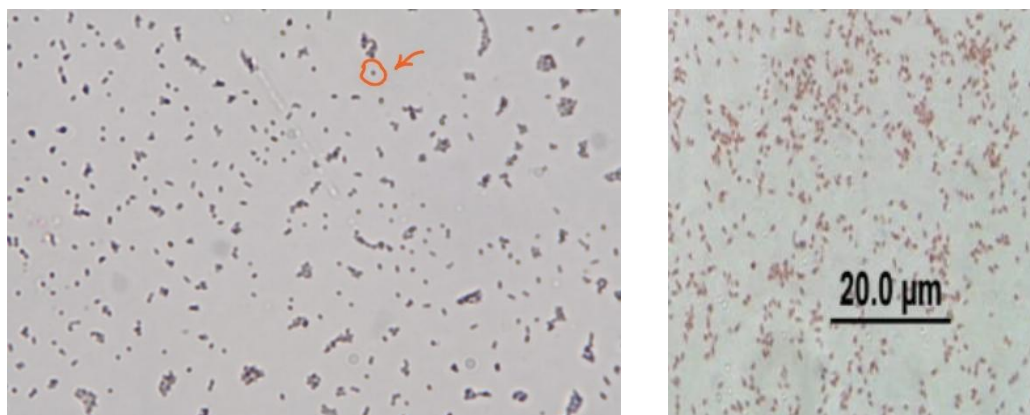
3.5.2 Pengamatan Mikroskopis Sel Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Pengamatan mikroskopis (Gambar 4) menunjukkan isolat BR-1 sebagai gram-positif berbentuk bulat (coccus), konsisten dengan fase stasioner *Arthrobacter*, meskipun secara taksonomi bakteri ini dikenal sebagai batang (rod) pendek hingga oval (Mages et al., 2008). Fenomena pleomorfik (transisi bentuk rod ke coccus) umum terjadi pada *Arthrobacter* seiring fase pertumbuhan, dan tidak mengubah status gram-nya. Morfologi koloni yang berbentuk circular, datar (flat), berwarna putih, dan tepi halus juga konsisten dengan karakteristik genus ini.



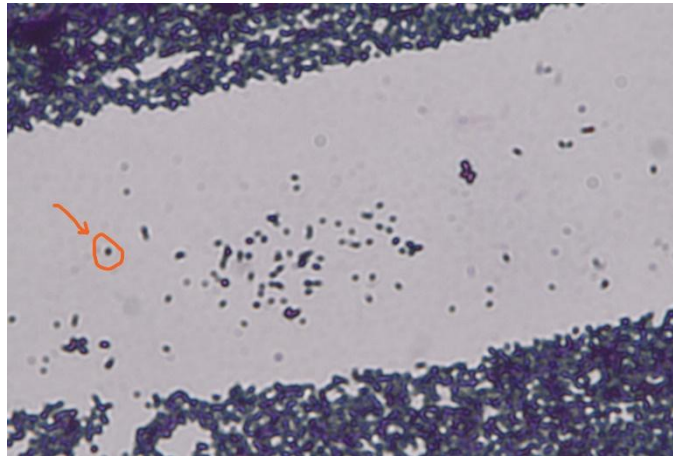
Gambar 4. Morfologi Sel Bakteri BR-1 (a) dan Literatur *Arthrobacter* sp, J Genomics (2019) (b)

Hasil pengamatan morfologi pada Gambar 5, *M. loti* menunjukkan jenis bakteri gram positif berbentuk batang/basil. Meskipun diklasifikasikan sebagai gram-negatif berbentuk batang, pengamatan menunjukkan morfologi sel nya gram-positif, menunjukkan kemungkinan adaptasi fisiologis atau variasi intraspecies yang mengubah struktur dinding sel (misalnya penebalan peptidoglikan) yang memengaruhi hasil pewarnaan. Dari hasil pengamatan sel beberapa literatur, sel nya berukuran sekitar $0,5\text{--}0,9\text{ }\mu\text{m} \times 1,2\text{--}3,0\text{ }\mu\text{m}$, berflagela peritrik yang menyebar diseluruh permukaan sel. Umumnya tumbuh relatif lambat dibandingkan bakteri non-simbion, serta tidak membentuk spora.



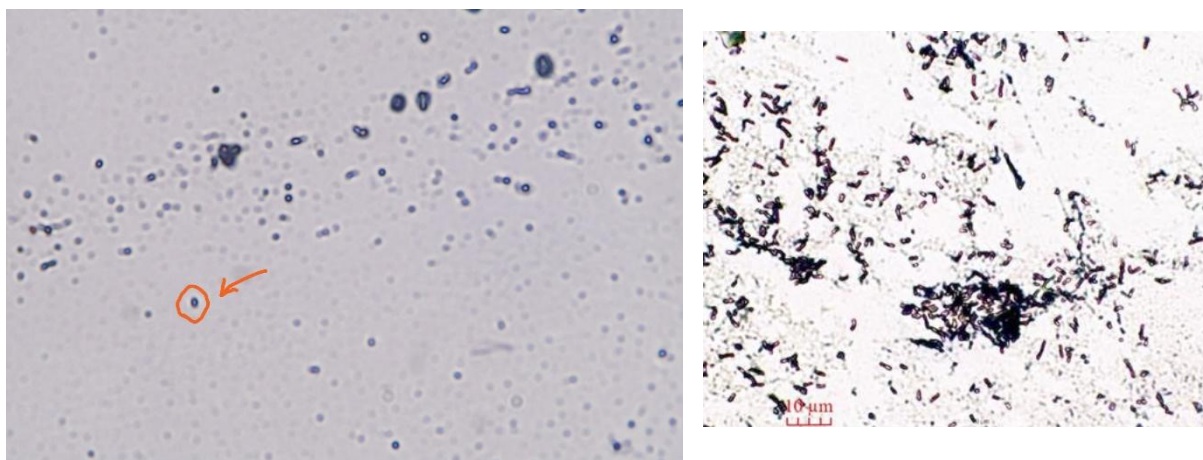
Gambar 5. Pengamatan Sel Bakteri BR-12 (a) dan literatur *Mesorhizobium loti*, Reeve et al., 2014 (b)

Identifikasi hasil pengamatan mikroskopis untuk bakteri BR-36 menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk bakteri gram positif dengan morfologi sel yang berbentuk rod/batang. Berdasarkan taksonominya morfologi *Massilia abidiflava* termasuk kedalam strain gram negatif dengan bentuk sel batang (*rod shape*), tidak membentuk spora, bermotil karena flagela peritrik. Ukuran sel nya diantara $1,8\text{--}2\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{--}3,5\text{ }\mu\text{m}$, berkoloni secara melingkar, cembung (*convex*), bertekstur kering dan buram (*opaque*), menunjukkan potensi bioaktif melalui produksi massiliamide (agen potent antibiosintesis tyrosinase) (Strain identifier, 2006).



Gambar 6. Pengamatan Sel Bakteri BR-36

Hasil pengamatan morfologi sel bakteri BRU-12 dapat dilihat pada Gambar 7, yang menunjukkan bakteri tersebut masuk kedalam jenis bakteri gram positif dengan bentuk sel basil dan agak memanjang. *Bradyrhizobium* termasuk kedalam kelompok *slow growing* rhizobia dibanding rhizobium biasa, dengan waktu generasi bisa lebih dari 8-10 jam. *Bradyrhizobium japonicum* termasuk gram negatif dengan bentuk batang (*rod-shape*), agak melengkung, berukuran sekitar $0.5\text{--}0.9\text{ }\mu\text{m} \times 1.2\text{--}3.0\text{ }\mu\text{m}$. mempunyai motil dengan flagella polar/subpolar, dan tidak membentuk spora (Strain identifier, 1999).



Gambar 7. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri BRU-12 (a) dan Literatur *Bradyrhizobium* sp. sumber: Jiraporn (2021) (b)

Hasil pewarnaan gram dapat bervariasi dari klasifikasi taksonomi bakteri akibat faktor fisiologis dan lingkungan. Beberapa genus bakteri, seperti *Arthrobacter*, memiliki dinding sel tebal dengan kandungan peptidoglikan tinggi, sehingga hasil pewarnaan gram menunjukkan karakter gram positif (Bertazzo et al, 2014). Namun, pada isolat seperti BR-12, BR-36, dan BRU-12 yang menurut taksonomi seharusnya gram negatif (Brenner et al., 1923), hasil pengamatan justru menunjukkan sifat gram positif. Fenomena ini dapat dijelaskan melalui beberapa faktor, antara lain perubahan fisiologis akibat adaptasi terhadap media penyimpanan yang memengaruhi komposisi lipid membran, variasi intraspesies yang menyebabkan perbedaan ketebalan dinding sel (Vandamme et al., 1996), serta adaptasi laboratorium jangka panjang yang dapat memicu penebalan peptidoglikan.

Fase pertumbuhan awal (fase lag) merupakan periode adaptasi kritis di mana bakteri mengalami transkripsi gen intensif, pembesaran sel, dan sintesis protein metabolik sebelum pembelahan (Rofle et al., 2012). Stres lingkungan pada fase ini dapat memicu perubahan struktural pada dinding sel, termasuk penebalan peptidoglikan atau penurunan permeabilitas membran luar pada bakteri gram negatif seperti *E. coli* dan *Salmonella*, sehingga kristal violet dapat tertahan lebih lama dan menghasilkan hasil gram positif semu. Studi menunjukkan bahwa paparan stres ringan, seperti kelaparan, pH rendah, atau tekanan osmotik, dapat memicu “memori fisiologis” jangka pendek yang meningkatkan ketahanan bakteri terhadap tekanan berikutnya tanpa mengubah sifat genetiknya (Wee et al., 2023). Oleh karena itu, variasi hasil pewarnaan gram tidak selalu merefleksikan perubahan permanen klasifikasi, tetapi dapat mencerminkan adaptasi struktural sementara pada dinding sel akibat kondisi lingkungan.

3.6 Aplikasi Media *Gellan Gum* dalam Bioteknologi Lingkungan

Gellan gum sebagai polisakarida alami yang mudah terurai (*biodegradable*) dan kemampuannya untuk dibentuk menjadi hydrogel yang dapat menyerap polutan, serta mendukung pertumbuhan mikroba secara protektif dan stabil menjadi pilihan ramah lingkungan dan berkelanjutan dalam bidang bioteknologi lingkungan (Muthukumar et al, 2019).

Aplikasi *gellan gum* dapat mengimobilisasi sel mikroorganisme dalam matriks hidrogelnya yang mempengaruhi kelangsungan hidup dan stabilitas mikroba pendegradasi polutan selama proses bioremediasi. Hydrogel *gellan gum* dapat digunakan untuk membersihkan lingkungan yang tercemar (bioremediasi) dengan system terkendali (Moyo et al, 2024). Nutrisi yang dibutuhkan mikroba untuk tumbuh/bahan kimia pendegradasi polutan dibungkus dengan matriks gel. Kemudian, *gellan gum* akan melepaskan bahan aktif ini secara perlahan dan bertahap di lokasi yang terkontaminasi. Pelepasan yang terkontrol ini mencegah pemborosan bahan dan memastikan proses remediasi berlangsung secara berkelanjutan. Sifatnya yang *mucoadhesive* (menempel) pada permukaan mukosa atau biologis dapat meningkatkan retensi hydrogel pada lingkungan tertentu, contohnya dalam system pengolahan air limbah.

Kombinasi dari sifat uniknya, seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan kemudahan modifikasi, menjadikan *gellan gum* sebagai bahan hijau yang prospektif. Nilai keberlanjutan yang dimiliki *gellan gum* dalam proses produksinya dari fermentasi mikroba berpotensi memanfaatkan limbah pertanian atau industry sebagai bahan baku. Stabilitasnya dalam kondisi asam, sangat cocok untuk aplikasi pada limbah industry dengan pH rendah (Liang et al. 2025).

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi *gellan gum* berpengaruh terhadap viabilitas bakteri setelah penyimpanan. Formulasi *Dilute Nutrient Broth* dengan *Gellan Gum* 3% mampu mempertahankan koloni viabel terbaik pada isolat *Arthrobacter aurencens* (BR-1), *Mesorhizobium loti* (BR-12), dan *Bradyrhizobium japonicum* (BRU-12), sedangkan pada isolat *Masilia abidiflava* (BR-36) konsentrasi optimal terdapat pada 2,5%. Hal ini mengindikasikan bahwa kebutuhan lingkungan fisik penyimpanan bersifat spesifik bagi tiap isolat. Sementara itu, hasil pewarnaan gram menunjukkan semua isolat teridentifikasi sebagai basil gram positif, yang sesuai dengan karakteristik *A. aurencens* tetapi berbeda dengan literatur terkait tiga isolat lainnya yang seharusnya gram negatif, sehingga kemungkinan dipengaruhi oleh perubahan morfologi dinding sel, atau kontaminasi selama kultur penyimpanan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Mbak Rina Isnikarita, S.Si., selaku laboran yang telah banyak memberikan arahan, ilmu, dan membimbing penulis saat melakukan penelitian.

REFERENSI

- Najmiyati, E., & Akhadi, D. D. H. (2013). Viabilitas dan Kinerja Konsorsium Mikroba Pendegradasi Hidrokarbon setelah Penyimpanan dalam Pendingin dan Penyimpanan Beku. *Jurnal Ecolab*, 6(2), 81 – 89. <https://doi.org/10.20886/jklh.2012.6.2.81-89>
- McDaniel, L. E., & Bailey, E. G. (1968). Liquid Nitrogen Preservation of Standard Inoculum: Gas-Phase Storage. *Applied Microbiology*, 16(6), 912-916. <https://doi.org/10.1128/am.16.6.912-916.1968>
- Abdl Aali, R. A. K., & Al-Sahlan, S. T. G. (2024). Gellan Gum as a Unique Microbial Polysaccharide: Its Characteristics, Synthesis, and Current Application Trends. *Gels*, 10(3), 183. <https://doi.org/10.3390/gels10030183>
- Nasrollahzadeh, M., Soleimani, F., Bidgoli, N. S. S., Shafiei, N., Nezafat, Z., Baran, T. (2021). Biopolymer-Based Metal Nanoparticle Chemistry for Sustainable Applications: Chapter 6- Biological applications of biopolymer-based (nano)materials. *Elsevier*, 333-419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89970-3.00006-8>
- Mac, N., et al. (2017). Evaluation of gellan gum as an alternative gelling agent for bacterial culture media. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.00>
- Sangkoy, W. J., Simbala, H. E. I., Rumondor, E. M. (2023). Anti Bacterial Activity of Ethanol Extract of Areca Vestitaria Leaves (*Areca vestiaria*) Against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, And *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria. *Pharmakon Universitas Sam Ratulangi*, 12(1), 133-139.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., & Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 68(5), 2391–2396.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2391-2396.2002>
- Usman, Hamidu & Osuji, J. C., (2007). Phytochemical and In Vitro Antimicrobial Assay of The Leaf Extract of *Newbouldia laevis*. *The African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 4(4), 476–480. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v4i4.31240>
- Dedy E, M., Idjudin, A. A., & Sutono, S. (2012). Teknologi Peningkatan Produktivitas Lahan Endapan Vulkanik Pasca Erupsi Gunung Merapi. *Teknologi Peningkatan Produktivitas Lahan Endapan Vulkanik Pasca Erupsi Gunung Merapi*, 6(1), 33–44.
- Prakasa, B.P. (2024). Dampak Jangka Panjang Letusan Gunung Merapi: Analisis Keragaman Bakteri pada Vulkanik Deposit Berusia 13 Tahun. *DSPACE Universitas Islam Indonesia*.
- Septiani, W. N. (2019). Optimasi Produksi Enzim Selulase Ekstrak Kasar oleh Isolat Bakteri Selulolitik R3-1 dari Saluran Pencernaan Rayap *Cryptotermes* sp. Menggunakan Media Serbuk Jerami Padi (*Oryza sativa*, Linn.). *Repository Universitas Pendidikan Indonesia*.
- Lay, B. W. (1994). Analisis Mikroba di Laboratorium. *Jakarta: PT Raja Grafindo Persada*.
- Yusmaniar., Wardariyah, dan N. Khairun. 2017. Mikrobiologi dan Parasitologi. Bahan Ajar Farmasi. Jakarta
- Madigan, et. al., 2018. Brock Biology of Microorganisms 5th Edition. *New York: Pearson*.
- Fatayati, I., et al. (2023). Gambaran cemaran mikroba terhadap masa simpan dan kebersihan penyimpanan telur ayam ras. *Sentri: Jurnal Riset Ilmiah*, 2(5), 1674–1683.
- Trimawartinah. (2020). Bahan Ajar Statistik Non Parametrik. Universitas Muhammadiyah Prof DR HAMKA.
- Heryana, A. (2020). Uji Statistik Non Parametrik. Jakarta: Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33332.48000>
- Yanti, T. S. (2007). Uji Rank Mann-Whitney Dua Tahap. *Statistika*, 7(1), 55–60.
- Sumardi., & Untara, B. (2020). Shaking Water Bath Berbasis Mikrokontroler Atmega 16. *Medika Teknika: Jurnal Teknik Elektromedik Indonesia*, 2(1). 27–39. <https://doi.org/10.18196/mt.020114>
- Nair, R. K. F., Morris, K. A., Hertel, M., Luo, Y., Moreno, G., Reichstein, M., Schruppf, M., and Migliavacca, M.: N : P stoichiometry and habitat effects on Mediterranean savanna seasonal root dynamics. *Biogeosciences*, 16, 1883–1901, <https://doi.org/10.5194/bg-16-1883-2019>
- Rygaard, A. M., Schmidt Thøgersen, M., Nielsen, K. F., Gram, L., & Bentzon-Tilia, M. (2017). Effects of gelling agent and extracellular signaling molecules on the culturability of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), e00117–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00117-17>
- Haastuti, U. S. (2008). Petunjuk praktikum mikrobiologi. Universitas Negeri Malang.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (2006). Dasar-dasar mikrobiologi (Vol. II). Penerbit Universitas Indonesia (UI Press).
- Dwidjoseputro, D. (2005). Dasar-dasar mikrobiologi. *Djambatan*. Jakarta
- Jones, D., & Keddle, R. M. (2006). The Genus *Arthrobacter*. *The Prokaryotes*, 945–960. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_36
- Zhang, Junjie & Lou, Kai & Jin, Xiang & Mao, Pei & Wang, En & Tian, Chang Fu & Sui, Xinhua & Chen, Wen Feng & Chen, Wen. (2011). Distinctive *Mesorhizobium* populations

- associated with *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant and Soil*, 353. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1014-5>.
- Brinke, M., Heininger, P., & Traunsperger, W. (2011). A semi-fluid gellan gum medium improves nematode toxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 1824–1831. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.007>
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Zala, B. S., & Khutliwala, T. A. (2013). An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.030>
- Lee, C. H., Kim, H. T., Yun, E. J., Lee, A. R., Kim, S. R., Kim, J. H., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2014). A novel agarolytic β -galactosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5965–5973. <https://doi.org/10.1128/AEM.01577-14>
- Mages, I. S., Frodl, R., Bernard, K. A., Funke, G. (2008). Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-Like Bacteria Encountered in Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9). 2980-2986. <https://doi.org/10.1128/jcm.00658-08>
- J Genomics. (2019). Stereo micrograph of *Arthrobacter* sp. strain MN05-02 (x2000 magnification). Scale bar (upper-right) is 10 μ m. <https://doi.org/10.7150/jgen.32194>
- Reeve, W., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Bräu, L., Davenport, K., Goodwin, L., Chain, P., Woyke, T., Lobos, E., Huntemann, M., Pati, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., & Kyrpides, N. (2014). Genome sequence of the *Lotus corniculatus* microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R88B. *Standards in genomic sciences*. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-3>
- Strain Identifier. DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures.
- Dechjiraratthanasiri, C & Santasup, C & Boonmee, P & Inthasan, J. (2021). Identification and characterization of native rhizobia from three mungbean varieties. *Malaysian Journal of Microbiology*, 17(2), 121-129. <https://doi.org/10.21161/mjm.200820>
- Stackebrandt, Erko & Schumann, Peter. (2014). The Family Dermacoccaceae. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 301-315. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_178
- Bertazzo, M., Del Carmen Montero-Calasanz, M., Martinez-Garcia, M., Spröer, C., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Klenk, H., & Fiedler, H. (2014). *Geodermatophilus brasiliensis* sp. nov., isolated from Brazilian soil. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_8), 2841–2848. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062844-0>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (1923). Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 2: the Proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria. *Springer Science & Business Media*.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407–438. <https://doi.org/10.1128/mr.60.2.407-438.1996>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>

- Wee, R. W. S., Mishchanchuk, K., AlSubaie, R., Church, T. W., Gold, M. G., & MacAskill, A. F. (2023). Internal-state-dependent control of feeding behavior via hippocampal ghrelin signaling. *Neuron*, 112(2), 288–305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.10.016>
- Muthukumar, T., Song, J. E., & Khang, G. (2019). Biological Role of Gellan Gum in Improving Scaffold Drug Delivery, Cell Adhesion Properties for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 24(24), 4514. <https://doi.org/10.3390/molecules24244514>
- Liang, J., Nie, Y., Ren, X., Li, R., Xiong, Z., Ai, L., & Tian, Y. (2025). Gellan gum biosynthesis in microorganisms: Current status and future directions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(22), 13195–13211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c02818>
- Moyo, M. T. G., Adali, T., & Tulay, P. (2024). Exploring gellan gum-based hydrogels for regenerating human embryonic stem cells in age-related macular degeneration therapy: A literature review. *Regenerative Therapy*, 26, 235–250. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.05.018>