

APLIKASI MEMBRAN DALAM PEMEKATAN ENZIM GLUKOAMILASE

Syahril A.* , Nana S.** , L.Z. Udin* , A. Sidik** ,
dan A. T. Karossi*

* Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jalan Cisitu, Bandung

** FMIPA, Jurusan Kimia-UNPAD, Bandung

INTISARI

Pembuatan enzim glukoamilase dengan bahan dasar tepung sagu dan bungkil kedele sudah dilakukan secara fermentasi curah. Pemekatan enzim dilakukan dengan menggunakan proses ultrafiltrasi, dimana membran polisulfon digunakan sebagai media penyaring. Membran yang digunakan dalam percobaan ini dibuat dari bahan polisulfon dengan beberapa macam perlakuan, seperti temperatur pengkoagulasian dan komposisi, disamping itu juga diamati pengaruh pelarut serta aditif yang berbeda. Dari hasil pengamatan selama proses fermentasi dalam pembuatan enzim, ternyata pH larutan berubah-ubah selama berlangsungnya proses fermentasi mulai hari pertama sampai hari ke sepuluh, namun secara menyeluruh dapat dikatakan bahwa pH akan naik dengan bertambahnya waktu fermentasi. Aktifitas enzim tertinggi terlihat pada hari fermentasi ke 6 yaitu sebesar 2,908 U/ml, dan pada hari berikutnya terjadi penurunan. Kadar protein yang didapat berfluktuasi dari hari kehari tetapi harga terbesar diperoleh pada hari ke 10 yaitu 3,102 mg/ml. Aktifitas enzim spesifik yang tertinggi terlihat pada hari ke 6 yaitu sebesar 1495,8 U/g protein. Membran yang terbaik untuk pemekatan enzim secara ultrafiltrasi adalah yang dibuat dengan menggunakan pelarut dimetilasetamid dan aditif polivinilpirrolidon dengan koefisien rejeksi diatas 90 % dan harga fluks sebesar 20,57 l/m².jam.

ABSTRACT

Preparation of glucoamylase enzyme by fermentation of sago and soy bean meals had been done. Enzyme concentration was carried out by ultrafiltration process, where polysulfone membranes were used as medium filter. Membranes used in this experiment were prepared with several treatments, such as coagulation temperature and composition and beside that effect of solvent and additive are also observed. From the results of the observation during fermentation process in enzyme preparation, it is clear that pH of solution changed in that pH increased with increasing fermentation time. The highest enzyme activity was shown on the sixth day of fermentation namely 2.908 U/ml with a specific enzyme activity of 1495.8 U/g protein. There is fluctuation in protein content during fermentation process, but the highest level was obtained on the tenth day fermentation (3.102 mg/l). The highest specific enzyme activity was shown on the sixth day fermentation (1495.8 U/g protein). The best membrane for the enzyme concentration by ultrafiltration process in this experiment are found from the membrane prepared from dimethyl acetamide as solvent and polyvinylpyrrolidone as additive. This membrane gave rejection coefficient of more than 90 % and flux as much as 20.57 l/m².hour.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan produk hasil olahan fermentasi yang penggunaannya saat ini sangat bervariasi baik dalam pengolahan makanan maupun untuk keperluan lainnya. Misalnya dalam pengolahan makanan dipakai pada pembuatan keju, saus, roti, selain itu enzim juga digunakan dalam industri tekstil, kulit dan detergen (1). Dalam pengolahan bahan makanan enzim dapat digunakan sebagai katalis untuk memperoleh makanan yang rendah kalori, lemak, serta kolesterol (2), dan disamping itu enzim juga berfungsi untuk memperpanjang masa simpan makanan tertentu (3). Enzim yang baru diperoleh dari hasil fermentasi ini masih merupakan enzim kasar yang banyak mengandung senyawa-

senyawa yang bermolekul rendah yang tidak diperlukan, seperti garam-garam atau senyawa lain (4,5). Faktor yang mempengaruhi biaya produksi enzim antara lain ditentukan oleh cara yang digunakan dalam memproses enzim tersebut dan tingkat kemurnian enzim yang diinginkan (6). Penggunaan membran untuk maksud pemekatan dan pemurnian hasil olahan fermentasi ini sudah dimulai sejak tahun 1970 yaitu dengan menggunakan sistem ultrafiltrasi (7). Banyak cara untuk pemisahan senyawa yang berat molekulnya rendah dengan senyawa yang berat molekulnya lebih tinggi, tetapi sekarang cara ultrafiltrasi menempati urutan pertama karena tidak merusak senyawa yang ada didalamnya (7). Proses ultrafiltrasi dapat digunakan untuk sterilisasi (8,9) dan pemekatan polisakarida hasil fermentasi karbohidrat (10).

Menurut Sullivan (4), enzim mempunyai berat molekul yang berkisar antara 20.000 sampai dengan 200.000 dalton, sedangkan membran ultrafiltrasi mempunyai ukuran "molecular weight cut-off" (MWCO) antara 10.000 sampai dengan 300.000 dalton dan membran dengan ukuran MWCO 10.000 yakni membran yang mempunyai koefisien rejeksi terhadap senyawa yang bermolekul 10.000 sebesar 90 % atau lebih, cocok digunakan dalam pemekatan enzim.

Percobaan ini bertujuan untuk mencari kondisi optimum dalam pembuatan enzim glukoamilase, dan membuat membran yang sesuai untuk proses pemekatannya. Kegiatan dibagi tiga tahap yaitu tahap pertama pembuatan enzim, tahap kedua pembuatan dan karakterisasi membran dan tahap ke tiga pemekatan enzim dengan proses ultrafiltrasi. Parameter yang diamati pada pembuatan enzim diantaranya yaitu, perubahan pH serta aktifitas enzim selama berlangsungnya proses fermentasi. Dalam percobaan proses ultrafiltrasi dipilih membran yang tepat dalam proses pemekatan enzim tersebut ditinjau dari fluks dan koefisien rejeksinya. Pengujian koefisien rejeksi membran dilakukan dengan beberapa macam larutan dekstran yang berbeda berat molekulnya dan larutan Bovin Serum Albumin (BSA).

BAHAN DAN PERALATAN

Bahan untuk pembuatan enzim

Pati sagu jenis metroxylon dan tepung bungkil kedele diperoleh dari pasar Bandung. K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, KCl, FeSO₄.7H₂O dan aquades. Kapang *Rhizopus oryzae* yang ditanamkan dalam potato dekstrose agar digunakan sebagai inokulum pada proses fermentasi.

Bahan untuk pembuatan membran

Membran dibuat dengan bahan dasar polimer polisulfon (PS) Udel (Aldrich) dengan berat molekul (BM) 30.000, pelarut dimetilformamid (DMF) (Merck) dan pelarut dimetilasetamid (DMAc). Sebagai aditif digunakan polietilenglikol (PEG) atau polivinilpirrolidon (PVP). Bahan untuk karakterisasi membran yaitu dekstran dengan BM 38.900, 66.700, 87.000, 162.000 dan 266.000 dan disamping itu juga digunakan BSA. Semua bahan yang digunakan adalah murni (p.a.).

Peralatan yang digunakan

Enzim dibuat dalam fermentor (LKB) yang berkapasitas 4 L secara sistem curah. Untuk pembuatan membran dibutuhkan erlemeyer, neraca analitik, plat kaca, batang stainless steel, dan bak koagulasi. Untuk karakterisasi membran diperlukan peralatan kompresor, stirred sel (Amicon) model 8200, spektrofotometer dan alat-alat gelas lainnya.

PERCOBAAN

Pembuatan enzim

Media fermentasi dalam pembuatan glukoamilase ini terdiri dari (g/l) ; tepung sagu 20; tepung bungkil kedele 7,07; malt ekstrak 3% 30 (ml); KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; KCl 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01. pH media diatur sehingga mencapai 4,5. Setelah disterilisasi, media diinokulasi pada suhu $30 \pm 1^\circ\text{C}$, dan aerasi 4,5 - 6 L/menit. Agitasi dilakukan dengan Corning Hot Plate Stirrer pada skala 6. Percobaan dilakukan pada skala fermentor 4 L. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan pH media selama fermentasi berlangsung, aktifitas glukoamilase yang dihasilkan, pati tersisa dalam media fermentasi dan biomassa pada akhir fermentasi.

Analisa

Aktifitas glukoamilase ditentukan dengan menggunakan metoda Ueda (11) yang telah dimodifikasi. Unit aktifitas ditentukan setelah membandingkan dengan glukoamilase standar (SIGMA). Kandungan protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry (12), digunakan untuk mendapatkan aktifitas spesifik enzim. Pati tersisa dalam media ditentukan berdasarkan metoda Nelson-Somogy setelah dihidrolisa oleh asam (13). Pengukuran biomassa dilakukan secara gravimetri setelah pencucian oleh air dan penyimpanan pada 70°C (14).

Pembuatan membran

Membran dibuat dengan cara sebagai berikut :

- I. Polimer polisulfon dan aditif poli etilen glikol dilarutkan dalam dimetil formamida dengan komposisi:
 - a. 12 % PS, 88 % DMF
 - b. 12 % PS, 85 % DMF dan 3,0 % PEG.
 - c. 15 % PS, 80 % DMF dan 4,5 % PEG.

Semua membran dikoagulasikan dalam air pada temperatur kamar ($\pm 26^\circ\text{C}$).

- II. Polimer polisulfon dan aditif polivinilpirolidon dilarutkan dalam dimetil asetamid dengan komposisi: 16,75 % PS, 81,5 % DMAc dan 1,68 % PVP. yang dikoagulasikan dalam air pada temperatur kamar (25°C), temperatur 40°C dan dalam air es (sekitar 5°C).

Polimer dilarutkan selama semalam sambil diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dan dibiarkan semalam sebelum dicetak. Pembentukan film dilakukan diatas plat kaca dengan bantuan batang stainless steel. Lapisan film yang terbentuk dikoagulasikan dalam air sesuai dengan temperatur yang diamati (pada percobaan ini yaitu 5, 25 dan 40°C). Membran yang didapat diredam dalam air untuk menyempurnakan koagulasi selama lebih kurang 15 jam dan kemudian membran siap untuk dites dengan larutan dekstran dan albumin.

Pengujian membran

Membran diuji dengan menggunakan stirred sel (Amicon) dengan luas permukaan efektif membran $28,7 \text{ cm}^2$ dan volume 200 ml. Pengujian dilakukan terhadap larutan dekstran yang berbeda berat molekulnya dan juga terhadap larutan BSA. Parameter yang diamati adalah besarnya fluks air, fluks larutan dekstran, fluks larutan BSA dan besarnya koefisien rejeksi dari kedua jenis larutan tersebut. Untuk mengetahui besarnya koefisien rejeksi dari membran, maka pada setiap permeat dan retentat dianalisa kandungan protein atau kadar gula dengan alat spektrofotometer. Membran yang dianggap baik, digunakan untuk pemekatan enzim glukoamilase. Kondisi operasi seperti temperatur dan tekanan, diatur sesuai dengan percobaan yang akan diamati. Pada percobaan ini temperatur operasi yang diamati yaitu 10, 15, 20 dan 25°C ; sedangkan tekanan operasi berkisar dari 1 sampai dengan 4 kg/cm^2 .

Besarnya fluks dihitung berdasarkan jumlah permeat yang dihasilkan persatuan luas membran dalam satuan waktu tertentu setelah tercapainya keadaan mantap (steady state), sedangkan koefisien rejeksi dihitung berdasarkan rumus :

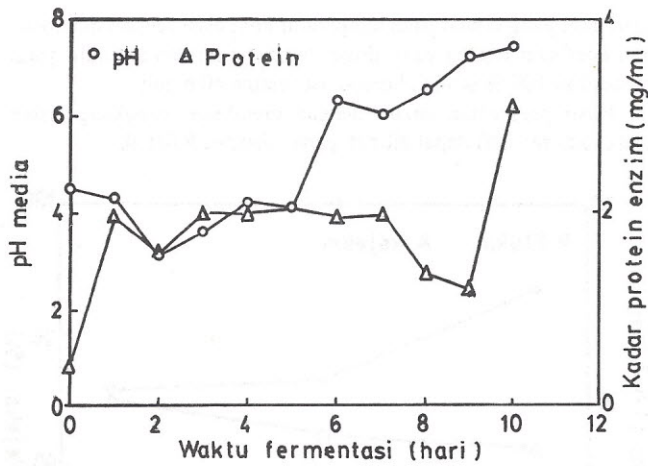
$$R = \frac{C_r - C_p}{C_r} \times 100 \%$$

dimana :

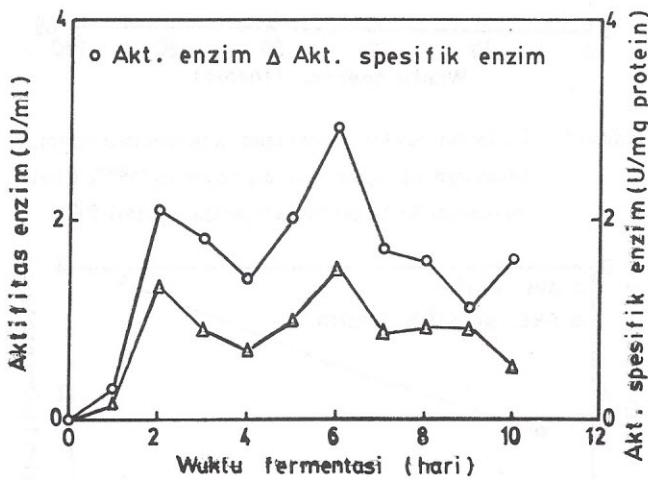
- R = koefisien rejeksi (%)
- C_p = konsentrasi zat terlarut dalam permeat
- C_r = konsentrasi zat terlarut dalam retentat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Gambar 1 dan 2 dapat dilihat perubahan yang terjadi selama berlangsungnya proses fermentasi pembuatan enzim mulai hari pertama sampai dengan hari ke 10. Pada kurva ini terlihat adanya perubahan pH selama proses fermentasi, dimana pada saat awal terjadi penurunan sampai hari ke 3, sedangkan pada hari selanjutnya terjadi kenaikan. Ini disebabkan karena pada tahap awal hasil utama dari metabolisme kapang adalah senyawa-



Gambar 1. Perubahan pH media dan kadar protein glukamilase *R. oryzae* selama proses fermentasi

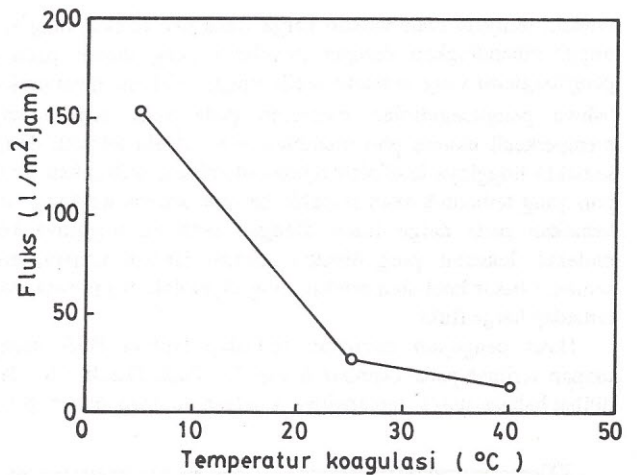


Gambar 2. Aktifitas dan aktifitas spesifik glukamilase *R. oryzae*.

senyawa asam, kemudian asam ini digunakan oleh kapang untuk pertumbuhan sehingga pH naik kembali. Aktivitas enzim yang didapat berfluktuasi mulai hari pertama sampai hari ke-10, dimana aktivitas enzim tertinggi didapat pada hari ke-6 yaitu sebesar 2,908 U/ml. Aktivitas spesifik enzim pada hari ke-6 memperlihatkan angka yang tertinggi, yaitu sebesar 1,4958 U/mg dengan biomassa sebesar 3,6 g/L (berat kering). Kandungan protein tertinggi diperoleh pada hari ke-10 yaitu sebesar 3,102 mg/ml.

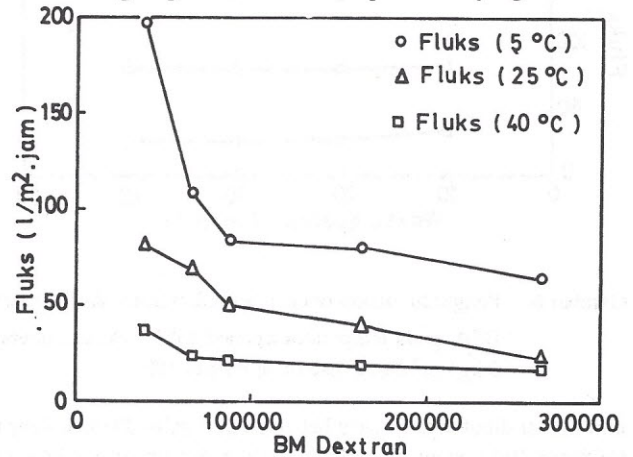
Hasil pengujian membran yang dibuat dengan pelarut DMF dan aditif PEG mempunyai harga koefisien rejeksi yang rendah sekali dan harga fluks yang besar. Ini disebabkan karena membran yang dibuat dengan pelarut ini menghasilkan membran yang berpori lebih besar sehingga tidak cocok digunakan untuk pemekatan enzim. Oleh sebab itu untuk pengerjaan selanjutnya dalam pemekatan enzim hanya dilakukan untuk membran yang dibuat dengan pelarut DMAc dan aditif PVP, karena membran ini memberikan koefisien rejeksi yang cukup tinggi terhadap larutan BSA dan dekstran yang dipakai.

Pada Gambar 3 dapat dilihat fluks air dari membran yang dibuat pada temperatur koagulasi yang berbeda. Ternyata semakin rendah suhu air pengkoagulasi, maka akan semakin besar harga fluks yang diperoleh. Ini menunjukkan jumlah pori membran yang terbentuk lebih banyak disaat pengkoagulasian pada temperatur rendah dengan ukuran pori yang lebih halus.

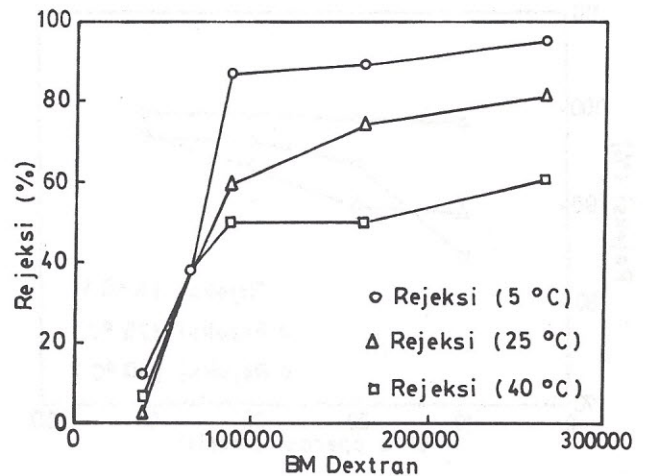


Gambar 3. Pengaruh temperatur koagulasi terhadap fluks air membran, pada tekanan operasi 3 kg/cm² dan temperatur operasi 25°C.

Pada Gambar 4 dan 5 dapat dilihat hubungan antara fluks dan rejeksi membran terhadap berbagai ukuran berat molekul larutan dekstran. Pengkoagulasian membran pada air yang bersuhu



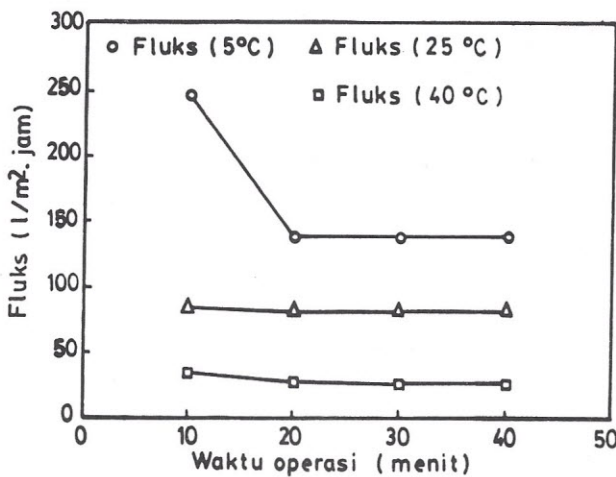
Gambar 4. Pengaruh berat molekul dextran terhadap fluks, pada tekanan operasi 3 kg/cm², temperatur operasi 25°C, konsentrasi umpan 1%.



Gambar 5. Pengaruh berat molekul dextran terhadap rejeksi, pada tekanan operasi 3 kg/cm², temperatur operasi 25°C, konsentrasi umpan 1%.

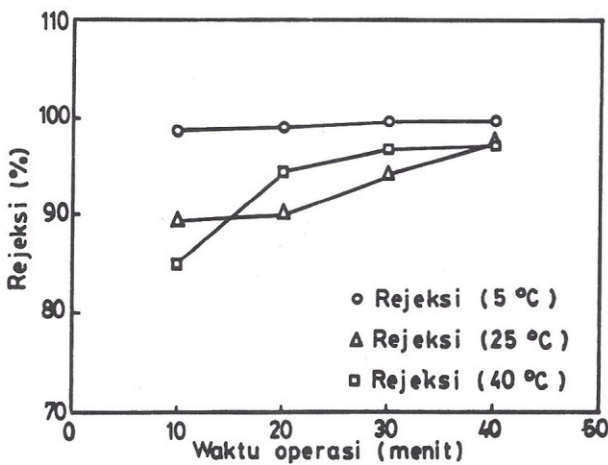
rendah, ternyata memberikan harga fluks dan rejeksi yang lebih tinggi dibandingkan dengan membran yang dibuat pada air pengkoagulasi yang bersuhu lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pengkoagulasian membran pada suhu rendah dapat memperkecil ukuran pori membran tersebut, ini terbukti dengan semakin tingginya koefisien rejeksi membran, sedangkan jumlah pori yang terbentuk akan semakin banyak, karena terlihat adanya kenaikan pada harga fluks. Dengan semakin tingginya berat molekul dekstran yang dipakai sebagai larutan umpan, maka semakin besar koefisien rejeksi yang diperoleh, tetapi sebaliknya terhadap harga fluks.

Hasil pengujian membran terhadap larutan BSA sebagai umpan terlihat pada Gambar 6 dan 7. Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa untuk tercapainya keadaan mantap dalam proses



Gambar 6. Pengaruh waktu operasi terhadap fluks dari larutan BSA, pada temperatur operasi 25°C, tekanan operasi 3 kg/cm² dan konsentrasi umpan 1%.

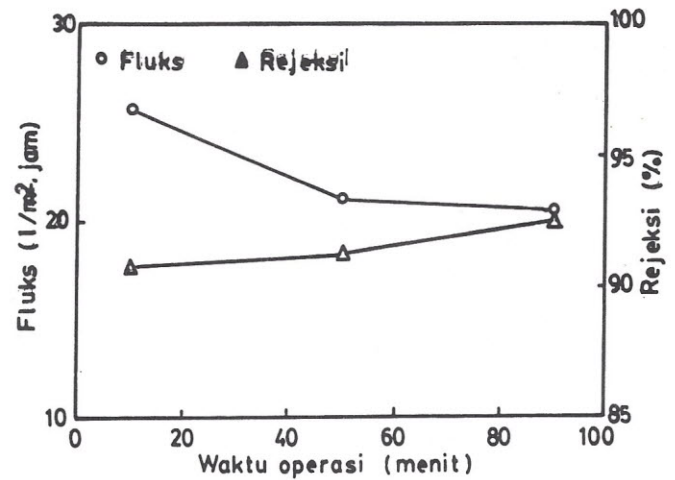
ultrafiltrasi dibutuhkan waktu beberapa saat yaitu ditandai dengan stabilnya fluks yang dihasilkan. Dalam percobaan ini keadaan mantap tersebut dicapai setelah proses ultrafiltrasi berjalan selama lebih kurang 20 menit. Gambar 7 memperlihatkan bahwa



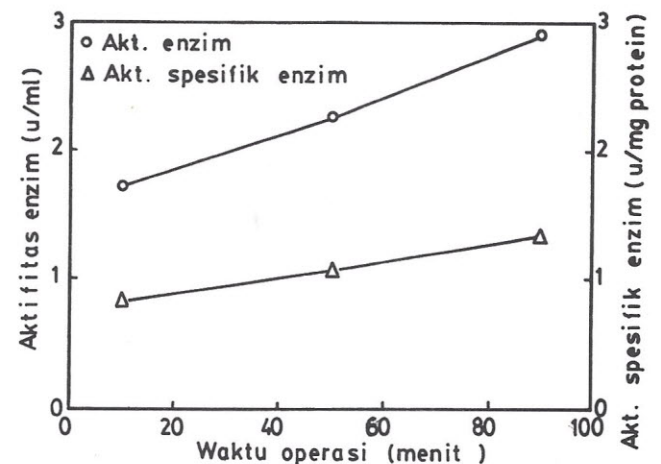
Gambar 7. Pengaruh waktu operasi terhadap rejeksi dari larutan BSA, pada temperatur operasi 25°C, tekanan operasi 3 kg/cm² dan konsentrasi umpan 1%.

membran yang dibuat pada temperatur koagulasi rendah memberikan koefisien rejeksi yang tinggi terhadap larutan albumin yaitu mendekati 100 % setelah beroperasi selama 40 menit.

Hasil pemekatan enzim dengan membran (pengkoagulasian pada suhu rendah) dapat dilihat pada Gambar 8 dan 9.



Gambar 8. Fluks dan rejeksi selama operasi pemekatan enzim. Membran dikoagulasikan dalam air es (5°C), tekanan operasi 3 kg/cm² dan temperatur operasi 10°C.



Gambar 9. Pengaruh waktu operasi terhadap aktifitas enzim dalam pemekatan enzim. Membran dikoagulasikan dalam air es (5°C), tekanan operasi 3 kg/cm² dan temperatur operasi 10°C.

Terlihat adanya sedikit penurunan fluks sampai pengoperasian 90 menit, sedangkan kandungan protein dalam retentat meningkat. Aktivitas enzim dan aktivitas enzim spesifik terus bertambah selama berlangsungnya proses ultrafiltrasi. Ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim masih dapat ditingkatkan sampai didapatkan kondisi optimum dimana aktivitas enzim tidak bertambah lagi dengan bertambahnya waktu operasi.

Pada Tabel 1 terlihat pengaruh temperatur operasi terhadap pemekatan enzim. Dengan semakin naiknya temperatur operasi maka akan terjadi penurunan aktivitas enzim dan aktivitas enzim spesifik, sedangkan koefisien rejeksinya akan terus naik. Hal ini menunjukkan bahwa operasi pada temperatur tinggi akan

menimbulkan kerusakan pada enzim, sedangkan kenaikan koefisien rejeksi mungkin disebabkan terjadinya perubahan sifat dari protein dalam enzim tersebut setelah enzim mulai rusak, seperti denaturasi atau penggumpalan protein yang dapat membentuk lapisan pada permukaan membran.

Pengaruh tekanan operasi terhadap hasil pemekatan enzim dengan proses ultrafiltrasi ini dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh temperatur operasi terhadap pemekatan enzim secara ultrafiltrasi.

Temp. (°C)	Fluks (l/m ² .jam)	Koefisien rejeksi (%)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
5	10,74	82,50	3,3796	1,1305
15	20,14	83,55	3,1185	1,5490
20	20,14	91,54	1,6731	0,7777
25	48,07	90,30	1,5000	0,6521

Catatan :

Tekanan tetap 1 kg/cm²

Aktivitas enzim awal 1,2093 U/ml

Faktor pemekatan 10 x

Tabel 2. Pengaruh tekanan operasi terhadap hasil pemekatan enzim.

Tekanan kg/cm ²	Fluks (l/m ² .jam)	Koefisien rejeksi (%)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1	48,07	92,3	6,513	2,33
2	73,84	90,3	6,410	2,27
3	83,51	92,6	6,304	1,68
4	93,32	92,8	5,995	1,62

Catatan :

Faktor pemekatan 10 x

Aktivitas enzim awal 2,07 U/ml

Temperatur operasi = temperatur kamar.

Kenaikan tekanan operasi dalam proses ultrafiltrasi ternyata dapat meningkatkan fluks sedangkan terhadap koefisien rejeksi tidak begitu berpengaruh, tetapi aktivitas enzim terlihat menurun pada tekanan operasi 4 kg/cm², setelah memperlihatkan harga konstan sampai tekanan 3 kg/cm². Aktivitas enzim spesifik terlihat menurun pada tekanan operasi 3 dan 4 kg/cm². Tekanan yang terlalu tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim maupun aktivitas spesifik enzim itu sendiri.

KESIMPULAN

Dari beberapa membran yang dicoba untuk pemekatan enzim ternyata membran yang dibuat dengan komposisi 16,75 % PS, 81,57 % DMAc dan 1,68 % PVP memberikan hasil yang terbaik untuk pemekatan enzim. Temperatur koagulasi yang terbaik yaitu

sekitar 5°C. Proses ultrafiltrasi sebaiknya dilakukan pada temperatur serendah mungkin, karena pada temperatur yang tinggi terjadi penurunan aktifitas dari enzim tersebut. Tekanan operasi sebesar 2 kg/cm² cocok untuk pemekatan enzim dilihat dari harga fluks yang cukup besar, begitu juga terhadap harga aktifitas enzim dan koefisien rejeksinya. Pemekatan enzim yang dilakukan dalam percobaan ini merupakan proses ultrafiltrasi secara sistem batch dan proses ini dapat meningkatkan aktifitas enzim lebih dari 3 kali aktifitas enzim awal dengan faktor pemekatan 10 kali.

DAFTAR PUSTAKA

- J.D. Dziezak, *Enzymes : Catalysts for Food Processes. Food Tech.* pp. 78 - 85 (1991).
- A. Gross, *Enzymatic Catalysis in the Production of Novel Food Ingredients, Food Tech.* pp. 96 - 99 (1991).
- H.K. Nielsen, *Novel Bacteriolytic Enzymes and Cyclodextrin Glycosyl Transferase for the Food Industry. Food Tech.* pp. 102 - 104 (1991).
- T.J.O. Sullivan; A.C. Epstein; S.R. Korchin and N.C. Beaton. *Applications of Ultrafiltration in Biotechnology, CEP.*, p. 68 - 75 (1984).
- S.L. Neidleman, *Enzymes in the Food Industry; A Backward glance. Food Tech.* pp. 88 - 91 (1991)
- S.C. Penet, *New Applications of Industrial Food Enzymology: Economic and Processes. J. Food Tech.* Vol 45 (1) p: 89-99 (1991).
- O.J. Olsen, *Membrane Filtration as a Tool in Biotechnical Down-stream Processing. Desalination*, 62, pp. 329-339 (1986).
- G.A. Truskey; R. Gabler; A. Doleo and T. Manter. *The Effect of Membrane Filtration upon Protein Conformation. J. Parenteral Science and Technology*, 41(6), pp. 180-183 (1987).
- M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology.* Kluwer Academic Publishers, London. p. 9 (1991).
- A. Pat; R. Welkins, and R. Gabler, *Sterile Filtration under Condition of High Pressure and Bacterial Challenge Levels. J. Parenteral Science and Technology*, 41(4), pp. 117-120 (1987).
- S. Ueda; T. Fukuoda; Mitsue and B.C. Saha. *Glucoamylase Produced by Submerged Culture of A. oryzae. Starke.* 31(9). pp. 307 - 314 (1979).
- S.P. Colowick and H.O. Kaplan. *Methods in Enzymology* Vol. 3 Acad. Press Inc. New York (1957).
- N. Nelson. *A Photometric Adaption of the Somogy Method for Determination of Glucose. J. Biol. Chem.* 153. pp. 375 - 380. (1944).
- A.T. Karossi, C. Tjahjadi, R. Dyah and L.Z. Udin, *Proceedings Food Conference'88. Food Science and Technology in Industrial Development.* Bangkok, Thailand, 24 - 26 October 1988, p. 336 - 398.