

MEMBRAN POLYETHERSULFONE DAN REGENERATED CELLULOSE UNTUK ULTRAFILTRASI

PENGARUH pH TERHADAP PROSES ULTRAFILTRASI XILANASE

Trismilah, Achmadin Lutfi¹⁾

¹⁾ Bidang Teknologi Biokatalis, Pusat Teknologi Bioindustri, BPPT
Lab Teknologi Bioindustri, LAPTIAB, PUSPIPTEK, Serpong, 15314.
Telp. 7560536 ext.102, Fax.7560536 ext. 122, e-mail: trismilah@webmail.bppt.go.id
Jl. MH.Thamrin No. 8, Jakarta, 10340. Telp.3169513, Fax.3169510

Abstract

Purification of xylanase result of fermentation from Bacillus stearothermophilus DSM 22 using membrane polyethersulfone and regenerated cellulose, each measuring 30 kD. Variations in pH 4.94, 5.80, 6.60, 7.40, 8.20. Analysis of enzyme activity, protein content and enzyme specific activity carried out on permeate and retentate. This study aimed to learn the best pH condition and the appropriate type of membrane process in the purification method xylanase with ultrafiltration. Research of results indicate that pH is very influential in the process ultrafiltration xylanase, each membrane has a different characteristic. Purification xylanase best use of ultrafiltration membrane polyethersulfone achieved in the pH 4.94 with a specific activity 13,888 U / mg in the permeate. Purification xylanase best ultrafiltration use of regenerated cellulose membrane at pH 8.20 achieved with specific activity 12397 U / mg in the retentate.

Kata kunci : ultrafiltrasi, membran polyethersulfone, membran regenerated cellulose, permeate, retentate.

1. PENDAHULUAN

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu β -xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase. β -xilosidase yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida (Reilly, 1991). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim β -xilosidase. Sebagian besar enzim β -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim ini kurang dapat digunakan industri penghasil xilosa.

Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Endoxilanase mampu memutus ikatan β 1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau

tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut.

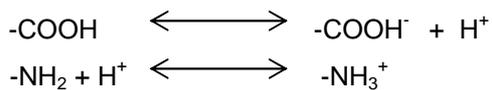
Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Dalton, aktif pada suhu 55°C dengan pH 9. Pada suhu 60°C dan pH normal, xilanase lebih stabil (Tsuji et al., 1992; Cho-Go et al., 1996).

Pemutihan pulp dengan cara enzimatik akan menjadi lebih murah serta menjadi alternatif pengganti penggunaan dengan cara kimia yang mengakibatkan pencemaran racun limbah kimia (Arribas et al., 1995). Penggunaan xilanase bebas selulose pada proses pemutihan bubur kertas bertujuan menghilangkan sisa lignin dalam pulp sehingga dihasilkan kertas berkualitas tinggi. Menurut Viikari et al. (1994) penggunaan xilanase dapat memberikan dampak yang baik terhadap kelestarian lingkungan untuk menggantikan atau mengurangi jumlah klorin yang digunakan dalam proses pemutihan bubur kertas. Untuk proses pembuatan kertas diperlukan xilanase yang bersifat termostabil dan tahan pada pH alkali (Nakamura et al., 1993)

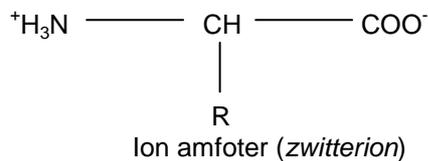
Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, inhibitor dan

aktivator, kekuatan ion dan suhu (Suhartono, 1989; Poedjiadi, 1994).

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (zwitter ion). Hal ini dapat terjadi karena pH dapat mempengaruhi sifat ionik gugus karboksilat dan gugus amina. Apabila asam amino larut dalam air, gugus karboksilat akan melepaskan ion H^+ , sedangkan gugus amina akan menerima ion H^+ , sebagaimana dituliskan di bawah ini :



Adanya kedua gugus tersebut menyebabkan asam amino dalam larutan dapat membentuk ion yang bermuatan positif dan juga bermuatan negatif (zwitterion) atau ion amfoter. Keadaan ion ini sangat tergantung pada pH larutan.



Terdapat keseimbangan antara bentuk-bentuk asam amino sebagai ion amfoter, anion dan kation pada titik isoelektrik, tetapi sebagian besar molekul asam amino terdapat dalam bentuk ion amfoter dan hanya sedikit yang terdapat dalam bentuk kation dan anion dalam jumlah yang sama (Poedjiadi, 1994). Protein merupakan polielektrolit yang mempunyai muatan bermuatan "nol" ketika mencapai nilai isoelektriknya. Protein akan bermuatan positif pada pH di bawah nilai isoelektriknya dan bermuatan negatif pada pH di atas nilai tersebut.

Molekul-molekul protein berada dalam bentuk yang paling padat, pada nilai isoelektriknya dan flux permeatannya bernilai minimum pada pH tersebut oleh karena penyumbatan dari membran dinamik. Namun, penelitian yang dilakukan oleh Fane et al (1983) menunjukkan bahwa kejadian yang bersesuaian ini dapat disebabkan oleh bertambahnya kekuatan ion dari larutan. Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi, oleh sebab itulah pada setiap percobaan dengan enzim diperlukan penyangga (buffer) untuk mengontrol pH reaksi.

Reaksi enzim dipengaruhi oleh suasana "kelistrikan" pada larutan di mana enzim bekerja. Kestabilan molekul protein enzim, yakni : ikatan hidrogen antara atom-atom H, O, N dan S pada molekul-molekul asam amino penyusun, ikatan van der Waals, interaksi hidrofobik, maupun gaya

tarik menarik listrik antara muatan yang berbeda. Kestabilan molekul enzim dengan sendirinya dipengaruhi pengikatan enzim dan substrat, baik secara langsung (pada sisi aktifnya) maupun secara tidak langsung melalui perubahan konformasi/struktur tiga dimensi tersebut, Kekuatan ion atau "ionic strength" adalah salah satu parameter yang dapat dipergunakan untuk mengukur polaritas larutan (Suhartono, 1989; Bailey dan Ollis, 1988)

Saat ini telah banyak penemuan-penemuan yang sangat menarik dari sistem membran untuk proses fraksinasi protein kompleks di berbagai bidang bioteknologi, produksi makanan dan aplikasi biomedikal. Beberapa dari penemuan tersebut menunjukkan bahwa memungkinkan tercapainya pemisahan protein dengan cara menambahkan larutan pH dan garam berkonsentrasi sehingga tercapai interaksi elektrostatis antara protein dan membran. Penelitian yang dilakukan oleh Saksena dan Zydney (1994) menunjukkan adanya peningkatan selektivitas yang dramatis dari pemisahan Bovine Serum Albumin (BSA) dan Immunoglobulin (IgG) pada pH 4,8 dengan konsentrasi garam yang rendah. BSA yang memiliki titik isoelektrik 4,8 akan tertahan pada membran, sementara IgG yang bermuatan positif pada pH tersebut akan lolos melewati membran. Penelitian lanjutan yang dilakukan oleh Pujar dan Sydney (1998) menunjukkan bahwa dengan bertambahnya muatan pada protein akan menyebabkan bertambah pula volume efektifnya. Hal ini menyebabkan difusi awan ion di sekitar protein (*The Electrical double Layer*). Nilai titik isoelektris dari xilanase yang telah dimurnikan dari *Bacillus* sp. Strain BP-23 oleh Blanco et al (1995) bernilai 9,3.

Ultrafiltrasi adalah proses filtrasi menggunakan membran berukuran lebih besar dari Reverse Osmosis yaitu sebesar 0,001 – 0,01 μm (Singh, 1996). Dikarenakan ukuran membran tersebut menyebabkan molekul-molekul berukuran kecil seperti garam dan gula dapat lolos melewati membran dan molekul-molekul berukuran besar seperti protein tertahan di atas membran. Perbedaan antara Reverse Osmosis dan ultrafiltrasi didefinisikan berdasarkan molekul dari substansi larutan yang dapat lolos melewati membran, sehingga dapat disebut batasan permeabilitas berbasis berat molekul. Apabila batasan permeabilitas dari membran lebih rendah dari 500, dioperasikan dengan Reverse Osmosis dan bila di atas 500 maka menggunakan ultrafiltrasi. Substansi larutan dengan berat molekul yang nilainya mendekati nilai dari batasan permeabilitas membran, sehingga akan tertahan dan sebagian besar dari molekul-molekul ini

tersedia di permeat dan konsentrat. Nilai batasan permeabilitas terhadap berat molekul untuk membran ultrafiltrasi adalah berkisar 500 hingga 1000. Karakteristik dari membran *polyethersulfone* adalah : modifikasi hidrofilik sehingga dapat lebih resistan terhadap fouling, ukuran pori-pori membrannya antara 5 hingga 1000KD, membran ini dapat dioperasikan pada range temperatur yang lebar dan sangat stabil pada nilai pH 1 hingga 14, namun rendah untuk kemampuan solvenya, membran ini direkomendasikan untuk aplikasi-aplikasi dengan kondisi pH yang ekstrim yaitu dibutuhkan pada saat proses dan pencucian (Cheryan, 1984).

Membran *polyethersulfone* tradisional cenderung mengadsorpsi protein dan komponen biologi lainnya, yang menyebabkan penyumbatan membran serta memperlambat aliran umpan.

Membran *regenerated cellulose* sangat hidrofilik, tidak mudah tersumbat dan daya serap terhadap protein rendah. Lebih cocok dengan solven organik dibandingkan membran *polyethersulfone* namun sangat rendah toleransi terhadap pH yang ekstrim. Direkomendasikan untuk penerapan pada kondisi pH yang tidak ekstrim, khususnya untuk ultrafiltrasi umpan dengan konsentrasi protein rendah (<20 g/m²).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi pH dan membran yang terbaik pada pemurnian xilanase secara ultrafiltrasi sehingga akan memudahkan aplikasinya pada proses *biopulping* industri kertas.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan : bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* DSM 22. Bahan-bahan kimia untuk analisis antara lain: Larutan NaOH 0,1 M, *Bovin Serum Albumin* (BSA), Pereaksi Bradford, Xilosa, *Oat spelt xylan* 1%, Pereaksi DNS 1% (3,5 *Dinitrosalicylic Acid*), *Aquabidest* (*reverse osmosis*), es batu dan larutan buffer fosfat pH 8. Membran yang digunakan untuk proses ultrafiltrasi adalah membran *polyethersulfone* dengan kode filter PM 30, diameter 63,5 mm, NMWL 30 kD (cat. No. 13232; Lot. No. K5SN6716); membran *regenerated cellulose* dengan kode YM3, diameter 90 mm, NMWL 3 kD (cat. No. 13451; Lot. No. K1JNK209). Kedua membran ini diproduksi oleh Millipore.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ultrafiltrasi jenis *stirred cell* produksi *Amicon Corporation*. Alat ini menggunakan batang magnetik yang bergerak berputar dan ditempatkan sedekat mungkin pada permukaan membran untuk mengurangi terjadinya *fouling* atau menumpuknya kotoran di dekat membran. Proses ultrafiltrasi ini

menggunakan gas Nitrogen (N₂) untuk menaikkan tekanan hingga 30 psi sehingga enzim dapat mengalir konstan selama proses berlangsung. Spektrofotometer, *waterbath*, sentrifus dingin, dan peralatan lab lainnya.

Pemurnian Xilanase dengan ultrafiltrasi. *Fermented broth* xilanase yang masih mengandung banyak pengotor disentrifugasi dengan kecepatan putaran 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 5° C sehingga diperoleh *supernatan* enzim. *Supernatan* enzim tersebut kemudian diukur kadar proteinnya dengan metoda Bradford (1976) dan aktivitas xilanase dengan metoda Bailey *et al.* (1992). *Supernatan* enzim inilah yang selanjutnya akan disebut sebagai *crude enzym*.

Crude enzym dimurnikan dengan ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* dan membran *regenerated cellulose*, masing-masing membran berukuran 30 kD dari Millipore. Enzim yang akan diultrafiltrasi selanjutnya disebut umpan. Umpan sebanyak 180 mL yang telah ditetapkan pH nya dimasukkan ke dalam *Amicon stirred cell* diultrafiltrasi pada kondisi kecepatan putaran pengaduk 400 rpm dan tekanan 30 psi. Umpan divariasikan dengan nilai konsentrasi pH 4,94; 5,80; 6,60; 7,40; dan 8,20. Variasi nilai pH diperoleh dengan penambahan buffer fosfat pada *supernatan* enzim. Setelah proses ultrafiltrasi dengan satu membran selesai (*retentate* tinggal 10 mL) dilakukan pencucian membran dan membran diganti dengan membran baru untuk proses ultrafiltrasi tahap berikutnya. Analisis aktivitas enzim dan kadar protein dilakukan terhadap *permeate* maupun *retentate*.

Analisis Sampel. Analisis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah analisis aktivitas xilanase (Bailey *et al.* 1992). Serapan hasil reaksi enzimatik dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil pembacaan selanjutnya dikonversikan ke persamaan linear standar xilanase dan dihasilkan rumus sebagai berikut :

$$AE = \frac{[xilosa] \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{BM \text{ xilosa} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume enzim}}$$

Keterangan :

AE : Aktivitas enzim; dalam satuan U/mL.

Sebagai standar digunakan xilosa dengan konsentrasi 0,1 – 1,0 mg/mL. Definisi satu unit aktivitas enzim adalah kemampuan atau jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan pembentukan 1 μmol produk selama 1 menit. Analisis kadar protein (Bradford 1976). Serapan hasil reaksi enzimatik dibaca pada

spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pembacaan selanjutnya dikonversikan ke persamaan linear standar protein kemudian besarnya konsentrasi serapan yang didapat adalah sebanding dengan kadar protein dalam sampel. Sebagai standar digunakan bovin serum albumin (BSA) dengan pengujian makro (konsentrasi 100 – 500 µg/mL) dan mikro (konsentrasi 10 – 100 µg/mL).

Analisis aktivitas spesifik xilanase dilakukan dengan cara penghitungan antara kadar protein dan aktivitas xilanase. Penghitungan aktivitas spesifik enzim adalah sebagai berikut :

$$\text{Akt. spesifik enzim (U/mg)} = \frac{\text{Akt. xilanase (U/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil Penelitian

Hasil pemurnian xilanase dengan ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* pada kondisi pH yang berbeda.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa aktivitas xilanase *permeate* hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* mencapai nilai tertinggi pada pH 4,94, yaitu sebesar 12,277 U/mL, sedangkan aktivitas xilanase terendah sebesar 1,888 U/mL dicapai pada pH ultrafiltrasi 8,20. Aktivitas xilanase *permeate* mengalami penurunan dengan bertambahnya nilai pH. Aktivitas xilanase pada *retentate* mencapai nilai tertinggi pada pH ultrafiltrasi 5,80, yaitu sebesar 10,476 U/mL, sedangkan nilai terendah di pH 7,40 sebesar 1,085 U/mL. Terjadi peningkatan nilai aktivitas xilanase pada pH ultrafiltrasi 5,80 yaitu sebesar 10,476 U/mL, namun pada pH 6,60, pH 7,40 dan pH 8,20 mengalami penurunan aktivitas enzim, masing-masing menjadi 4,856 U/mL, 1,085 U/mL, dan 4,053 U/mL.

Kadar protein *permeate* hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* dapat dilihat pada Tabel 1 mencapai nilai tertinggi pada pH 7,40 yaitu sebesar 7,155 mg/mL, sedangkan nilai terendah dicapai pada pH 5,80 yaitu sebesar 0,746 mg/mL. Kadar protein *retentate* tertinggi dicapai pada pH ultrafiltrasi 6,60 yaitu sebesar 5,497 mg/mL dan terendah dicapai pada pH 5,80 yaitu sebesar 2,182 mg/mL. Kadar protein hasil ultrafiltrasi pada pH 4,94 mencapai nilai sebesar 5,138 mg/mL kemudian mengalami penurunan pada pH 5,80 menjadi 2,182 mg/mL, kemudian mengalami kenaikan pada pH 6,60 (5,497 mg/mL). Hasil pemurnian xilanase dengan ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda. Pada Tabel 2

dapat dilihat bahwa aktivitas enzim tertinggi *permeate* hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* menunjukkan nilai sebesar 12,252 U/mL pada pH 4,94, sedangkan nilai terendah dicapai pada pH 7,40 yaitu sebesar 1,888 U/mL. Terjadi penurunan aktivitas pada pH 5,80 (2,472 U/mL) kemudian aktivitas enzim mengalami kenaikan lagi mencapai nilai 4,126 U/mL pada pH ultrafiltrasi 6,60. Aktivitas xilanase pada pH 7,40 turun hingga mencapai nilai 1,888 U/mL, namun mengalami peningkatan lagi mencapai 4,053 U/mL pada pH 8,20.

Tabel 1. Aktivitas xilanase dan kadar protein hasil ultrafiltrasi Menggunakan membran *polyethersulfone* pada kondisi pH yang berbeda

Produk ultrafiltrasi	pH ultrafiltrasi	Aktivitas enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)
<i>Permeate</i>	4,94	12,277	0,884
	5,80	2,983	0,746
	6,60	5,708	3,122
	7,40	2,642	7,155
	8,20	1,888	5,359
<i>Retentate</i>	4,94	3,396	5,138
	5,80	10,476	2,182
	6,60	4,856	5,497
	7,40	1,085	3,619
	8,20	4,053	5,193

Data-data aktivitas xilanase yang terdapat pada *retentate* mengalami peningkatan dengan bertambahnya pH. Nilai aktivitas xilanase tertinggi dicapai pada pH 8,20 yaitu sebesar 7,192 U/mL sedangkan nilai terendah dicapai pada pH 5,80 sebesar 3,299 U/mL. Hanya pada nilai pH tersebut (pH 5,80) terjadi penurunan aktivitas enzim namun tidak berbeda jauh dengan nilai sebelumnya.

Kadar protein *permeate* tertinggi hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* mencapai nilai sebesar 6,796 mg/mL pada pH 8,20, sedangkan nilai terendah dicapai pada pH 5,80 yaitu sebesar 2,348 mg/mL. Kadar protein *retentate* tertinggi dicapai pada pH 4,94 sebesar 3,702 mg/mL dan terendah pada pH 8,20 yaitu sebesar 0,580 mg/mL.

Aktivitas spesifik *permeate* hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* dapat dilihat pada Tabel 3. mencapai nilai tertinggi pada pH 4,94 yaitu sebesar 13,888 U/mg dan mengalami penurunan pada pH ultrafiltrasi yang lebih tinggi. Aktivitas spesifik terendah dicapai pada pH ultrafiltrasi 8,20 yaitu sebesar 0,352 U/mg.

Tabel 2. Aktivitas xilanase dan kadar protein hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda

Produk ultrafiltrasi	pH ultrafiltrasi	Aktivitas enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)
Permeate	4,94	12,252	4,061
	5,80	2,472	2,348
	6,60	4,126	3,094
	7,40	1,888	2,652
	8,20	4,053	6,796
Retentate	4,94	4,929	3,702
	5,80	3,299	2,072
	6,60	5,367	1,575
	7,40	6,584	2,072
	8,20	7,192	0,580

Tabel 3. Aktivitas spesifik xilanase hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* dan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda

Produk ultrafiltrasi	pH ultrafiltrasi	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
		<i>polyethersulfone</i>	<i>regenerated cellulose</i>
Permeate	4,94	13,888	3,017
	5,80	3,999	1,053
	6,60	1,828	1,334
	7,40	0,369	0,712
	8,20	0,352	0,596
Retentate	4,94	0,661	1,332
	5,80	4,801	1,592
	6,60	0,883	3,409
	7,40	0,299	3,178
	8,20	0,780	12,397

Aktivitas spesifik retentate tertinggi sebesar 4,801 U/mg dicapai pada pH 5,80 dan terendah dicapai pada pH 7,40 yaitu sebesar 0,299 U/mg. Hanya pada nilai pH 5,80 aktivitas spesifik enzim lebih tinggi bila dibandingkan dengan nilai pH yang lainnya yang rata-rata bernilai antara 0,299 – 0,883 U/mg. Pada Tabel 3. Juga dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik permeate hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* mencapai nilai tertinggi pada pH 4,94 yaitu sebesar 3,017 U/mg. Aktivitas spesifik terendah dicapai pada pH ultrafiltrasi 8,20 yaitu sebesar 0,596 U/mg.

Adanya kenaikan serta penurunan dari aktivitas xilanase dan kadar proteinnya menyebabkan aktivitas spesifik retentate semakin

mengalami peningkatan. Aktivitas spesifik retentate tertinggi yaitu sebesar 12,397 U/mg dicapai pada pH 8,20 dan nilai terendah pada pH 4,94 yaitu sebesar 1,332 U/mg.

3.2. Pembahasan

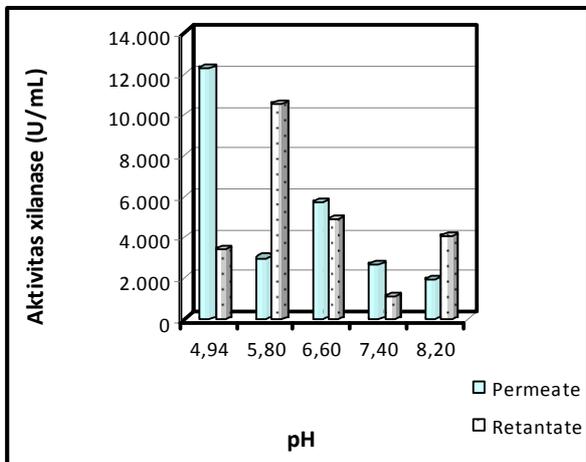
Hasil pemurnian xilanase dengan ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* pada kondisi pH yang berbeda. Pada penelitian ini beberapa kondisi pH yang berbeda digunakan untuk mengetahui efektivitas proses pemurnian xilanase secara ultrafiltrasi. Adapun nilai pH yang digunakan adalah 4,94; 5,80; 6,60; 7,40 dan 8,20.

Berdasarkan Gambar 1 dan 2 dapat dilihat bahwa proses ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* paling baik dicapai pada kondisi pH 4,94. Hal ini dapat diketahui dari tingginya aktivitas xilanase pada permeate (12,277 U/mL) meskipun kandungan protein permeate sangat sedikit (0,884 mg/mL); dan tingginya kandungan protein yang tertahan pada membran (retentate) sebesar 5,138 mg/mL dengan aktivitas enzim xilanase yang rendah yaitu sebesar 3,396 U/mL. Hal ini diperjelas dengan hasil perhitungan aktivitas spesifiknya, pada pH ultrafiltrasi 4,94 nilai aktivitas spesifiknya tertinggi diperoleh pada produk permeate yaitu sebesar 13,888 U/mg (Tabel 3).

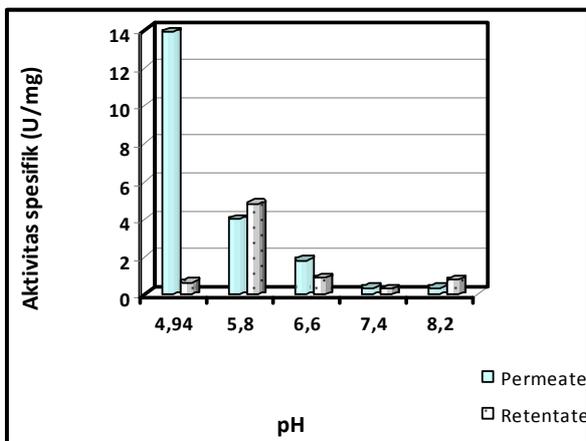
Efektivitas proses ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* semakin menurun pada pH 5,80 dan 6,60. Terlihat dari semakin rendahnya aktivitas xilanase pada permeate, masing-masing sebesar 2,983 U/mL dan 5,708 U/mL dari kandungan protein pada permeate sebesar 0,746 mg/mL dan 3,122 mg/mL, walaupun aktivitas xilanase yang tertahan pada membran masih cukup tinggi pada pH 5,80. Bahkan proses ultrafiltrasi pada pH 7,40 dan 8,20 sudah tidak efektif lagi. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1. tingginya jumlah protein yang dapat melewati membran (permeate), masing-masing sebesar 7,155 mg/mL dan 5,359 mg/mL tetapi aktivitas enzim xilanase yang rendah yaitu 2,642 U/mL dan 1,888 U/mL. Demikian pula yang terjadi pada protein yang tertahan pada membran, yang aktivitas enzimnya cukup rendah hanya sebesar 1,085 U/mL dan 4,053 U/mL.

Proses ultrafiltrasi dengan membran *polyethersulfone* pada pH 4,94 menghasilkan produk permeate dengan kemurnian lebih tinggi dibandingkan dengan ultrafiltrasi pada pH lain yang digunakan dalam penelitian ini. Hal ini dapat disebabkan oleh tingginya nilai titik isoelektris protein enzim xilanase, yaitu sebesar 9,3 (Blanco, et al., 1995). Keadaan tersebut menyebabkan tingginya tingkat kelarutan protein xilanase pada pH 4,94 sehingga memudahkan enzim tersebut

lolos melewati membran. Pada pH yang lebih tinggi yaitu pada pH 5,80 efektivitas proses filtrasi semakin menurun, karena pada pH tersebut kelarutan protein xilanase semakin menurun sehingga sebagian besar tertahan dalam membran.



Gambar 1. Aktivitas xilanase hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* pada kondisi pH yang berbeda

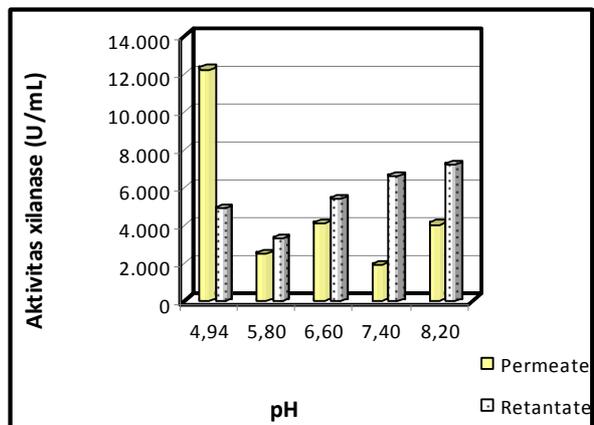


Gambar 2. Aktivitas spesifik xilanase hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* pada kondisi pH yang berbeda .

Proses ultrafiltrasi dengan membran *polyethersulfone* pada pH 7,40 dan 8,20 sudah tidak efektif lagi karena pada kondisi tersebut proses ultrafiltrasi menghasilkan produk dengan aktivitas enzim yang sangat rendah baik pada *permeate* maupun *retentate*. Hal ini disebabkan oleh sebagian besar protein non xilanase dalam umpan memiliki tingkat kelarutan yang tinggi,

sehingga banyak protein yang lolos melewati membran menyebabkan rendahnya tingkat kemurnian xilanase pada *permeate*. Sebaliknya pada kisaran pH 7,40-8,20 protein xilanase memiliki tingkat kelarutan yang rendah atau makin mendekati titik isoelektrisnya sehingga banyak enzim yang tertahan pada membran. Tetapi karena sifat membran *polyethersulfone* yang memiliki daya ikat terhadap protein tinggi menyebabkan tidak hanya protein xilanase saja yang tertahan pada membran tetapi juga protein non xilanase sehingga aktivitas enzim xilanase rendah pada *retentate*.

Hasil pemurnian xilanase secara ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda. Berdasarkan Gambar 3 dan 4 dapat dilihat bahwa proses ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* paling baik dicapai pada kondisi pH 8,20. Hal ini dapat diketahui dari tingginya aktivitas xilanase pada *retentate* (7,192 U/mL) meskipun kandungan protein *retentate* sangat sedikit (0,580 mg/mL) dan kandungan protein yang melewati membran (*permeate*) sebesar 6,796 mg/mL dengan aktivitas xilanase yang rendah yaitu sebesar 4,126 U/mL. Hasil ini diperjelas pula oleh hasil perhitungan aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada produk *retentate* yaitu sebesar 12,397 U/mg (Tabel 3) . Efektivitas proses

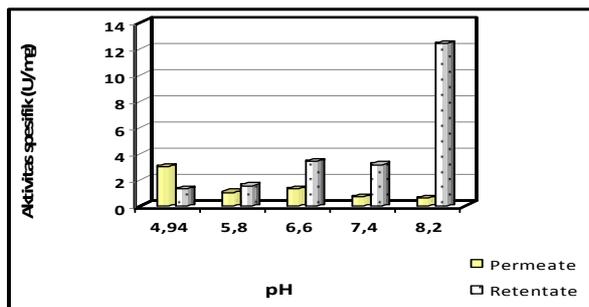


Gambar 3. Aktivitas xilanase hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda

ultrafiltrasi dengan menggunakan membran *regenerated cellulose* semakin menurun pada kondisi pH ultrafiltrasi yang semakin rendah hal ini terlihat dari semakin rendahnya aktivitas xilanase pada *retentate*.

Proses ultrafiltrasi dengan membran *regenerated cellulose* pada pH 8,20 menghasilkan produk *retentate* dengan kemurnian lebih tinggi

dibandingkan dengan ultrafiltrasi pada kondisi pH lain yang digunakan dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan ultrafiltrasi pada pH 8,20 semakin mendekati nilai titik isoelektris protein xilanase. Pada penelitian yaitu sebesar 9,3 sehingga kelarutannya semakin rendah dan banyak yang tertahan pada membran. Pada pH yang lebih rendah, efektivitas ultrafiltrasi semakin menurun karena kelarutan protein enzim semakin tinggi sehingga semakin sedikit xilanase yang dapat tertahan pada membran.



Gambar 4. Aktivitas spesifik xilanase hasil ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* pada kondisi pH yang berbeda

Apabila kondisi ultrafiltrasi dilakukan pada pH 4,94 – 6,60, pada kisaran pH tersebut memungkinkan sebagian besar protein berada pada titik isoelektriknya sehingga tingkat kelarutannya rendah, hal ini menyebabkan sebagian besar protein tertahan pada membran terutama keadaan ini terjadi pada ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone*. Hanya protein tertentu saja yaitu protein xilanase yang memiliki tingkat kelarutan lebih tinggi daripada protein lain pada kisaran pH tersebut sehingga dapat lolos melewati membran. Menurut Blanco et al. (1995) titik isoelektris protein xilanase adalah sebesar 9,3. Hal ini berarti bahwa xilanase memiliki tingkat kelarutan tinggi pada kondisi pH ultrafiltrasi 4,94. Terbukti dalam penelitian ini banyak xilanase yang terkandung dalam *permeate*. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1, Gambar 1 dan Gambar 2.

Hanya pada proses ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* pada kisaran pH tersebut di atas semakin tinggi pH ultrafiltrasi, jumlah protein lain selain protein xilanase yang lolos melewati membran semakin banyak karena pada pH yang semakin tinggi, tingkat kelarutan protein non xilanase semakin meningkat pula menyebabkan tingkat kemurnian xilanase dalam *permeate* semakin rendah. Hal ini dapat dilihat dari

hasil analisis aktivitas spesifik xilanase yang semakin rendah.

Tetapi tidak demikian halnya untuk proses ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose*. Hal ini disebabkan oleh daya ikat protein dalam umpan terhadap membran *regenerated cellulose* yang lebih kecil daripada daya ikat protein umpan terhadap membran *polyethersulfone* (<http://www.millipore.com>). Hal ini memungkinkan lolosnya protein non xilanase yang memiliki ukuran lebih besar daripada protein xilanase pada kisaran pH tersebut dapat melewati membran *regenerated cellulose*, menyebabkan total protein pada *permeate* lebih banyak namun aktivitas enzim xilanasenya menjadi lebih rendah. Disamping itu dapat juga disebabkan oleh sifat membran *regenerated cellulose* yang sangat hidrofilik sehingga memungkinkan lewatnya protein yang kelarutannya tidak terlalu tinggi pada kisaran pH tersebut.

Apabila kondisi ultrafiltrasi dilakukan pada pH 7,40 – 8,20, pada kisaran pH tersebut memungkinkan sebagian besar protein memiliki kelarutan yang tinggi sehingga protein banyak yang lolos melewati membran, baik membran *polyethersulfone* maupun *regenerated cellulose*. Hanya protein tertentu dalam hal ini protein xilanase yang memiliki tingkat kelarutan yang lebih rendah daripada protein lain pada kisaran pH tersebut yang tertahan pada membran. Jumlah protein yang tertahan pada membran sedikit tetapi aktivitas enzim xilanasenya tinggi. Keadaan ini lebih jelas terlihat pada Tabel 2, Gambar 3 dan Gambar 4.

Hal tersebut di atas dapat disebabkan oleh perbedaan daya ikat protein dalam umpan terhadap kedua jenis membran, dimana daya ikat protein terhadap membran *regenerated cellulose* lebih kecil daripada membran *polyethersulfone*. Hal ini memungkinkan hanya protein tertentu yaitu protein xilanase yang memiliki struktur protein lebih besar daripada protein lain pada kisaran pH tersebut yang dapat tertahan pada membran *regenerated cellulose*. Sedang pada ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* tidak demikian karena daya ikat protein umpan terhadap membran lebih besar, sebagian protein yang memiliki ukuran lebih kecil daripada protein xilanase pada pH masih banyak yang tertahan pada membran, menyebabkan total protein dalam *retentate* lebih banyak namun aktivitas enzimnya rendah.

4. KESIMPULAN

- Hasil pemurnian xilanase terbaik dari ultrafiltrasi menggunakan membran *polyethersulfone* 30 kD dicapai pada pH

4,94 dengan kandungan kadar protein *permeate* sebesar 0,884 mg/mL, aktivitas xilanase 12,277 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 13,888 U/mg.

- Hasil pemurnian xilanase terbaik dari ultrafiltrasi menggunakan membran *regenerated cellulose* dicapai pada pH 8,20 dengan kandungan kadar protein *retentate* sebesar 0,580 mg/mL aktivitas enzim xilanase sebesar 7,129 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 12,397 U/mg.
- Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk menggunakan membran *regenerated cellulose* ukuran < 30KD sehingga diperoleh produk xilanase yang murni dan dilakukan penelitian lanjutan untuk mengukur ukuran dari protein serta titik isoelektrisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arribas, r.A., J.M.Fernandez-Abados, P. Sanchez, 1995. Over production, purification and biochemical characterization of xylanase I (xus I) from *Streptomyces halsdii* JMB. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 2414-2419
- Bailey, J.E., D.F. Ollis, 1988. Dasar-dasar rekayasa biokimia. IPB. Bogor
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology.* 23 : 257-270
- Blanco, A., T. Vidal., J.F. Colom , F.I.J. Pastor, 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus sp.* Strain BP-23. *American society for microbiology* : Barcelona
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye – binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254
- Cheryan, M., 1984 Ultrafiltration Handbook. Technomic publishing CO., Inc.
- Cho-Goo,s., J.H. Suh, Y.I. Choi, 1996. Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus stearothermophilus* Endo-xylanase A (xynA). *J. Microbiology and Biotechnology* 6:79-85
- Fane, A.G., Fell, C.J.D., Suki, A, A., 1983. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solution with retentive membranes. *J. Membr. Sci.*, 16 195-210
- [Http://www.milipore.com](http://www.milipore.com). Diakses tanggal 5 Desember 2006 pukul 13.04 WIB. Millipore, Helicon and Ultracel are registered trademarks of Millipore Corporation
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono R., Horikoshi, K., 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain 41 M1. *Appl. Environ, Microbiol.* 59 (7) : 2311-2316
- Pujar, N.S., Zydney AL., 1998. Electrostatic effect on protein partitioning in size-exclusion chromatography and membrane ultrafiltration. *J. Chromatography* 796 :229-238
- Poedjiadi, A., 1994. Dasar – dasar Biokimia, Universitas Indonesia, Jakarta
- Reilly, P.J. (1991) Xylanase: structure and function. In *Hollander, A., eds. proceeding of a symposium on trend in biotechnology of fermentation for fuels and chemicals*. Plenum Press, New York
- Saksena, S., Zydney, A.L., 1994. Effect of Solution pH and Ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IgG) by selective filtration. *Biotechnol Bioeng* 43 :960-968
- Singh, P.C., 1996. Choosing an appropriate bioseparation technique. Trends in food science and technology, USA
- Suhartono, M.T., 1989. Enzim dan Bioteknologi, IPB. Bogor
- Tsujibo, H., K.Miyomoto, T.Kuda, K.Minami,T, Sakamoto,T.Hasegawa, and Y.Ianamori, 1992. Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanase from *Streptomyces termoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 371-375
- Viikari, L.,Katelinen, A., Sundquist, J. dan Linko, M., 1994. Xylanase in bleaching : from idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*13 : 335 – 350.