

TEKNOLOGI BIOPROSES

Penyusun:

Ahmad Wibisana
Rifkah Akmalina



Jl. Surya Kencana No. 1 Pamulang
Gd. A, Ruang 212 Universitas Pamulang
Tangerang Selatan – Banten

TEKNOLOGI BIOPROSES

Penulis:

Ahmad Wibisana
Rifkah Akmalina

ISBN: 978-623-6352-97-7

Editor:

Joni Prasetyo

Desain sampul:

Aden

Tata Letak:

Ramdani Putra

Penerbit:

Unpam Press

Redaksi:

Jl. Surya Kencana No. 1
Pamulang – Tangerang Selatan
Telp. 021-7412566
Fax. 021 74709855
Email: unpampress@unpam.ac.id

Cetakan pertama, 12 Mei 2022

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa
ijin penerbit.

DATA PUBLIKASI UNPAM PRESS

| Lembaga Penerbit dan Publikasi Universitas Pamulang

Gedung A. R. 212 Kampus 1 Universitas Pamulang

Jalan Surya Kencana Nomor 1 Pamulang Barat, Tangerang Selatan, Banten

Website: www.unpam.ac.id | Email: unpampress@unpam.ac.id

Teknologi Bioproses / Ahmad Wibisana dan Rifkah Akmalina – 1st ed
ISBN. 978-623-6352-97-7

1. Teknologi Bioproses I. Ahmad Wibisana II. Rifkah Akmalina
M226-12052022-01

Ketua Unpam Press: Pranoto

Koordinator Editorial: Aden

Koordinator Hak Cipta: Susanto

Koordinator Produksi: Dameis Surya Anggara

Koordinator Publikasi: Kusworo, Heri Haerudin

Koordinator Dokumentasi: Ramdani Putra, Nara Dwi Angesti

Desain Cover: Aden

Cetakan pertama, 12 Mei 2022

Hak cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa
ijin penerbit.

MODUL MATA KULIAH

TEKNOLOGI BIOPROSES

IDENTITAS MATA KULIAH

Program Studi	: Teknik Kimia S-1
Mata Kuliah/Kode	: Teknologi Bioproses/TKM0312
Sks	: 2 Sks
Prasyarat	: -
Semester	: IV
Deskripsi	: Mata kuliah Teknologi Bioproses merupakan mata kuliah wajib program studi Teknik Kimia yang mempelajari tentang pengantar bioproses secara umum; sel mikroorganisme; isolasi, skrining, preservasi, dan pengembangan mikroba industri; dasar fermentasi; sterilisasi; kinetika pertumbuhan sel; bioreaktor; proses hilir; enzim dan kinetikanya; imobilisasi enzim; serta aplikasi dan industri bioproses
Capaian Pembelajaran	: Setelah mempelajari mata kuliah ini mahasiswa mampu menganalisis proses biokimia dan aspek teknis dalam bioproses secara komprehensif termasuk komponen-komponen pendukung dan aplikasinya
Penyusun	: 1) Ahmad Wibisana (Ketua) 2) Rifkah Akmalina (Anggota)

Ketua Program Studi

Ir. Wiwik Indrawati, M.Pd.
NIDN. 0429036203

Ketua Tim Penyusun

Dr. Ir. Ahmad Wibisana, M.T.
NIDK. 8863500016

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas rahmat-Nya yang telah tercurah, sehingga penulis dapat menyelesaikan bahan ajar mata kuliah Teknologi Bioproses ini. Adapun tujuan dari disusunnya bahan ajar ini adalah agar para mahasiswa dapat mengetahui dan memahami hal-hal yang terkait dengan ilmu dan teknologi bioproses. Melalui bahan ajar ini, mahasiswa akan diberikan paparan diantaranya terkait sel mikroorganisme, proses fermentasi, bioreaktor, enzim, serta aplikasi bioproses di industri.

Ilmu bioproses saat ini sudah mulai banyak dikembangkan, baik di skala laboratorium maupun skala industri. Untuk itu penting bagi mahasiswa mempelajari ilmu dan teknologi bioproses sehingga dapat menambah wawasan dan kemampuan dalam mengaplikasikan ilmu ini di dunia industri khususnya.

Tersusunnya bahan ajar Teknologi Bioproses tentu bukan hanya dari usaha penulis. Dukungan dari berbagai pihak juga sangat membantu tersusunnya bahan ajar ini. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan dosen, keluarga, dan pihak lainnya yang telah membantu sehingga bahan ajar ini dapat selesai tepat waktu.

Bahan ajar ini tentu masih jauh dari kata sempurna. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diperlukan agar buku ini bisa menjadi lebih baik di masa yang akan datang.

Tangerang Selatan, 12 Mei 2022

Penulis

DAFTAR ISI

TEKNOLOGI BIOPROSES	i
TEKNOLOGI BIOPROSES	ii
DATA PUBLIKASI UNPAM PRESS	iii
IDENTITAS MATA KULIAH	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
PERTEMUAN 1	1
PENGANTAR BIOPROSES	1
A. Capaian Pembelajaran	1
B. Uraian Materi	1
1. Ilmu Bioproses	1
2. Prinsip, Keunggulan, dan Kelemahan Bioproses	4
3. Perkembangan Industri Bioproses	9
4. Aplikasi Bioproses	13
C. Latihan Soal	15
D. Daftar Pustaka	15
PERTEMUAN 2	17
SEL MIKROORGANISME	17
A. Capaian Pembelajaran	17
B. Uraian Materi	17
1. Biodiversitas Hayati	17
2. Klasifikasi Organisme	20
3. Komposisi Kimia Sel	25
C. Latihan Soal	28
D. Daftar Pustaka	28
PERTEMUAN 3	30
ISOLASI, SKRINING, PRESERVASI DAN PENGEMBANGAN MIKROBA INDUSTRI	30
A. Capaian Pembelajaran	30
B. Uraian Materi	30
1. Pengertian dan Karakteristik Mikroba Industri	30
C. Latihan Soal	43
D. Daftar Pustaka	43

PERTEMUAN 4	44
DASAR-DASAR FERMENTASI	44
A. Capaian Pembelajaran	44
B. Uraian Materi	44
1. Perkembangan Industri Fermentasi	45
2. Formulasi Media	47
3. Jenis-Jenis Proses Fermentasi	55
C. Latihan Soal.....	55
D. Daftar Pustaka.....	56
PERTEMUAN 5	57
STERILISASI.....	57
A. Capaian Pembelajaran	57
B. Uraian Materi	57
1. Sterilisasi Medium Fermentasi.....	58
2. Sterilisasi Udara	72
C. Latihan Soal.....	74
D. Daftar Pustaka.....	74
PERTEMUAN 6	75
KINETIKA PERTUMBUHAN SEL	75
A. Capaian Pembelajaran	75
B. Uraian Materi	75
1. Kinetika Pertumbuhan dalam Reaktor Curah.....	75
2. Perolehan Biomassa.....	80
3. Model Pertumbuhan Sel Monod.....	83
C. Latihan Soal.....	86
D. Daftar Pustaka.....	88
PERTEMUAN 7	89
BIOREAKTOR	89
A. Capaian Pembelajaran	89
B. Uraian Materi	89
1. Jenis-Jenis Bioreaktor	89
C. Latihan Soal.....	100
D. Daftar Pustaka.....	100
PERTEMUAN 8	101
REKAYASA BIOREAKTOR	101

A. Capaian Pembelajaran	101
B. Uraian Materi	101
1. Aspek Kinerja Bioreaktor	101
2. Perancangan Bioreaktor	102
3. Mencapai dan Menjaga Kondisi Aseptis	109
C. Latihan Soal.....	112
D. Daftar Pustaka.....	112
PERTEMUAN 9	114
PROSES HILIR: KLARIFIKASI DAN RECOVERI SEL	114
A. Capaian Pembelajaran	114
B. Uraian Materi	114
1. Tahapan Proses Hilir dalam Bioproses	114
2. Klarifikasi Kaldu Fermentasi & <i>Recovery</i> Sel	116
C. Latihan Soal.....	137
D. Daftar Pustaka.....	138
PERTEMUAN 10	139
PROSES HILIR: ISOLASI DAN PEMURNIAN	139
A. Capaian Pembelajaran	139
B. Uraian Materi	139
1. Teknik Isolasi Produk Fermentasi	139
C. Latihan Soal.....	163
D. Daftar Pustaka.....	163
PERTEMUAN 11	164
ENZIM	164
A. Capaian Pembelajaran	164
B. Uraian Materi	164
1. Klasifikasi dan Tata Nama Enzim	164
2. Bagaimana Enzim Bekerja?.....	167
3. Karakteristik Penting Enzim	170
4. Faktor-Faktor Berpengaruh Terhadap Aktivitas Enzim.....	172
5. Struktur dan Bagian Enzim	174
C. Latihan Soal.....	176
D. Daftar Pustaka.....	177
PERTEMUAN 12	178
KINETIKA ENZIM	178

A. Capaian Pembelajaran	178
B. Uraian Materi	178
1. Kinetika Reaksi Enzimatis.....	178
2. Inhibisi Enzim	185
C. Latihan Soal.....	190
D. Daftar Pustaka.....	192
PERTEMUAN 13	193
IMOBILISASI ENZIM	193
A. Capaian Pembelajaran	193
B. Uraian Materi	193
1. Teknik Imobilisasi Enzim.....	193
2. Aplikasi Enzim Amobil	200
C. Latihan Soal.....	204
D. Daftar Pustaka.....	204
PERTEMUAN 14	206
APLIKASI DAN INDUSTRI BIOPROSES.....	206
A. Capaian Pembelajaran	206
B. Uraian Materi	206
1. Proses Anaerobik	207
2. Proses Aerobik	213
3. Proses Pengolahan Limbah.....	218
C. Latihan Soal.....	221
B. Daftar Pustaka.....	222
DAFTAR PUSTAKA.....	223
RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER	226
(RPS).....	226

PERTEMUAN 1

PENGANTAR BIOPROSES

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami definisi dan ruang lingkup bioproses serta keterkaitannya dengan ilmu-ilmu lain
2. Memahami prinsip, keunggulan, dan kelemahan bioproses
3. Memahami perkembangan industri bioproses
4. Memahami aplikasi bioproses

B. Uraian Materi

1. Ilmu Bioproses

Bioproses merupakan cabang ilmu yang mempelajari pemanfaatan mikroorganisme seperti bakteri, fungi, virus dan lain-lain maupun produk dari makhluk hidup seperti enzim untuk menghasilkan barang atau jasa yang bermanfaat bagi manusia atau lingkungan. Penerapan bioproses telah menjadi bagian penting di industri makanan, kimia, farmasi dan lain-lain. Operasi bioproses dilakukan dengan memanfaatkan sel mikroba, hewan, dan tumbuhan, dan komponen sel seperti enzim, untuk menghasilkan produk baru atau mendegradasi limbah berbahaya. Penggunaan mikroorganisme untuk mengubah bahan biologis untuk menghasilkan makanan terfermentasi sudah dilakukan sejak dari zaman kuno. Pembuatan berbagai makanan dan minuman tradisional seperti *yoghurt*, roti, cuka, kecap, bir, tempe, oncom, nata dan lain-lain sudah dilakukan oleh masyarakat umum maupun industri. Saat ini bioproses telah berkembang dengan pesat dan telah menghasilkan berbagai jenis produk komersial, seperti alkohol, bioenergi dan pelarut organik lainnya, hingga produk tertentu yang mahal seperti antibiotik, protein terapeutik, dan vaksin. Berbagai enzim dan sel mikroorganisme hidup yang bermanfaat telah dikembangkan di industri, seperti ragi roti, minuman probiotik, enzim untuk kesehatan dan lain-lain juga merupakan produk komersial dari bioproses. Proses hidrolisa pati secara enzimatis menghasilkan gula untuk digunakan di

berbagai industri makanan dan minuman atau digunakan sebagai bahan baku fermentasi untuk menghasilkan produk yang lain.

Teknologi bioproses awalnya merupakan cabang ilmu Teknik Kimia yang berkaitan dengan proses produksi dan perancangan alat yang menggunakan agen biologi yang dapat berupa (bakteri, kapang, mikroalga) atau enzim. Dalam menjalankan perannya bioproses mempunyai ruang lingkup:

- a. Manipulasi dan memanfaatkan siklus biologi untuk menghasilkan produk yang diinginkan
- b. Mengubah bahan yang bernilai rendah menjadi bernilai tinggi
- c. Manipulasi organisme biologi (mikroba, tanaman, hewan, metabolit) untuk menghasilkan produk yang diinginkan
- d. Proses dilakukan dalam reaktor/fermentor
- e. Menggunakan bahan baku yang dapat diperbarui (renewable), contoh: karbohidrat.

a. Bioteknologi dan Rekayasa Bioproses

Bioteknologi adalah bidang ilmu yang mempelajari penggunaan atau pengembangan metode manipulasi genetik untuk mencapai tujuan yang diinginkan. Tidak hanya untuk menghasilkan senyawa kimia tertentu, tetapi juga dapat digunakan untuk menghasilkan benih atau tanaman yang unggul, terapi gen, atau memperoleh organisme yang dirancang khusus untuk dapat menguraikan limbah. Bioteknologi merupakan biologi terapan yang menjembatani antara biologi dengan rekayasa bioproses. Penafsiran bioteknologi yang lebih luas adalah biologi terapan yang termasuk di dalamnya rekayasa sebagai subkomponen bioteknologi.

Berbagai istilah bidang ilmu digunakan untuk menggambarkan sarjana yang bekerja di bidang bioteknologi. Dua istilah yang sering dipakai adalah Rekayasa Hayati (*Bioengineering*) dan Rekayasa Biologi (*Biological Engineering*). Rekayasa hayati merupakan bidang ilmu yang luas yang meliputi pekerjaan di bidang industri, medis, dan pertanian. Para pelakunya meliputi sarjana di bidang pertanian, kelistrikan, mekanik, industri, lingkungan, kimia, dan lainnya. Rekayasa biologi merupakan bidang ilmu yang serupa namun aplikasinya lebih banyak ke tumbuhan dan hewan. Sedangkan *Biochemical Engineering* merupakan ilmu yang menerapkan prinsip-prinsip teknik kimia terhadap sistem yang menggunakan katalis

biologis untuk melakukan transformasi kimia. Ilmu ini sering dibagi menjadi *Bioreaction Engineering* dan *Bioseparation*. *Biomedical Engineering* merupakan ilmu yang terpisah dari *Biochemical Engineering*, meskipun batas antara keduanya tidak jelas. *Biomedical engineering* adalah ilmu yang mempelajari reseptor pada permukaan sel dan kultur sel hewan. Bidang ilmu yang terkait lainnya adalah *Biomolecular Engineering* yang mempelajari pada tingkat molekular.

Berbeda dengan Teknik kimia, rekayasa bioproses bersifat lebih spesifik, yaitu menekankan pada ilmu teknik dan proses industri yang berbasis hayati, yang meliputi lingkup:

- 1) konversi bahan baku, biomassa atau biorefinery yang berkelanjutan;
- 2) pengolahan berbasis biokatalisis; dan
- 3) manipulasi mikroorganisme untuk tujuan yang bermanfaat.

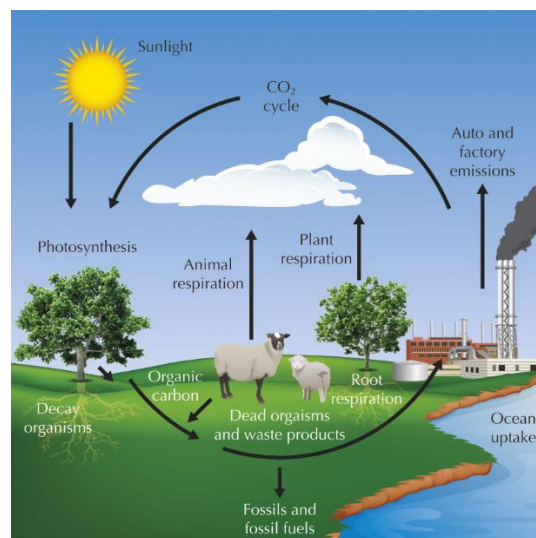
Rekayasa bioproses tidak hanya terbatas pada produk ataupun substrat, namun juga berkaitan dengan proses biologi dan kimia yang terlibat di semua bagian. Dengan demikian rekayasa bioproses meliputi bidang teknik kimia, mekanik, teknik elektro, lingkungan, kedokteran, dan industri, yang dengan menerapkan aspek keilmuan masing-masing digunakan untuk merancang dan menganalisis proses yang berdasarkan pada penggunaan sel hidup atau subkomponen sel. Rekayasa bioproses berhubungan dengan desain dan analisis untuk skala mikro (seluler/molekuler) dan skala besar (seluruh sistem/industri).

Sarjana biologi dan sarjana teknik mempunyai pendekatan yang berbeda dalam penyelesaian masalah di bidang bioteknologi. Sarjana biologi lebih memahami dalam penggunaan peralatan laboratorium, perancangan percobaan dan interpretasi data laboratorium dari sistem yang berbasis hayati yang kompleks. Sarjana teknik lebih memahami tentang perancangan proses, peralatan maupun teknik perbesaran skala untuk memperoleh hasil yang diinginkan secara efektif dan efisien. Oleh karena itu keterampilan sarjana biologi dan teknik saling melengkapi.

2. Prinsip, Keunggulan, dan Kelemahan Bioproses

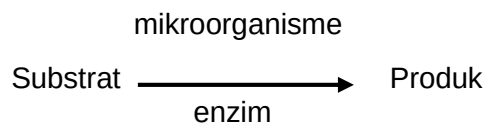
a. Siklus Biologi di Alam

Prinsip bioproses terkait erat dengan fenomena siklus biologi yang terjadi di alam. Gambar 1.1 mengilustrasikan proses biologi alami yang terjadi di alam. Sistem terdiri dari tumbuhan, binatang dan mikroorganisme sebagai komponen hayatinya. Sinar matahari digunakan oleh tanaman untuk mengubah CO_2 dan H_2O menjadi karbohidrat, bahan organik lainnya, dan O_2 . Binatang memakan tanaman, bahan dari tanaman diubah menjadi sel binatang dan menggunakan energi yang dihasilkan dari oksidasi menjadi CO_2 dan H_2O (H_2O juga diperlukan sebagai substrat kunci). Mikroorganisme selanjutnya mengkonversi biomassa dari binatang /tumbuhan mati menjadi bahan organik lain untuk menyuburkan tanah dan pertumbuhan tanaman, dan menghasilkan CO_2 and H_2O . Siklus terjadi secara berulang.



Gambar 1.1. Siklus biologi yang terjadi di alam

Dalam bioproses perombakan substrat ditujukan untuk menghasilkan produk yang bermanfaat bagi manusia. Secara prinsip konsep tersebut diilustrasikan pada Gambar 1.2. Dengan demikian sarjana bioproses harus mampu memanipulasi dan memanfaatkan siklus ini dengan merancang proses untuk menghasilkan produk yang diinginkan, melalui pemanfaatan mikroorganisme, tanaman, hewan atau enzim.



Gambar 1.2. Prinsip bioproses

b. Kimia Hijau

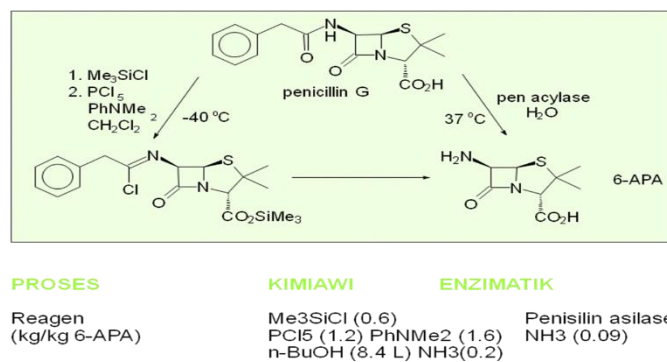
Kimia hijau disebut juga dengan kimia berkelanjutan mempunyai filosofi memanfaatkan ilmu kimia dan rekayasa melalui perancangan proses yang efisiensi untuk menghasilkan produk yang diinginkan dengan meminimalkan penggunaan maupun menghasilkan bahan berbahaya. Hal ini tentunya membuat teknologi bioproses sangat diperlukan dan dapat berperan dalam:

- 1) Pengembangan proses dan produk berdasarkan sumber daya terbarukan, seperti limbah biomassa.
- 2) Perancangan proses yang tidak menghasilkan produk antara yang berbahaya/beracun.
- 3) Perancangan proses yang tidak menggunakan pelarut yang berbahaya/beracun.
- 4) Mengurangi langkah-langkah proses kimiawi serta menuntut efisiensi proses yang tinggi.
- 5) Mempromosikan proses biokimia untuk menggantikan proses-proses kimiawi atau penggunaan bahan kimia beracun.
- 6) Perancangan proses dengan menggunakan kondisi yang lebih ringan (mendekati suhu dan tekanan atmosfer) dengan berbagai alternative untuk rekoveri produk.
- 7) Menggeser kesetimbangan kimia melalui desain reaktor yang inovatif, dan penggunaan biokatalis sebagai ganti dari penambahan proses kimiawi.
- 8) Menghindari pembentukan produk yang tidak diinginkan selain H_2O dan CO_2 .

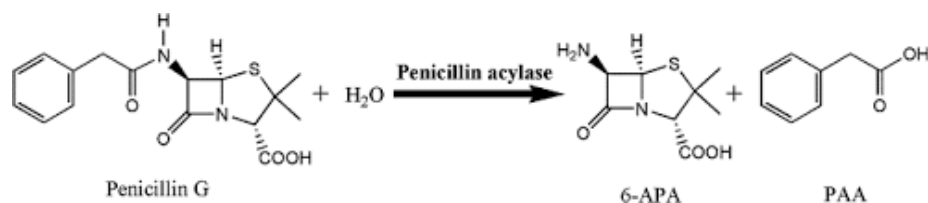
c. Perbandingan Proses Kimiawi dengan Bioproses

Dalam beberapa kasus proses produksi, proses kimiawi telah banyak ditinggalkan digantikan dengan bioproses karena memiliki keunggulan-keunggulan sebagai berikut :

- 1) Kondisi bioproses lebih ringan. Pada umumnya bioproses memerlukan kondisi yang ringan seperti tekanan atmosfer, suhu ruang, dan pH media netral. Sebagai contoh seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.3, yaitu proses konversi penisilin G menjadi senyawa antara 6-APA (6-aminopenicillanic acid). Oleh karena itu peralatan yang dibutuhkan lebih sederhana dan kondisi operasi lebih aman.



(a)



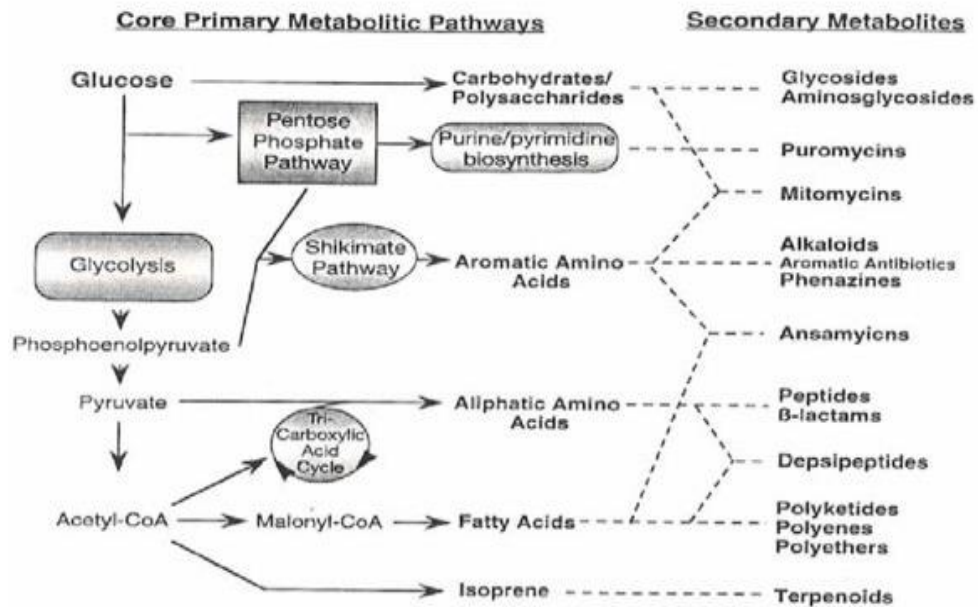
(b)

Gambar 1.3. a) proses kimiawi dan (b) proses enzimatik untuk sintesis senyawa antara 6-amino penicillanic acid (6-APA) yang merupakan bahan baku untuk mensintesis berbagai antibiotik turunan penisilin. Proses kimiawi menggunakan reagen yang berbahaya dan kondisi proses yang ekstrim, sedangkan proses enzimatik menggunakan enzim dan kondisi proses yang ringan

- 2) Menghasilkan produk dengan proses yang rumit. Bioproses dapat digunakan untuk menghasilkan produk yang tidak dapat/sulit atau tidak ekonomis jika dilakukan melalui sintesis kimia. Enzim merupakan biokatalis dengan spesifitas yang tinggi sehingga hanya bekerja pada ikatan tertentu dari substrat. Reaksi enzimatik menghasilkan laju reaksi yang jauh lebih cepat dari pada katalis kimia serta bersifat lebih efektif sehingga hanya dibutuhkan dosis enzim yang relatif sedikit.
- 3) Bahan baku dapat diperbarui. Bahan baku yang digunakan berupa bahan yang dapat diperbarui (biomassa) sebagai sumber karbon, sehingga dapat bersifat kontinyu dan lebih ramah lingkungan.
- 4) Proses yang efisien. Berkembangnya teknologi DNA rekombinan untuk memperoleh mikroba unggul berpotensi untuk aplikasi bioproses yang lebih luas dan efisien.

Untuk menghasilkan produk yang melibatkan reaksi yang kompleks maka proses fermentasi yang menggunakan mikroorganisme sebagai agen penghasil produk merupakan pilihan yang menarik. Berbagai produk telah dihasilkan di industri dengan menggunakan bantuan mikroorganisme. Alasan-alasan penggunaan mikroorganisme untuk menghasilkan produk di industri antara lain:

- 1) Sel berukuran kecil dan bertindak sebagai "*mini factory*", dimana reaksi-reaksi kimia yang kompleks dan panjang terjadi di dalam sel. Kita mengenal berbagai jalur biosintesa untuk menghasilkan berbagai metabolit. Skematik jalur biosintesa metabolit primer dan sekunder ditampilkan pada Gambar 1.4.
- 2) Perkembangbiakannya cepat
- 3) Materi genetik sederhana sehingga dapat dimanipulasi untuk meningkatkan produktifitasnya atau menghasilkan karakteristik tertentu seperti yang diinginkan
- 4) Dapat tumbuh pada berbagai medium sehingga dapat disesuaikan dengan bahan baku di daerah masing-masing
- 5) Relatif tidak menghasilkan limbah toksik sehingga aman bagi lingkungan



Gambar 1.4. Jalur-jalur biosintesis untuk menghasilkan metabolit primer dan sekunder yang terjadi di dalam sel (August & Flos, 1999)

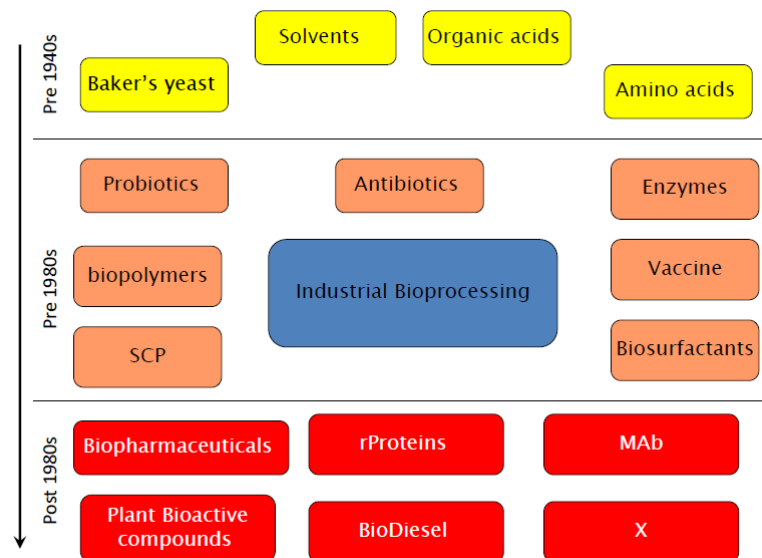
Di samping keunggulan-keunggulan di atas, bioproses juga mempunyai berbagai kelemahan-kelemahan, diantaranya adalah :

- 1) Produk yang dihasilkan bercampur dengan pengotor lainnya membentuk campuran yang kompleks, dimana sel mikroba, produk, hasil samping serta residu komponen media bercampur menjadi satu pada akhir proses. Hal ini berakibat proses hilir menjadi lebih sulit.
- 2) Konsentrasi produk dalam cairan fermentasi pada umumnya kecil dan bersifat tidak stabil terhadap lingkungan sehingga mengakibatkan proses hilir menjadi mahal.
- 3) Bioproses berisiko terjadi kontaminasi, terlebih jika proses dijalankan secara kontinyu
- 4) Variabilitas bioproses cukup besar karena sel mikroba dapat bermutasi jika mengalami perubahan lingkungan yang ekstrim yang dapat menurunkan atau bahkan menghilangkan kemampuannya dalam menghasilkan produk. Jika enzim digunakan dalam proses maka variabilitas dapat timbul disebabkan oleh faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim yang dapat berakibat menurun atau hilangnya aktivitas enzim.

3. Perkembangan Industri Bioproses

Menurut sejarahnya, bioproses telah diterapkan oleh masyarakat Babilonia sejak 6000 tahun SM. Penerapan bioproses pertama kali adalah untuk pembuatan makanan dan minuman secara fermentasi. Pada saat itu belum dipahami bahwa proses fermentasi dilakukan dengan melibatkan agen biologi yang dikenal dengan mikroorganisme. Pada tahun 1857 Louis Pasteur-lah yang mencetuskan temuannya tentang peran mikroba atau jasad renik dalam fermentasi. Secara singkat perkembangan industri bioproses diuraikan sebagai berikut:

- a. Bioproses generasi pertama atau era pra-pasteur. Tahapan ini mempunyai karakteristik memanfaatkan mikroba (bakteri, kapang, khamir) untuk pengawetan ataupun pembuatan makanan dan minuman. Sebagai contoh: keju, yogurt, minuman berakohol sake, bir, anggur, dan pangan tradisional Indonesia (tempe, kecap, tape, oncom, acar, peda). Pada tahun 1940-an, penerapan bioproses dengan menggunakan mikroba mulai berkembang untuk produksi berbagai bahan kimia seperti aseton, butanol, asam sitrat dan biomassa.
- b. Bioproses generasi kedua ditandai dengan penemuan antibiotik penisilin oleh A. Fleming (1928/1929). Hasil temuan ini baru diaplikasikan ke tahap industri pada tahun 1944. Pada era ini penerapan bioproses diwarnai oleh proses produksi antibiotik, vitamin, dan asam organik melalui fermentasi. Masa ini merupakan masa keemasan antibiotik sehingga disebut juga dengan era antibiotik.
- c. Bioproses generasi ketiga dimulai pada pertengahan tahun 1970-an yang ditandai dengan penerapan rekayasa genetika untuk memperbaiki karakteristik mikroorganisme yang berperan penting dalam bioproses. Berbagai produk farmasi yang bernilai tinggi seperti interferon, hormon, dan vaksin diproduksi melalui mikroorganisme hasil rekayasa genetik. Teknologi hibridoma yang ditemukan oleh Kohler dan Milstein (1975) mendorong dilakukannya produksi antibodi monoklonal secara komersial.



Gambar 1.5. Capaian-capaian dalam perkembangan industri bioproses

Perkembangan bioproses yang cepat telah menghasilkan berbagai produk yang bermanfaat bagi manusia, baik melalui teknologi yang konvensional maupun modern. Pada awal perkembangan bioproses, penerapan lebih banyak di bidang pangan, dan selanjutnya berkembang ke bidang-bidang lainnya. Penerapan bioproses untuk produksi asam amino menjadi salah satu contoh kesuksesan produk bioproses di industri pangan. Dua contoh produk yang telah diproduksi secara komersial adalah monosodium glutamat (MSG) yang digunakan sebagai penyedap masakan, dan lisin yang digunakan sebagai bahan tambahan makanan ternak. Penerapan bioproses untuk menghasilkan kedua produk tersebut sesuai dengan prinsip bioproses, yaitu mengubah bahan-bahan yang bernilai rendah menjadi produk bernilai tinggi dengan bantuan mikroba. Produk bioproses lainnya adalah protein sel tunggal (PST) yang dihasilkan dengan memanfaatkan substrat (sumber karbon) dari limbah pertanian yang berpati (gula). Seiring dengan perkembangan bidang bioteknologi, penerapan bioproses telah menjangkau ke bidang-bidang lain seperti industri pertanian, agroindustri, kimia, farmasi, bahan energi dan penanganan lingkungan.

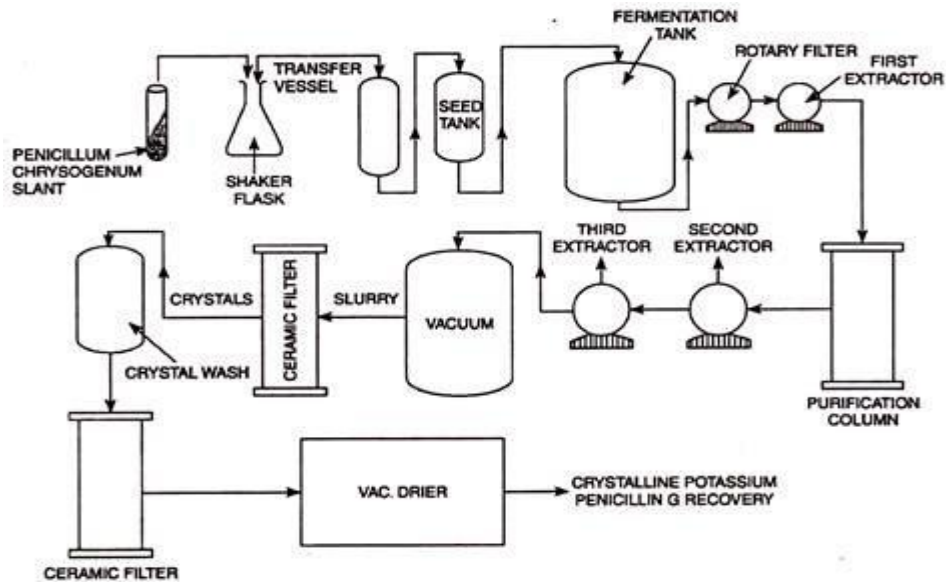
a. Sejarah Penisilin

Sejarah ditemukannya penisilin merupakan salah satu tonggak yang penting dalam sejarah perkembangan bioproses dan sekaligus contoh yang

nyata dari pemanfaatan ilmu biologi dan teknik dalam menghasilkan produk antibiotik secara komersial. Sebelum ditemukannya antibiotik, penyakit pneumonia dan demam rematik merupakan penyakit yang mematikan karena belum ada pengobatan yang efektif untuk mengatasi penyakit infeksi. Ditemukannya penisilin menjadi awal baru era antibiotik, yang digunakan sebagai obat penyakit infeksi. Sebelum ditemukannya penisilin, rumah sakit penuh dengan orang-orang keracunan darah, hingga infeksi yang diakibatkan luka goresan dan lain sebagainya. Oleh karena itu penemuan penisilin merupakan sejarah penting dalam dunia pengobatan penyakit infeksi.

Penisilin adalah antibiotik yang sangat penting. Kisah penemuan penisilin diawali dari penemuan yang tidak disengaja. Pada bulan September 1928, Alexander Fleming di Rumah Sakit St. Mary di London mencoba mengisolasi bakteri, *Staphylococcus aureus*, yang menyebabkan bisul dengan teknik menumbuhkan bakteri di permukaan media agar dalam cawan petri. Percobaan dilakukan di ruang bawah tanah. Suatu hari, jendela ruang bawah tanah tidak sengaja terbuka semalaman sehingga mengakibatkan salah satu media di cawan petri terkontaminasi secara tidak sengaja dengan benda asing. Biasanya, cawan yang terkontaminasi seperti itu akan dibuang. Namun, Fleming memperhatikan tidak ada bakteri yang tumbuh di sekitar mikroba tersebut. Kejeniusan Fleming adalah menyadari bahwa pengamatan ini bermakna dan bukan percobaan yang "gagal". Fleming menyadari bahwa sel mati pasti disebabkan oleh agen antibakteri. Dia menemukan mikroba asing dan itu adalah jamur dari genus *Penicillium* (kemudian diidentifikasi sebagai *Penicillium notatum*). Fleming selanjutnya mengkultur jamur tersebut dan mengekstraksi senyawa yang dihasilkan. Fleming berhasil mengisolasi senyawa yang memiliki sifat antimikroba yang kuat dan dinamai dengan penisilin. Penemuan tersebut baru bisa diaplikasikan di industri setelah lebih dari satu dekade. Dalam Perang Dunia II dengan banyaknya korban yang memerlukan perawatan memberikan dorongan untuk menghidupkan kembali penemuan itu. Obat dengan spektrum luas serta efek samping minimal sangat dibutuhkan. Pada tahun 1939, Howard Florey dan Ernst Chain dari Oxford memutuskan untuk mengembangkan hasil penelitian Fleming. Bekerjasama dengan Norman Heatley, seorang ahli biokimia yang berperan sebagai sarjana bioproses

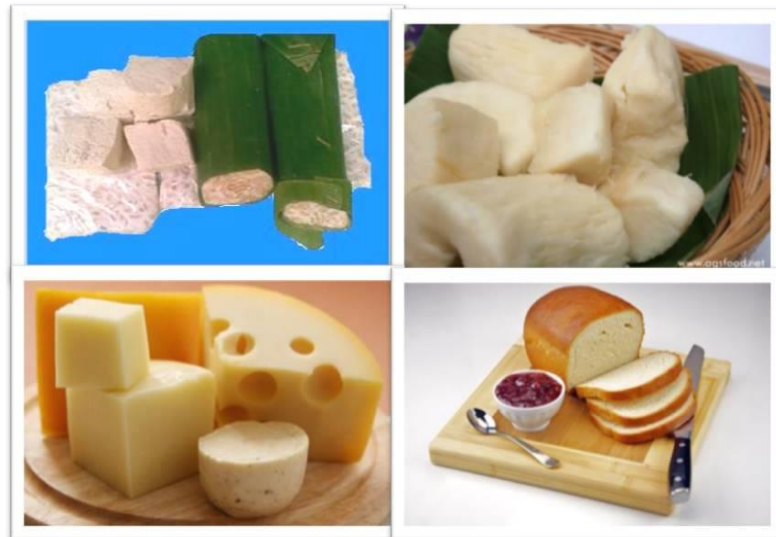
berhasil memproduksi senyawa penisilin dalam jumlah yang banyak sehingga bisa digunakan untuk uji efektifitas penisilin. Heatley berhasil mengembangkan proses produksi penisilin melalui proses fermentasi serta merancang proses ekstraksi dan purifikasinya. Pada tahap ini Florey dan Chain telah berhasil menunjukkan potensi besar penisilin. Untuk produksi dalam skala besar Florey dan Chain mendekati perusahaan farmasi di Amerika Serikat, mengingat industri yang ada di Inggris Raya saat itu sepenuhnya digunakan untuk kepentingan yang terkait dengan perang. Banyak perusahaan dan laboratorium pemerintah yang didukung oleh berbagai universitas di Amerika Serikat tertarik dengan tantangan tersebut, diantaranya Merck, Pfizer, Squibb, dan USDA Northern Regional Research Laboratory di Peoria, Illinois. Pada awalnya banyak perusahaan enggan melakukan pengembangan proses fermentasi, mengingat riset sintesis secara kimiawi saat itu sedang dilakukan secara besar-besaran. Banyak perusahaan A.S. telah mencapai banyak kesuksesan dengan sintesis kimiawi menghasilkan berbagai obat, namun sintesis kimiawi penisilin ternyata cukup rumit. Akhirnya proses fermentasi menjadi pilihan untuk produksi skala besar. Pada awalnya penisilin diproduksi dengan teknik fermentasi padat. Teknik fermentasi ini dapat menghasilkan rendemen yang tinggi, namun memerlukan waktu proses yang lama dan membutuhkan tenaga kerja yang banyak. Hal ini menyebabkan proses fermentasi secara terendam (fermentasi cair) menjadi alternatif pilihan untuk produksi penisilin secara massal. Tantangan dihadapi untuk mengatasi masalah yang terkait dengan fisiologi jamur, desain dan operasional fermentor, seperti volume fermentor yang harus besar, bersih, diperlukan pasokan udara yang bebas minyak dan steril, agitator yang besar, mekanikal seal untuk poros agitator untuk mencegah mikroba kontaminan masuk dan lain-lain. Selain masalah yang terkait dengan fermentasi juga tidak kalah penting untuk memperoleh teknologi untuk rekovery dan pemurnian penisilin. Senyawa penisilin yang bersifat mudah rusak memerlukan perancangan proses dan peralatan yang khusus. Saat ini penisilin telah dapat diproduksi melalui fermentasi cair dalam fermentor dengan kapasitas 10.000 galon ($\pm 37.000 \text{ m}^3$). Diagram alir proses produksi penisilin ditampilkan pada Gambar 1.6.



Gambar 1.6. Skema proses produksi penisilin

4. Aplikasi Bioproses

Berbagai produk baik yang dihasilkan secara tradisional maupun oleh industri modern telah dihasilkan dengan memanfaatkan teknologi bioproses. Contoh-contoh produk bioproses adalah sebagai berikut:



Gambar 1.7. Industri Makanan & Minuman tradisional



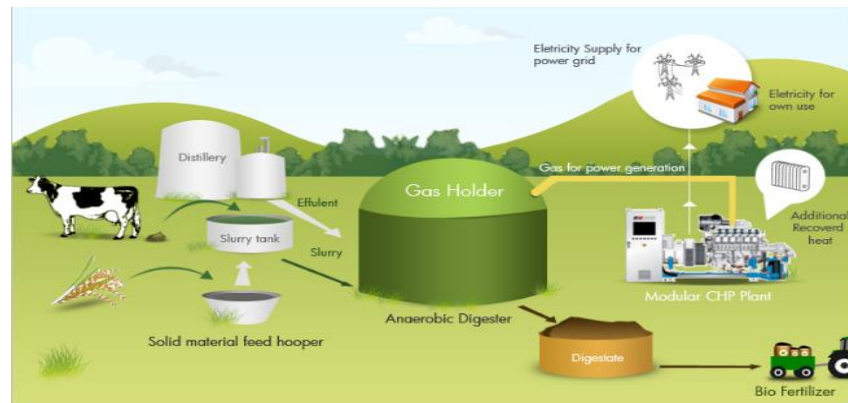
Gambar 1.8. Industri kesehatan



Gambar 1.9. Unit pengolahan limbah



Gambar 1.10. Penerapan bidang pertanian



Gambar 1.11. Energi dari biogas

C. Latihan Soal

1. Sebutkan sumber-sumber bahan terbarukan yang ada di daerah Anda yang potensial digunakan sebagai bahan baku untuk menghasilkan produk bioproses.
2. Pada proses biologi alami terdapat mikroorganisme yang merupakan salah satu komponen penting dalam siklus tersebut. Sebutkan peran mikroorganisme dalam siklus tersebut dan apa akibatnya jika mikroorganisme tidak ada.
3. Sebutkan industri besar yang ada di daerah Anda yang menerapkan bioproses.
4. Sebutkan masing-masing lima aplikasi bioproses lainnya di bidang pangan dan kesehatan selain contoh yang telah disebutkan di dalam buku modul
5. Carilah video tentang berbagai proses produksi produk bioproses dan buatlah ringkasannya

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- August, P.R., Yu, T-N and Floss, H.G. "Molecular biological aspects of antibiotic biosynthesis." Drug Discovery from Nature. Ed. Grabley, S and Thiericke, R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. 215-232.

Back, J. G., (1996). Microbiology: Principles and Applications, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Liu, S. and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier

Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

PERTEMUAN 2

SEL MIKROORGANISME

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami keanekaragaman hayati
2. Memahami klasifikasi organisme
3. Memahami komposisi kimiawi sel dan fungsinya

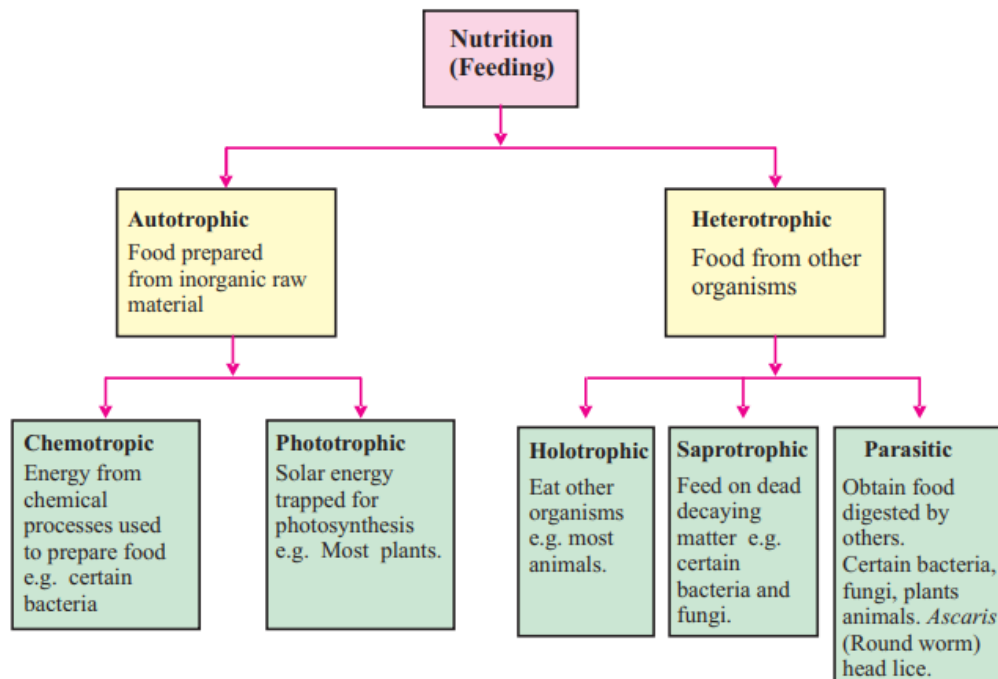
B. Uraian Materi

1. Biodiversitas Hayati

Kita dapat menemukan organisme hidup di sekitar kita, bahkan jauh di bawah lautan dan di Kutub Utara serta Antartika yang tertutup salju. Ada organisme yang bersel tunggal dan mikroskopis, serta hewan sebesar gajah, badak, kuda nil dan paus. Jika Anda mengambil setetes air dari kolam terdekat dan melihatnya di bawah mikroskop Anda akan kagum melihat berbagai macam organisme yang bergerak di setetes air. Anda mungkin bertanya-tanya berapa banyak jenis organisme akan ada di bumi! Diperkirakan sekitar 10 hingga 15 juta jenis organisme yang berbeda telah ditemukan di bumi termasuk yang hidup di masa lalu. Namun, para ilmuwan sampai saat ini masih hanya mampu mengidentifikasi lebih dari dua juta saja. Keanekaragaman organisme yang sangat besar disebut keanekaragaman hayati (*bios* berarti kehidupan dan *diversity* berarti keragaman). Tidak hanya perbedaan ukuran antar organisme, tetapi juga dalam kompleksitasnya, misal bakteri adalah organisme bersel tunggal sederhana sedangkan manusia tersusun dari triliun sel yang sangat kompleks. Sayangnya banyak jenis organisme telah hilang dari muka bumi karena ulah kegiatan manusia. Oleh karena itu, kita harus sadar dan waspada untuk menjaga bumi agar bumi ini tidak rusak, di mana tempat kita hidup bersama dengan organisme lainnya.

Terlepas dari berbagai ukuran dan kompleksitas, terdapat keragaman organisme berdasarkan cara memperoleh makan, reproduksi, habitat dan

fungsi tubuh lainnya. Contoh keragaman dalam cara memperoleh makanan ditampilkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Keragaman organisme berdasarkan sumber makanannya

Keragaman lainnya berdasarkan habitatnya. Beberapa sel dapat tumbuh pada -20°C (dalam air garam untuk mencegah pembekuan), sementara yang lain dapat tumbuh pada 120°C (di mana air harus berada di bawah tekanan yang cukup tinggi untuk mencegah mendidih). Sel yang tumbuh baik pada suhu rendah (di bawah 20°C) biasanya disebut *psikrofil*, sedangkan yang tumbuh dengan optimal dalam suhu kisaran 20° hingga 50°C adalah *mesofil* dan yang tumbuh baik pada suhu lebih besar dari 50°C adalah *termofil*.

Banyak organisme memiliki pertumbuhan pada pH optimal jauh dari pH netral. Beberapa organisme lebih suka tumbuh pada pH rendah pada pH 1 atau 2, sementara yang lain dapat tumbuh dengan baik pada pH 9. Beberapa organisme dapat tumbuh sekaligus pada pH rendah dan suhu tinggi. Meskipun sebagian besar organisme hanya dapat tumbuh di tempat dengan aktivitas air yang tinggi, namun terdapat pula organisme yang dapat tumbuh pada permukaan padat yang hampir tidak ada kelembaban atau dalam larutan dengan konsentrasi garam yang tinggi.

Beberapa sel membutuhkan oksigen untuk pertumbuhan dan metabolisme. Organisme semacam itu dapat disebut *aerobik*. Organisme lain

dihambat oleh adanya oksigen dan hanya tumbuh secara *anaerobik*. Beberapa organisme dapat mengubah jalur metabolismenya sehingga dapat tumbuh dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, yang disebut dengan *fakultatif*. Seringkali organisme dapat tumbuh di lingkungan yang hampir tidak memiliki sumber nutrisi yang jelas. Beberapa *cyanobacteria* (sebelumnya disebut ganggang biru-hijau) dapat tumbuh di lingkungan dengan hanya sedikit kelembaban dan mineral terlarut. Bakteri ini merupakan bakteri fotosintetik yang dapat mengubah CO_2 dari atmosfer menjadi senyawa organik yang diperlukan untuk kehidupan. Bakteri ini juga dapat mengubah N_2 menjadi NH_3 untuk digunakan dalam membuat nutrisi penting untuk kelangsungan hidupnya. Organisme-organisme tersebut penting untuk lingkungan yang mempunyai sedikit nutrisi. Organisme dari lingkungan ekstrim ini (*ekstremofil*) sering dimanfaatkan manusia untuk menghasilkan produk yang berguna. Organisme ini juga merupakan kunci untuk terpeliharanya siklus alami dan dapat digunakan dalam rekovery bijih logam kadar rendah atau dimanfaatkan dalam desulfurisasi batubara atau bahan bakar lainnya. Fakta ini menunjukkan bahwa organisme dapat ditemukan di seluruh lingkungan di bumi ini termasuk yang paling ekstrim sekalipun dan telah berevolusi secara menakjubkan berdasarkan bentuk, ukuran, dan kemampuan metabolisme. Keanekaragaman yang besar ini memberikan peluang bagi para sarjana untuk memanfaatkannya bagi kesejahteraan umat manusia.

a. Tingkat Keanekaragaman Hayati

Semua jenis organisme yang hidup di bumi merupakan keanekaragaman hayati. Terdapat tiga tingkat keanekaragaman hayati telah diakui, yaitu:

1) Keanekaragaman Ekologi/Ekosistem

Organisme mempunyai organ-organ khusus yang membantu mereka beradaptasi dengan lingkungan atau ekosistem tempat mereka hidup. Perbedaan ekosistem dapat mengakibatkan perbedaan organisme yang hidup meskipun dari jenis yang sama. Misalnya kura-kura darat dan kura-kura air. Keduanya terkait tetapi sangat berbeda terutama di kaki mereka. Keanekaragaman ekosistem darat meliputi hutan, dataran, gurun dan pegunungan dan ekosistem perairan meliputi laut, sungai, kolam dll. Organisme yang hidup di dalamnya telah

berkembang dan beradaptasi sesuai dengan ekosistemnya masing-masing.

2) Keanekaragaman spesies

Adanya berbagai spesies yang hidup dalam suatu wilayah geografis tertentu merupakan bentuk keanekaragaman spesies. Individu organisme dari spesies tertentu yang serupa dapat bereproduksi menghasilkan keturunan. Namun mereka tidak dapat kawin silang dengan spesies lain. Kita mengenal keragaman spesies yang sangat besar dari berbagai spesies tumbuhan, hewan dan mikroorganisme dengan berbagai keragaman gen di dalamnya.

3) Keragaman genetik

Organisme tersusun atas sel dan inti sel yang berisi kromosom yang mengandung gen. Gen mengontrol setiap organ dari spesies tertentu. Gen dari spesies yang sama adalah serupa. Setiap spesies memiliki sekumpulan gen. Kumpulan gen artinya sejumlah jenis gen yang berbeda yang ditemukan dalam suatu spesies. Kumpulan gen dari spesies tersebut berbeda satu sama lainnya.

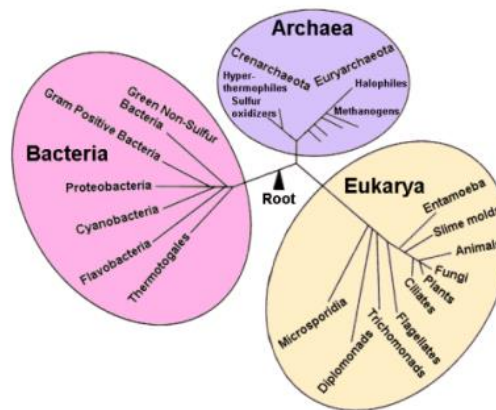
b. Peran Keanekaragaman Hayati dalam Menjaga Keharmonisan di Alam

Keanekaragaman hayati sangat diperlukan untuk mempertahankan keseimbangan yang ada di alam sehingga semua jenis organisme yang ada dapat bertahan. Bakteri dan jamur mendaur ulang bahan organik untuk memberi makan beragam organisme. Alga dan tumbuhan mengolah energi matahari untuk fotosintesis dan menghasilkan makanan untuk semua makhluk hidup. Serangga dan kelelawar menyerbuki bunga. Demikian juga dengan hewan juga berperan dalam menyebarkan benih. Ekosistem seperti hutan, gurun, badan air, lahan basah mempertahankan ciri khasnya masing-masing dengan berbagai keanekaragaman hayatinya, sehingga menciptakan rantai makanan dan jaring makanan yang unik.

2. Klasifikasi Organisme

Kita telah mengetahui adanya jumlah spesies yang sangat besar ada di muka bumi ini. Bagaimana keanekaragaman makhluk hidup yang sangat besar ini dapat dipelajari dan dipahami? Hal ini telah dapat dipecahkan dengan cara mengklasifikasikan beragam jenis organisme tersebut dan memberikan nama

ilmiahnya. Klasifikasi makhluk hidup ini dikenal dengan istilah taksonomi. Organisme hidup diklasifikasikan ke dalam kelompok-kelompok tergantung pada struktur dan karakteristiknya. Organisme hidup diklasifikasikan menjadi tiga domain (Gambar 2.2), yaitu: **Archaeobacteria** adalah bakteri termofilik atau bakteri suka panas yang hidup di suhu udara yang tinggi. **Eubacteria** organisme bersel tunggal tanpa nukleus yang berkembang sempurna. **Eukarya** semua organisme lainnya dengan nucleus yang terbentuk secara sempurna dalam selnya. (Eu: benar; Karyon: inti)



Gambar 2.2. Tiga domain organisme berselular

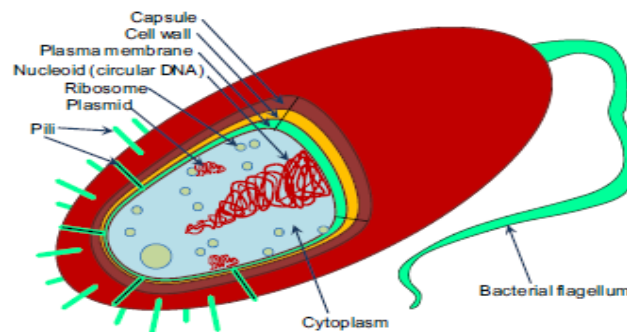
Tabel 2.1. Subdivisi utama organisme seluler (Shuller & Khargi, 2001)

Group	Cell structure	Properties	Constituent groups
Eucaryotes	Eucaryotic	Multicellular; extensive differentiation of cells and tissues Unicellular, coenocytic or mycelial; little or no tissue differentiation	Plants (seed plants, ferns, mosses) Animals (vertebrates, invertebrates) Protists (algae, fungi, protozoa)
Eubacteria	Procaryotic	Cell chemistry similar to eucaryotes	Most bacteria
Archaeobacteria	Procaryotic	Distinctive cell chemistry	Methanogens, halophiles, thermo-acidophiles

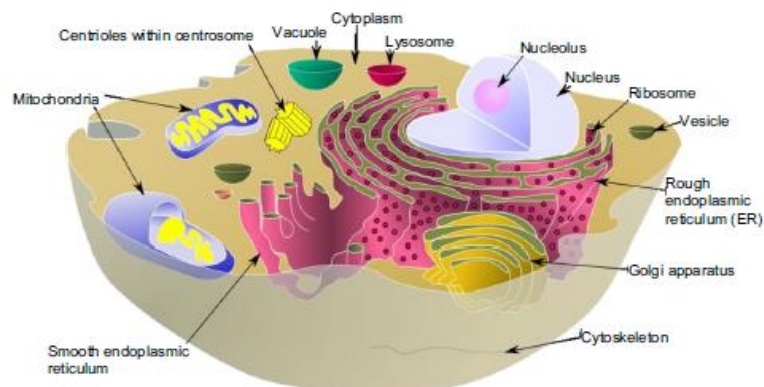
Berdasarkan organisasi struktur selnya atau organisasi bahan selulernya maka sel dapat dikelompokkan menjadi:

- Prokariot (tanpa membran inti sel)
- Eukariot (mempunyai membran inti sel)

Prokariot memiliki struktur sederhana dengan satu kromosom (Gbr. 2.3). Sel prokariot tidak memiliki membran inti dan tidak memiliki organel (seperti mitokondria dan retikulum endoplasma). Eukariot memiliki struktur internal yang lebih kompleks, dengan lebih dari satu kromosom (molekul DNA) di dalam nukleus. Sel eukariotik memiliki membran inti sejati dan mengandung berbagai organel khusus seperti mitokondria, retikulum endoplasma, dan aparatus Golgi (Gambar 2.4). Perbandingan rinci prokariota dan eukariota disajikan pada Tabel 2.2.



Gambar 2.3. Struktur sel prokariot (Liu & Suny, 2013)



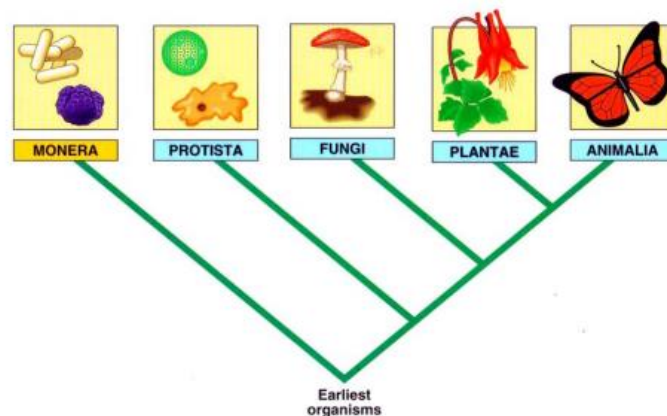
Gambar 2.4. Struktur sel eukariot (Liu & Suny, 2013)

Tabel 2.2. Perbandingan sel Prokariot dan Eukariot (Shuller & Khargi, 2001)

Characteristic	Procaryotes	Eucaryotes
Genome		
No. of DNA molecules	One	More than one
DNA in organelles	No	Yes
DNA observed as chromosomes	No	Yes
Nuclear membrane	No	Yes
Mitotic and meiotic division of the nucleus	No	Yes
Formation of partial diploid	Yes	No
Organelles		
Mitochondria	No	Yes
Endoplasmic reticulum	No	Yes
Golgi apparatus	No	Yes
Photosynthetic apparatus	Chlorosomes	Chloroplasts
Flagella	Single protein, simple structure	Complex structure, with microtubules
Spores	Endospores	Endo- and exospores
Heat resistance	High	Low

a. Klasifikasi Lima Kingdom

Pada awalnya hanya terdapat 2 kingdom, yaitu tumbuhan dan hewan. Whittaker pada tahun 1969 mengusulkan bahwa bakteri tidak boleh berada di kingdom tumbuhan dan protozoa tidak berada di kingdom hewan. Selanjutnya dia mengusulkan klasifikasi lima kingdom dengan pembagian dan ciri khasnya sebagai berikut:



Gambar 2.5. Klasifikasi organisme berdasarkan 5 kingdom

1) Kingdom MONERA

Mencakup organisme mikroskopis bersel tunggal dengan dinding sel, namun tidak mempunyai inti sel (nukleus). Contoh: semua bakteri.

2) Kingdom PROTOCTISTA (PROTISTA)

Termasuk organisme bersel tunggal dengan nukleus yang telah terbentuk dengan sempurna. Contoh: Amoeba, parasit malaria, Chlamydomonas.

3) Kingdom FUNGI

Termasuk organisme multiseluler atau bersel banyak. Tubuh terbuat dari jaringan (miselium) benang halus yang disebut hifa. Makanan jamur merupakan bahan organik mati yang membusuk (saprotrof). Contoh: Jamur, ragi, jamur roti.

4) Kingdom PLANTAE

Meliputi Eukariota multiseluler dengan dinding sel berupa selulosa dan terdapat klorofil di dalam selnya. Bersifat autotrof sehingga dapat melakukan fotosintesis.

5) Kingdom ANIMALIA

Termasuk organisme multiseluler, eukariota. Heterotrof sehingga memakan tumbuhan atau hewan lain. Memiliki organ khusus untuk bergerak atau berpindah dari satu tempat ke tempat lain. Memiliki sistem saraf dengan alat indera.

Selanjutnya kingdom dibagi menjadi divisi (phylum), kelas, ordo, keluarga (family), genus dan spesies.

b. Penamaan Organisme

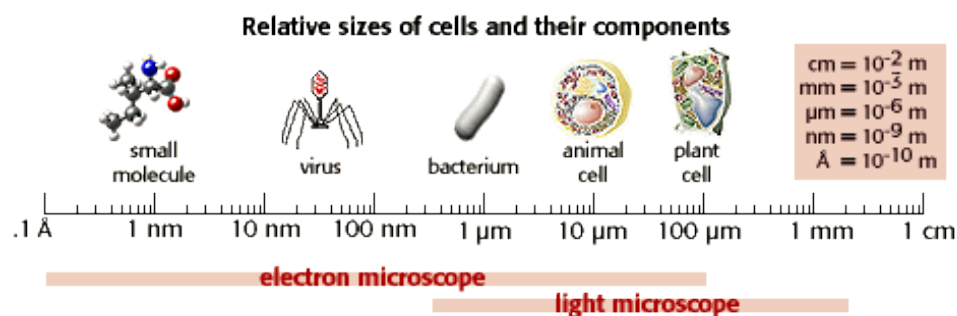
Setiap organisme memiliki nama ilmiah di samping nama yang dikenal dalam berbagai bahasa. Misalnya, mangga adalah namanya dalam bahasa Indonesia, mango dalam Inggris, dan Aam dalam bahasa Hindi. Penamaan ilmiah diberikan berdasarkan genus dan spesies organisme tersebut, yaitu: *Mangifera indica*. Penamaan ilmiah ini dapat menunjukkan identitas spesifik dari organisme tertentu dan mempunyai beberapa keunggulan dan ketentuan sebagai berikut:

- 1) Dapat dipahami di seluruh dunia.
- 2) Terdiri dari dua kata, nama genus yang dimilikinya dimulai dengan huruf kapital dan nama spesies dimulai dengan huruf kecil. Contoh: kucing nama ilmiahnya adalah *Felis domestica* dimana *Felis* adalah nama genus dan *domestica* nama dari spesies.
- 3) Nama ilmiah selalu ditulis miring atau digarisbawahi. Penamaan dengan dua nama adalah sistem penamaan Binomial (penamaan) yang

diperkenalkan oleh naturalis Swedia abad ke-18, Carolus Linnaeus. Contoh lain adalah organisme yang hidup di usus yaitu *Escherichia coli*. *Escherichia* adalah genus dan *coli* adalah nama spesiesnya. Dalam penulisan ilmiah untuk lebih praktisnya dapat ditulis dengan *E. coli*. Organisme yang berasal dari spesies yang sama mempunyai karakteristik utama yang sama, namun adakalanya terdapat variasi kecil dalam spesies yang sama dan hal ini sangat penting secara teknologi. Galur *E. coli* yang digunakan di satu laboratorium mungkin berbeda dengan yang digunakan di laboratorium lain. Oleh karena itu perlu ditambahkan nama sub-galur dengan menambahkan huruf dan angka dibelakangnya. Misalnya, *E. coli* fBr5 akan berbeda dalam pertumbuhan dan sifat fisiologis dari *E. coli* K01.

3. Komposisi Kimia Sel

Semua makhluk hidup terdiri dari sel. Sel merupakan satuan kehidupan terkecil yang menyusun tubuh makhluk hidup dimana tempat terselenggaranya fungsi kehidupan. Beberapa organisme, seperti sebagian besar bakteri bersifat uniseluler (terdiri dari satu sel). Organisme lain, seperti manusia, hewan, tumbuhan, algae, fungi dan protozoa bersifat multiseluler. Pada umumnya ukuran sel adalah 1-100 μm dengan berat 1 ng. Manusia memiliki sekitar 100 triliun atau 10^{14} sel dengan ukuran sel adalah 10 μm serta massa sel yang adalah 1 ng. Gambar 2.6 menunjukkan ukuran dari berbagai sel.



Gambar 2.6. Ukuran berbagai sel

Sel hidup tersusun atas senyawa polimer dengan berat molekul tinggi seperti protein, asam nukleat, polisakarida, lipid, dan bahan penyimpanan

lainnya (lemak, polihidroksibutirat, glikogen). Biopolimer ini merupakan elemen struktural utama makhluk hidup. Misalnya, dinding sel bakteri mengandung polisakarida, protein, dan lemak; sitoplasma sel mengandung protein sebagian besar dalam bentuk enzim; pada eukariota, inti sel mengandung asam nukleat sebagian besar dalam bentuk DNA. Selain biopolimer, sel juga mengandung metabolit lain dalam bentuk garam anorganik (misalnya, NH_4^+ , PO_4^- , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , SO_4^{2-}), zat antara metabolisme (misalnya, piruvat, asetat) dan vitamin.

Komposisi kimia sel mikroba (untuk sel bakteri) adalah sebagai berikut:

- a. **Air:** 80-90 % berat kering sel, sisanya terdiri dari: C (50 %), O (20 %), N (14 %), H (8 %), P (3 %), S (1 %) dan sekitar 18 unsur (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-) dan vitamin. Senyawa-senyawa ini penting digunakan untuk membentuk komponen utama sel, seperti: protein, asam nukleat, polisakarida dan lemak
- b. **Asam Amino dan Protein:** Protein tersusun dari asam amino bentuk L (bentuk D sangat jarang dijumpai di alam; namun banyak terdapat di dinding sel). Protein memiliki beragam fungsi biologis, yang dapat diklasifikasikan dalam lima kategori utama, yaitu:
 - 1) Protein struktural: glikoprotein, kolagen, keratin. Glikoprotein merupakan senyawa pembentuk dinding sel
 - 2) Protein katalis biologis: enzim
 - 3) Protein transport: hemoglobin, serum albumin
 - 4) Protein pengatur: Hormon (insulin, hormon pertumbuhan, hormon reproduksi dll)
 - 5) Protein pelindung: antibody, trombin
- c. **Karbohidrat.** Terdiri dari mono- dan polisakarida. Karbohidrat memainkan peran kunci sebagai senyawa struktural dan penyimpanan energi dalam sel. Senyawa ini juga berperan penting dalam memodulasi beberapa pensinyalan kimiawi pada hewan dan tanaman. **Glikogen** (contohnya murein) merupakan peptidoglikan dalam dinding sel bakteri terdiri dari N-acetyl-D-glucosamine + N-acetyl-muramic acid.
- d. **Lipid, lemak dan steroid.** **Lipid** pada umumnya terdapat pada komponen biologis yang tidak mengandung air, seperti membran plasma. **Lemak** adalah lipid yang dapat berfungsi sebagai molekul penyimpan bahan bakar biologis. Lipoprotein dan lipopolisakarida adalah jenis lainnya dari lipid, yang terdapat pada membran sel. Sel dapat mengubah komposisi lipid yang ada dalam membran sel untuk mengkompensasi perubahan suhu atau untuk

meningkatkan toleransi sel terhadap kehadiran agen kimia asing seperti etanol. **Steroid** juga dapat diklasifikasikan sebagai lipid. Steroid terbuat dari sterol dimana variasi steroid ditentukan berdasarkan gugus fungsionalnya. Steroid yang terbentuk secara alami contohnya adalah hormone, dimana pada konsentrasi yang sangat rendah (misalnya, 10^{-8} M) berfungsi mengatur perkembangan dan metabolisme pada hewan. Salah satu steroid yang terkenal adalah kolesterol, yang terdapat dalam membran jaringan hewan. Gambar 2.7 menggambarkan struktur steroid penting lainnya, yaitu kortison. Kortison adalah senyawa antiinflamasi yang digunakan untuk mengobati rheumatoid arthritis dan beberapa penyakit kulit. Steroid lainnya adalah estrogen dan progesteron yang digunakan sebagai kontrasepsi. Karena banyaknya pusat asimetris, maka sintesis kimiawi steroid secara total sangat sulit. Tumbuhan menyediakan sumber prekursor lipid yang melimpah untuk sintesis steroid, tetapi hidroksilasi substrat yang sangat spesifik pada posisi 11 (dan 16) atau dehidrogenasi pada posisi 1 diperlukan untuk mengubah prekursor menjadi senyawa yang mirip dengan senyawa yang dihasilkan di kelenjar adrenal. Hal ini tidak mudah jika dilakukan sintesis secara kimiawi dan harus dilakukan dengan bantuan mikroba yang mempunyai enzim yang mampu menghidroksilasi atau dehidrogenasi secara spesifik. Oleh karena itu untuk tujuan komersial produksi steroid harus dilakukan dengan bantuan mikroba.



Gambar 2.7. Struktur steroid kortison dan aplikasinya untuk pengobatan rheumatoid arthritis dan beberapa penyakit kulit.

- e. **Asam Nukleat, RNA dan DNA.** Berperan utama dalam mekanisme reproduksi, terbuat dari nukleotida yang juga sebagai molekul untuk menyimpan energi, koenzim & agen pereduksi. Nukleotida penting: ATP

(adenosine-triphosphate) dan GTP (guanine-triphosphate) yang berfungsi sebagai pembawa energi (ADP, AMP, cAMP). ADP berfungsi pembawa residu gula pada sintesis polisakarida, sebagai Coenzyme A yang bergabung dengan acetyl membentuk acetyl CoA (awal Siklus Krebs), serta NAD, NADP & FMN (nicotine-amid-adenine- (phosphate) dan flavin-mononucleotide) berperan sebagai pembawa “*reducing power*”.

C. Latihan Soal

1. Jelaskan apa yang dimaksud dengan keanekaragaman hayati. Sebutkan tiga tingkatannya dan jelaskan secara singkat. Mengapa keanekaragaman hayati perlu dipertahankan.
2. Buatlah diagram alir untuk pengelompokan sel seperti yang diberikan pada contoh Gambar 2.1 berdasarkan perbedaan reproduksi: aseksual, seksual, induk tunggal, dan dua induk.
3. Buatlah diagram alir untuk pengelompokan sel seperti diatas berdasarkan perbedaan respirasi: oksigen dari air, oksigen dari atmosfer, karbon dioksida menjadi air, ke atmosfer, insang, paru-paru, anaerobik, aerobik.
4. Sebutkan kelas utama dari jamur. Sebutkan pula perbedaan di antara kelas-kelas ini secara singkat.
5. Jelaskan secara singkat bagian-bagian dari *actinomyces* dan sebutkan produk-produk penting yang dapat dihasilkan oleh *actinomyces*.

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Back, J. G., (1996). Microbiology: Principles and Applications, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Liu, S. and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier

Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

PERTEMUAN 3

ISOLASI, SKRINING, PRESERVASI DAN PENGEMBANGAN MIKROBA INDUSTRI

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami pengertian mikroba industri dan karakteristiknya
2. Memahami teknik-teknik isolasi, skrining, dan identifikasi mikroorganisme
3. Memahami teknik-teknik preservasi dan pengembangan mikroba industri

B. Uraian Materi

1. Pengertian dan Karakteristik Mikroba Industri

a. Pengertian dan Jenis Produk yang Dihasilkan

Milyaran mikroorganisme hidup di alam berkelompok dan bercampur dengan mikroorganisme yang lain. Untuk memperoleh mikroba yang diinginkan maka harus dilakukan pemisahan mikroba tersebut dari yang lainnya sehingga diperoleh kultur tunggal atau campuran yang selanjutnya diidentifikasi peranannya dalam menghasilkan produk tertentu. Isolasi dan penapisan (skrining) merupakan tahap awal untuk memperoleh mikroba yang diinginkan.

Mikroba industri merupakan mikroba yang digunakan untuk menghasilkan produk dalam jumlah yang besar. Mikroorganisme yang penting bagi industri pada umumnya dari genus bakteri, actinomycetes, jamur dan ganggang. Ruang lingkup mikrobiologi industri meliputi pemanfaatan mikroba untuk memperoleh suatu produk atau jasa yang mempunyai nilai ekonomi. Produk mikroba dapat berupa:

- 1) sel mikroba (hidup atau mati), biomassa mikroba, komponen sel mikroba, metabolit mikroba
- 2) enzim intraseluler atau ekstraseluler
- 3) bahan kimia yang dihasilkan oleh mikroba dengan memanfaatkan media atau substrat

- 4) senyawa termodifikasi yang dihasilkan melalui transformasi secara mikrobiologis
- 5) produk rekombinan yang diperoleh melalui teknologi rekombinan DNA.

Layanan yang dihasilkan oleh mikroorganisme antara lain:

- 1) penguraian sampah organik
- 2) detoksifikasi limbah industri dan senyawa beracun
- 3) degradasi minyak bumi untuk mengelola tumpahan minyak, dll.
- 4) produksi agen biokontrol, inokulan yang digunakan sebagai pupuk hayati, biofuel: dll.

b. Karakteristik Mikroba Industri yang Penting

Seringkali mikroba industri merupakan mikroba hasil rekayasa genetika atau seleksi dengan metode genetik untuk memperoleh varian mikroba dengan produktifitas tinggi sehingga dapat tercapai proses yang layak secara ekonomi. Sifat-sifat mikroba industri dapat berbeda jauh dengan sifat-sifat mikroba alaminya. Mikroorganisme yang digunakan dalam proses industri harus memiliki karakteristik penting antara lain adalah:

- 1) Mampu tumbuh dan menghasilkan produk melalui proses fermentasi dalam skala besar.
- 2) Mampu menghasilkan spora (jika jamur atau ragi) atau bentuk sel reproduksi lainnya sehingga mudah diinokulasikan ke dalam fermentor untuk produksi skala industri.
- 3) Mampu tumbuh dengan cepat, menghasilkan produk diinginkan dalam waktu yang relatif singkat serta tidak menghasilkan produk samping yang toksik.
- 4) Dapat tumbuh menggunakan media yang tersedia dalam jumlah besar dan murah. Berbagai proses mikrobiologi industri menggunakan limbah karbon dari industri sebagai bahan utama atau tambahan untuk media fermentasi skala besar.
- 5) Tidak bersifat patogen, terutama bagi manusia dan hewan atau tumbuhan yang bernilai ekonomis. Karena selama proses di industri melibatkan kepadatan sel yang tinggi maka sangat sulit menghindari kontaminasi lingkungan di luar fermentor. Penggunaan mikroba yang bersifat pathogen akan sangat membahayakan.
- 6) Mikroba industri harus dapat direkayasa secara genetik. Mikroba dengan produktifitas tinggi sering kali diperoleh melalui mutasi genetik.

- 7) Bersifat stabil dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang panjang.

c. Sumber Mikroba Industri

Sebagai sumber mikroba industri dapat diperoleh dari:

- 1) Lembaga kultur koleksi, beberapa diantaranya ditampilkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Lembaga penyedia kultur koleksi

Culture collection	Supplier
National Collection of Type Cultures (NCTC)	PHLS Central Public Health Laboratory, UK
National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIB, NCMB)	NCIB, NCMB, UK
National Collection of Yeast Cultures (NCYC)	AFRC Institute of Food Research, Norwich Laboratory, UK
Collection of International Mycological Institute (IMI)	Culture Collection and Industrial Service Division, UK
American Type Culture Collection (ATCC)	ATCC, USA
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	DSMZ, Germany
Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)	CBS, Netherlands
Czechoslovak Collection of Microorganisms (CCM)	Masaryk University, Czech Republic
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)	Institut Pasteur, France
Japan Collection of Microorganisms (JCM)	Riken, Japan
Culture Collection of the Institute for Fermentation (IFO)	Institute for Fermentation, Japan

Di Indonesia, beberapa perguruan tinggi juga mempunyai koleksi kultur seperti, Nutrition and Food Culture Collection (NFCC) PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta, yang banyak mengkoleksi berbagai jenis mikroorganisme untuk industri pangan. Demikian juga di Lembaga Penelitian Pemerintah seperti Badan Riset Inovasi Nasional (BRIN) yang ada di Serpong, Cibinong dll.

- 2) Skrining dari habitat alami. Metode skrining mikroba dari habitat alami diuraikan pada sub-bab berikut.

d. Isolasi dan skrining mikroorganisme

Prosedur isolasi, deteksi, dan pemisahan mikroorganisme dari populasi campuran dengan menggunakan prosedur yang sangat selektif disebut skrining atau penapisan. Mikroorganisme yang penting bagi industri pada umumnya berasal dari genus bakteri, actinomycetes, jamur dan ganggang. Organisme ini terdapat hampir di semua tempat seperti udara, air, tanah, permukaan tumbuhan dan hewan, dan jaringan tumbuhan dan hewan. Namun sumber mikroorganisme industri yang paling umum adalah

tanah, danau, dan lumpur sungai. Habitat ekologi mikroorganisme dapat digunakan sebagai dasar untuk mengisolasi mikroba yang dapat menghasilkan produk diinginkan. Sebagai contoh, jika tujuannya adalah untuk mengisolasi mikroba penghasil enzim yang thermo stabil, maka tempat yang potensial untuk pengambilan sampel adalah dari mata air panas.

Isolasi. Berbagai prosedur isolasi yang kompleks telah dikembangkan, namun tidak ada metode tunggal yang dapat digunakan untuk memperoleh semua mikroorganisme yang ada dalam suatu sampel. Isolasi bertujuan untuk memperoleh kultur murni yang meliputi proses mendeteksi dan mengisolasi mikroorganisme yang diinginkan. Dari populasi mikroorganisme yang tumbuh pada medium tertentu dipilih mikroorganisme yang mampu menghasilkan produk yang diinginkan. Isolasi mikroorganisme untuk mendapatkan kultur murni dapat dilakukan melalui teknik:

- 1) Penggoresan (*Streak-plate*) dan Penyebaran (*Spread-plate*)
- 2) Penuangan (*Pour-plate*)
- 3) Pengenceran Berseri (*Serial-dilution*)
- 4) Kultur yang Diperkaya (*Enrichment Culture*)
- 5) Isolasi Sel Tunggal

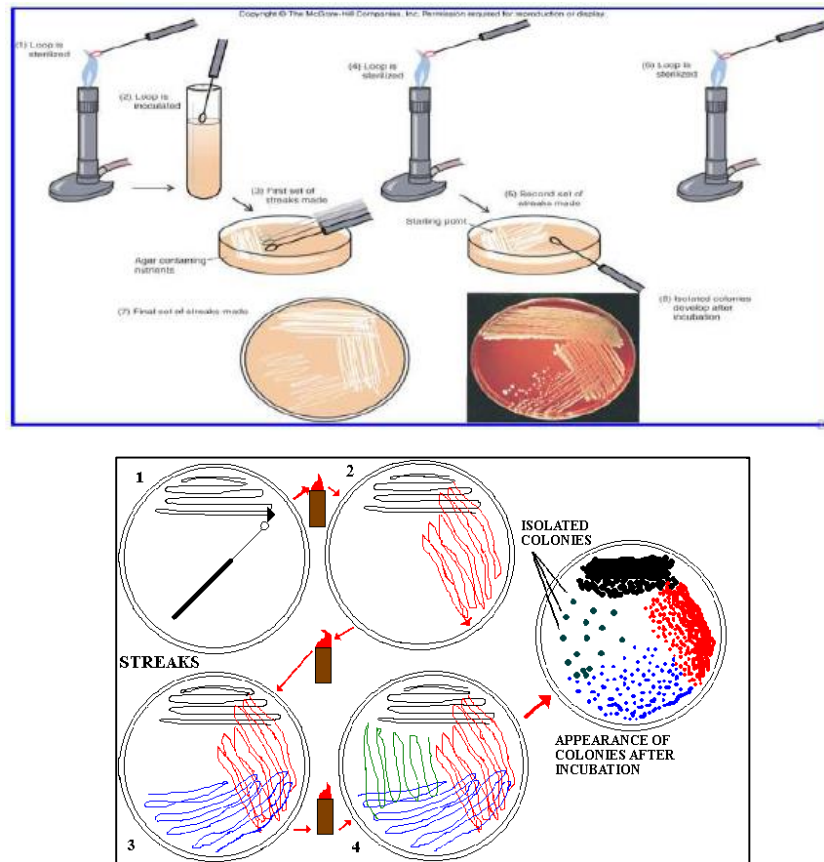
Penjelasan teknik untuk Isolasi mikroorganisme untuk mendapatkan kultur murni adalah sebagai berikut:

- 1) Teknik Penggoresan (*Streak-plate*) dan Penyebaran (*Spread-plate*)
 - a) Teknik ini paling sering digunakan guna memperoleh kultur murni bakteri.
 - b) Menggunakan peralatan yang sederhana yaitu jarum ose, yang terdiri dari gagang kayu atau kaca dengan kawat nikel-chrome yang ujungnya ditekuk membentuk lingkaran digunakan untuk mengambil mikroba dari kultur.
 - c) Koloni dari medium padat digoreskan ke permukaan media nutrisi agar dalam cawan petri steril.

Kelemahan Teknik ini adalah:

- (1) Hanya dapat menggunakan jumlah sampel yang kecil untuk digunakan/digoreskan pada media
- (2) Dua sel dapat bergabung membentuk satu koloni, contoh: bakteri yang menghasilkan lendir & yang tidak menghasilkan

lender dapat bergabung membentuk satu koloni. Pencegahan dilakukan dengan menambahkan deterjen.



Gambar 3.2. Isolasi mikroba dengan teknik (a) penggoresan dan (b) teknik penggoresan kuadran

2) Teknik Penuangan (*Pour-plate*)

Metode Penuangan dilakukan dengan cara:

- Kultur bakteri dan media agar cair dicampur bersama-sama.
- Setelah tercampur, media berisi kultur dituangkan ke dalam cawan petri steril
- Media di dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat dan selanjutnya diinkubasi sesuai kondisi yang diinginkan.
- Setelah inkubasi, koloni muncul di permukaan medium agar. Pengamatan dapat dilakukan secara kualitatif (morfologi) & kuantitatif (jumlah sel mikroba)

Teknik penggoresan/penyebaran dan penuangan ini lebih efektif jika menggunakan media selektif/diferensial atau dengan perlakuan

husus sebelum penanaman pada cawan agar. Contoh: Isolasi bakteri pembentuk spora. Sampel terlebih dipanaskan s.d 85°C selama 5 menit. Contoh media selektif dan diferensial adalah sebagai berikut :

a) Media Selektif:

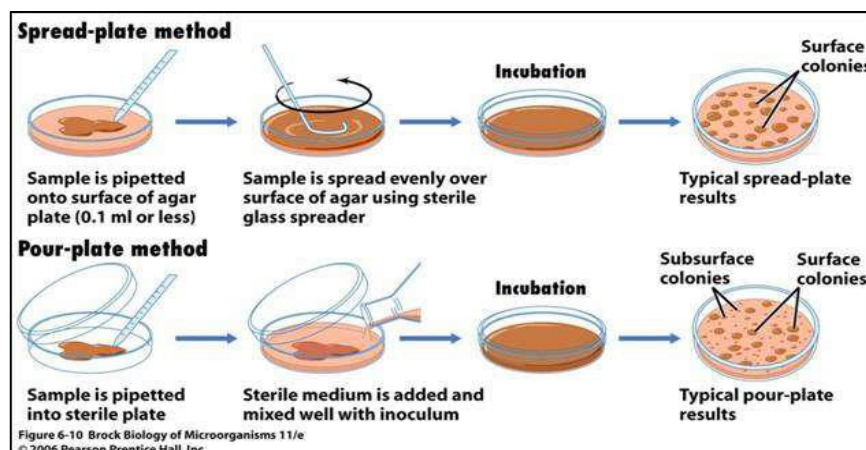
- (1) Media dengan NaCl 7,5 % untuk mengisolasi *Staphylococcus* dari faeces
- (2) Media BGLBB (*brilliant green lactose bile broth*) untuk mengisolasi *Salmonellae*

b) Media Diferensial:

- (1) Media agar EMB (*eosin-methylene blue agar*) akan terbentuk koloni yang berbeda dan mudah dikenali
E. coli: hijau kehitaman/hijau metalik
Aerobacter aerogenes: tengah ungu tua/coklat, tepi ungu muda

Kelemahan Teknik *pour plate*:

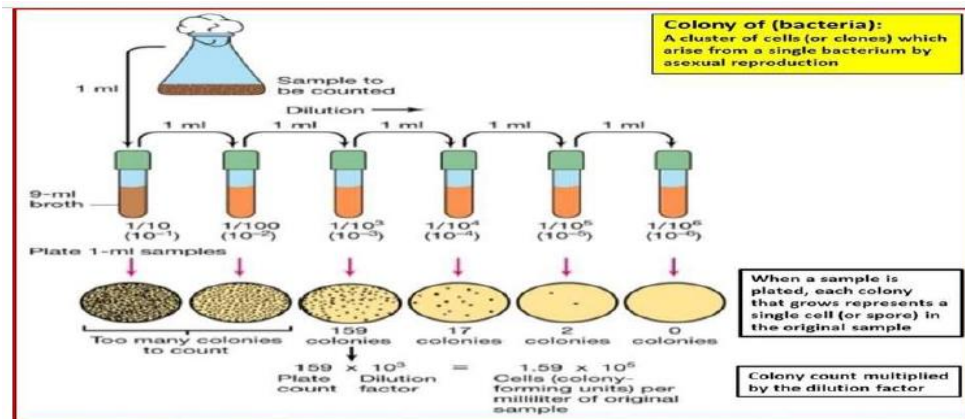
- (1) Mikroorganisme terperangkap di bawah permukaan medium ketika memadat. Karena mikroorganisme tumbuh maka koloni yang tumbuh baik dipermukaan atau di bawah permukaan sulit untuk diisolasi.
- (2) Teknik ini memerlukan waktu dan keterampilan.
- (3) Mikroorganisme mengalami kejutan panas karena media cair dipertahankan pada suhu 45 ° C.
- (4) Metode ini tidak cocok untuk isolasi bakteri psikrofil.



Gambar 3.3. Isolasi mikroorganisme dengan teknik penuangan dan penyebaran

3) Teknik Pengenceran Berseri (*Serial dilution*)

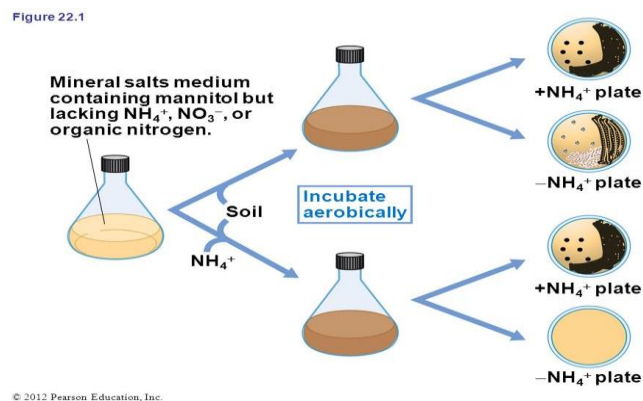
- Metode ini biasanya digunakan untuk mendapatkan biakan murni dari mikroorganisme yang dominan dan hanya dapat tumbuh di media cair.
- Inokulum diencerkan secara serial menggunakan media cair steril, dan selanjutnya aliquot dari setiap pengenceran diinokulasikan ke dalam cawan yang berisi media padat steril.



Gambar 3.4. Isolasi mikroba dengan Teknik pengenceran berseri

4) Teknik Kultur yang Diperkaya

- Teknik ini digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme dengan memanipulasi media dan kondisi inkubasinya.
- Sering digunakan untuk bakteri yang mempunyai sifat fisiologis yang khusus seperti jumlah kecil dan tumbuh lambat.
- Prinsip: menggunakan komposisi media dan kondisi inkubasi tertentu, sehingga hanya bakteri tertentu yang akan tumbuh.



Gambar 3.5. Isolasi *Azotobacter* dengan Teknik kultur diperkaya

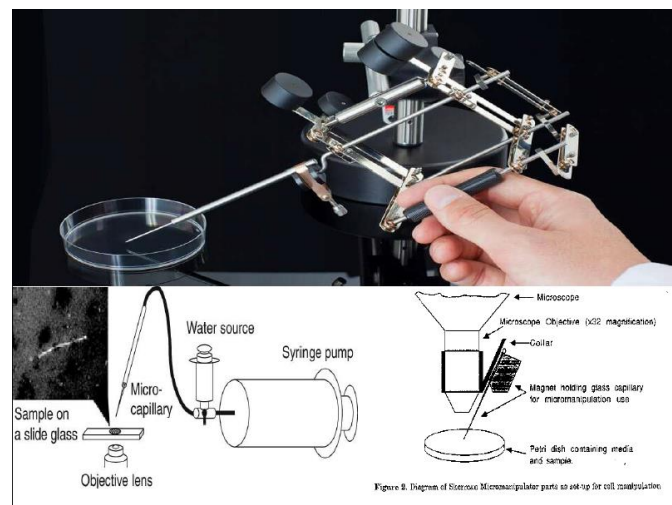
5) Teknik Isolasi Sel Tunggal

Teknik ini dilakukan dengan menggunakan alat micromanipulator yang dihubungkan dengan mikroskop. Keuntungan Teknik isolasi dengan micromanipulator adalah:

- Memungkinkan mengambil satu sel dari suatu kultur campuran.
- Alat ini dihubungkan dengan mikroskop sehingga dapat digunakan untuk untuk memilih satu sel (khususnya sel bakteri) dari preparat tetes gantung.
- Dengan Mikromanipulator gerakan mikropipet di bawah lensa obyek dapat dikontrol sehingga dapat diambil sel tunggal yang selanjutnya dipindahkan ke media yang sesuai
- Pekerjaan dapat dilakukan dengan cepat.

Kelemahannya Teknik ini adalah:

- Peralatannya mahal,
- Membutuhkan operator yang terampil



Gambar 3.6. Isolasi mikroorganisme menggunakan alat micromanipulator

e. Skrining

Langkah selanjutnya setelah isolasi mikroorganisme adalah skrining. Secara umum prosedur skrining dapat dibagi menjadi dua, yaitu skrining primer dan skrining sekunder.

Skrining primer merupakan serangkaian prosedur yang sangat selektif, yang memungkinkan deteksi dan isolasi mikroorganisme yang

menghasilkan produk yang diinginkan. Idealnya, skrining primer harus cepat, murah, prediktif, spesifik tetapi efektif untuk mendeteksi berbagai senyawa dan dapat diterapkan dalam skala besar. Skrining primer memakan waktu dan tenaga karena jumlah isolat yang besar harus diskriminasi untuk memperoleh isolat potensial. Saat ini telah tersedia peralatan untuk melakukan skrining dengan cepat dan dalam jumlah yang besar melalui metode *highthroughput screening*. Tahap ini merupakan tahap kritis karena akan membuang sebagian besar isolat tidak berguna yang tidak diinginkan, baik yang bukan mikroorganisme penghasil ataupun bukan penghasil senyawa yang diketahui.

Skrining sekunder merupakan program seleksi sistematis yang dimaksudkan untuk mendapatkan mikroorganisme yang diinginkan dengan dan produktivitas tinggi. Tahap ini juga memberi informasi apakah produk yang dihasilkan mikroorganisme merupakan senyawa baru atau bukan. Sifat kimia, fisika dan biologis produk yang dihasilkan oleh isolate terpilih juga ditentukan pada tahap skrining sekunder. Informasi kestabilan genetik diperlukan karena mikroorganisme mengalami mutasi cenderung kehilangan kemampuannya dalam menghasilkan produk diinginkan selama proses fermentasi.

f. Identifikasi

Identifikasi merupakan proses pengamatan untuk mengetahui informasi dari suatu organisme. Proses identifikasi memiliki fungsi untuk mengetahui nama organisme yang diidentifikasi. Nama suatu organisme mengandung informasi organisme tersebut dimulai dari informasi anatomi dan morfologi maupun sifat biokimia, habitat hidup sehingga dapat diketahui fungsi organisme tersebut di alam dan efeknya ke manusia.

Proses identifikasi mikroorganisme dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu konvensional dan molekuler.

Identifikasi konvensional dilakukan dapat dilakukan berdasarkan ciri/karakteristik sebagai berikut:

1) Morfologis

Pengamatan ukuran, bentuk dan susunan sel, adanya flagela, kapsul atau spora dengan bantuan mikroskop, baik dengan pewarnaan maupun tidak.

- 2) Fisiologi
Pengamatan fisiologi yang dilakukan dengan uji biokimia, seperti uji MR-VP, uji fermentasi gula, uji reduksi nitrat dll.
- 3) Kultural
Penentuan tampilan pertumbuhan pada berbagai macam media, baik cair maupun padat (bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, warna dll)
- 4) Nutrisional
Penentuan senyawa kimia dan kondisi fisik khusus (suhu, cahaya, gas) yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba
- 5) Metabolik
Identifikasi dan pengukuran perubahan kimiawi yang dilakukan mikroba. Contoh kemampuan mikroba untuk mengubah karbohidrat menjadi asam organik; gula menjadi asam dan gas dll. *E. coli* dapat memfermentasi laktosa, sedangkan *Salmonella typhi* tidak dapat mengubah senyawa tersebut.
- 6) Susunan Kimiawi
Penentuan susunan kimiawi berbagai komponen sel (dinding sel, nukleus, membran dll)
- 7) Susunan Antigen (Serologi)
Penelaahan sifat antigen – antibodi yang khas. Antigen merupakan substansi yang dapat menstimulasi produksi antibodi saat diinjeksikan ke hewan.
- 8) Patogenik
Penentuan potensi suatu mikroba untuk menimbulkan penyakit.

Identifikasi molekular adalah identifikasi dengan menggunakan sampel DNA. Sebagai contoh: untuk identifikasi bakteri bagian DNA yang umumnya digunakan adalah pada fragmen 16S rRNA. Penggunaan 16S rRNA karena fragmen tersebut bersifat ubikuitus yang dimilikinya. Sifat ubikuitus adalah sifat dimana keberadaannya selalu dipertahankan dalam kondisi apapun.

g. Preservasi/Penyimpanan Mikroba

Tujuan dari preservasi atau penyimpanan mikroba adalah:

- 1) Untuk mempertahankan kultur murni hasil isolasi untuk disimpan dalam waktu yang lama untuk penggunaan masa depan dengan kondisi yang layak.
- 2) Untuk menghindari kontaminasi
- 3) Untuk memperkecil kemungkinan terjadinya perubahan genetik (mutasi)

Setelah diperoleh biakan murni, maka perlu untuk menjaga kelangsungan hidup dan kemurnian mikroorganisme dengan menjaga biakan murni bebas dari kontaminasi. Preservasi mikroba dapat dilakukan dengan metode-metode sebagai berikut:

- 1) Transfer berkala ke media baru (sub-kultur)

Mikroba dapat dipelihara dengan memindahkan secara berkala untuk memperoleh kultur segar dari kultur stok sebelumnya. Pemindahan harus dilakukan dengan kondisi aseptik untuk menghindari kontaminasi. Metode sub-kultur berulang memerlukan waktu, juga sangat risiko terjadinya perubahan genetik serta kontaminasi.

- 2) Liofilisasi (Pengeringan Beku)

Pengeringan beku adalah proses di mana air dan pelarut lainnya dihilangkan dari produk beku melalui sublimasi. Dengan Teknik ini mikroba dapat disimpan dalam waktu lama hingga lebih dari 30 tahun tanpa terjadi kontaminasi. Selain itu mikroba juga akan stabil sifat genetiknya.

- 3) Penyimpanan di tanah steril

Teknik ini terutama diterapkan untuk penyimpanan mikroorganisme bersporulasi (spora tunggal (endospora) di dalam sel), seperti *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, dll. Prosedur melibatkan inokulasi 1ml suspensi spora ke dalam tanah steril (diautoklaf dua kali) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5-10 hari. Pada pertumbuhan awal memungkinkan jamur untuk menggunakan kelembaban yang tersedia dan secara bertahap menjadi tidak aktif dan selanjutnya kemudian disimpan di suhu dingin. Viabilitas organisme ditemukan dapat dipertahankan hingga sekitar 70-80 tahun.

4) Penyimpanan pada suhu rendah

Penyimpanan kultur dilakukan di lemari es atau ruangan dingin, dengan suhu dipertahankan pada 4°C. Teknik lain adalah dengan pendinginan menggunakan nitrogen cair yang dapat digunakan untuk penyimpanan kultur dengan jangka waktu yang lebih panjang. Dalam metode ini, suspensi mikroba padat disiapkan dalam media yang mengandung zat pelindung (Gliserol atau dimetil sulfoksida) untuk mencegah kerusakan sel karena pembentukan kristal es. Suspensi disegel ke dalam ampul kecil atau vial dan kemudian dibekukan pada -150 °C. Pada kisaran suhu ini aktifitas metabolisme sel sangat melambat sehingga hanya sejumlah kecil nutrisi yang akan digunakan. Viabilitas mikroba dapat dipertahankan hingga 10-30 tahun tanpa mengubah karakteristik.

5) Penyimpanan dengan melapisi kultur menggunakan dengan minyak mineral atau parafin cair

Pada metode ini parafin cair steril dituangkan di atas kultur mikroba miring dan disimpan tegak di suhu kamar. Kultur dapat dipertahankan dengan cara menutupi agar miring dengan minyak mineral steril yang disimpan pada suhu kamar atau lebih disukai pada 0-5 ° C. Hal ini akan membatasi akses oksigen sehingga mengurangi terjadinya metabolisme dan pertumbuhan mikroorganisme, serta untuk pengeringan sel selama pengawetan. Masa simpan untuk bakteri dari genus *Azotobacter* dan *Mycobacterium* dapat mencapai 7-10 tahun, sedangkan untuk *Bacillus* mencapai 8-12 tahun. Keuntungan metode ini adalah sederhana, terutama digunakan untuk penyimpanan mikroorganisme anaerobik, murah, dan waktu penyimpanan cukup lama hingga 10-15 tahun.

h. Pengembangan mikroba

Pengembangan kultur ditujukan untuk memperoleh mikroorganisme dengan produktifitas yang lebih tinggi atau sifat-sifat lain yang diinginkan. Pengembangan mikroba dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1) Seleksi mutan

Mutasi merupakan perubahan sifat-sifat organisme yang mendadak dan dapat diwariskan. Mutasi dapat terjadi dengan penerapan suatu mutagen (zat yang menyebabkan mutasi) untuk menginduksi terjadinya mutasi (disebut mutagenesis). Mutasi juga dapat terjadi tanpa perlakuan khusus disebut yang disebut dengan “mutasi spontan”, sedangkan

mutasi yang terjadi dengan perlakuan menggunakan agen tertentu dikenal sebagai “mutasi yang diinduksi”. Teknik mutasi yang diinduksi banyak digunakan untuk meningkatkan karakter biokimia mikroorganisme sehingga dapat meningkatkan produktifitas atau sifat lainnya.

2) Rekombinan

Rekombinan didefinisikan sebagai pembentukan kombinasi gen baru dari penggabungan gen yang berasal dari mikroba yang berbeda. Rekombinan gen dapat digunakan baik untuk analisis genetik maupun peningkatan galur maupun untuk menghasilkan produk baru dari suatu mikroorganisme. Rekombinan gen dapat didasarkan pada:

- a) *Cross over*
- b) *Transformasi*
- c) *Konjugasi*
- d) *Transduksi*
- e) *Fusi protoplas*

3) Teknologi DNA Rekombinan

Teknologi rDNA atau Rekayasa Genetika melibatkan isolasi dan kloning gen yang diinginkan, konstruksi gen yang diperlukan menggunakan enzim dan selanjutnya mentransfer dan mengekspresikan gen ini ke dalam inang yang sesuai. Teknik ini digunakan untuk mencapai 2 tujuan, yaitu: Produksi protein rekombinan dan Rekayasa Metabolik.

Protein rekombinan: merupakan protein yang dihasilkan oleh gen yang ditransfer/transgen; Protein tersebut pada umumnya memiliki harga yang mahal. Contoh: Insulin, Interferon, dll, yang dihasilkan oleh Bakteri.

Rekayasa Metabolik: Jika aktivitas metabolisme suatu organisme dimodifikasi dengan memasukkan transgen ke dalamnya, sehingga akan mempengaruhi system enzimatik, transportasi dan/atau regulasi fungsi selnya maka dikenal sebagai Rekayasa Metabolik. Contoh: produksi asam amino Isoluecine yang berlebihan oleh *C. glutamicum* dan Ethanol oleh *E. coli*.

C. Latihan Soal

1. Jelaskan karakteristik mikroba yang penting untuk digunakan di industri.
2. Dalam isolasi dan skrining mikroorganisme dari alam, hal-hal apa yang harus diperhatikan dalam pengambilan sampel guna memperoleh probabilitas yang besar untuk mendapatkan mikroba yang diinginkan.
3. Berikan contoh penerapan isolasi dan skrining mikroba dengan Teknik medium diperkaya dan bagaimana prosedurnya.
4. Berikan 5 (lima) contoh prosedur dalam melakukan skrining sekunder untuk memperoleh mikroba yang diinginkan.
5. Berikan contoh prosedur identifikasi mikroorganisme secara morfologis dan fisiologi.

D. Daftar Pustaka

- Liu, S. and Suny Esf, (2013), *Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*, First Edition 2013, Elsevier
- Petrides. D.P, Calandranis, N.J. and Conney, C.L. 2006. Dalam Brock, T.d et al, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2 nd ed. ASM Press, Washington, D.C. Back, J. G., (1996). *Microbiology: Principles and Applications*, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Shuler ML dan Kargi F (2001) *Bioprocess Engineering*, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). *Principles of Fermentation Technology*, 2nd, Pergamon Press
- Willey, J., Sandman, K. and Wood, D. (2020). *Prescott's Microbiology*, 11th Edition, McGraw-Hill Higher Education

PERTEMUAN 4

DASAR-DASAR FERMENTASI

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami sejarah perkembangan proses fermentasi
2. Memahami formulasi medium untuk proses fermentasi
3. Memahami jenis-jenis fermentasi

B. Uraian Materi

Teknologi fermentasi didefinisikan sebagai bidang yang melibatkan penggunaan enzim mikroba untuk menghasilkan senyawa yang bermanfaat untuk aplikasi di bidang energi, material, industri farmasi, kimia, dan industri makanan. Berbagai mikroorganisme seperti: seperti ragi, bakteri, dan jamur telah dimanfaatkan untuk mengkonversi substrat yang kompleks menjadi senyawa sederhana dalam skala industri seperti asam organik dan alkohol. Terdapat empat kategori penting yang dapat dihasilkan/dilakukan melalui proses fermentasi, yaitu:

1. Menghasilkan produk berupa sel mikroba (biomassa)
2. Menghasilkan enzim
3. Menghasilkan metabolit
4. Proses transformasi

Tabel 4.1. Beberapa produk yang dihasilkan secara proses fermentasi

Produk	Mikroorganisme yang digunakan
Biomassa	
• Ragi roti	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
• Inokulum pertanian untuk fiksasi nitrogen	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

• Probiotik	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Enzim	
• α -Amilase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
• Glukoamilase	<i>Aspergillus niger</i>
• Protease	<i>Bacillus spp.</i>
Metabolit	
• Asam sitrat	<i>Aspergillus niger</i>
• Aseton/butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
• Sefalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Biotransformasi	
• D-Sorbitol menjadi L-sorbose (dalam proses produksi C)	<i>Acetobacter suboxydans</i>
• Steroid	<i>Rhizopus arrhizus</i>

1. Perkembangan Industri Fermentasi

Perkembangan tahap industri fermentasi dapat dikelompokkan ke dalam lima tahapan periode sebagai berikut:

- a. Periode sebelum 1900. Sebagai produk utama adalah alkohol dan vinegar. Proses fermentasi menggunakan tanki dari kayu, tembaga dan barrel. Kontrol proses menggunakan thermometer, hydrometer dan alat penukar panas. Proses fermentasi dilakukan secara curah menggunakan kultur murni ragi dan kultur bakteri.
- b. Periode 1900 – 1940. Produk utama adalah ragi roti, gliserol, asam sitrat, asam laktat dan aseton/butanol. Fermentor hingga kapasitas 200 m³ digunakan untuk produksi aseton dan butanol, sparger udara untuk aerasi ragi roti dan pengaduk mekanik untuk fermentor kecil. Kontrol proses

dilakukan terhadap pH dan suhu. Proses fermentasi dilakukan secara curah dan semi-curah menggunakan mikroba murni.

- c. 1940 – sekarang. Periode ini ditandai dengan dihasilkannya berbagai produk antibiotik seperti penisilin dan streptomisin, asam amino, proses transformasi dan enzim. Proses fermentasi dilakukan menggunakan tangki berpengaduk (bioreaktor sebenarnya). Telah digunakan elektrode pH dan DO yang dapat disterilisasi. Proses fermentasi telah berkembang dan dapat dilakukan secara curah, semi-curah dan kontinyu. Kualitas produk menjadi bagian penting dalam produksi serta menggunakan mikroba hasil mutasi dan seleksi yang kontinyu.
- d. 1960 – sekarang. Produk utama protein sel tunggal. Bioreaktor dilengkapi dengan tangki untuk siklus tekanan dan aliran jet untuk mengatasi masalah gas dan pertukaran panas. Kontrol telah dilakukan menggunakan komputer. Proses fermentasi dilakukan secara kontinyu dan proses recycle medium. Kontrol kualitas produk sangat penting serta telah digunakan mikroba hasil rekayasa genetika.
- e. 1979 – sekarang. Ditandai dengan diproduksi berbagai produk protein yang dihasilkan oleh mikroba hasil rekayasa genetika dengan memasukkan gen asing ke dalam sel inang, seperti insulin, interferon, antibodi dan lain-lain, serta produksi melalui sel hewan. Penggunaan bioreaktor STR yang lebih maju, bioreaktor membran, dan bioreaktor untuk sel hewan.

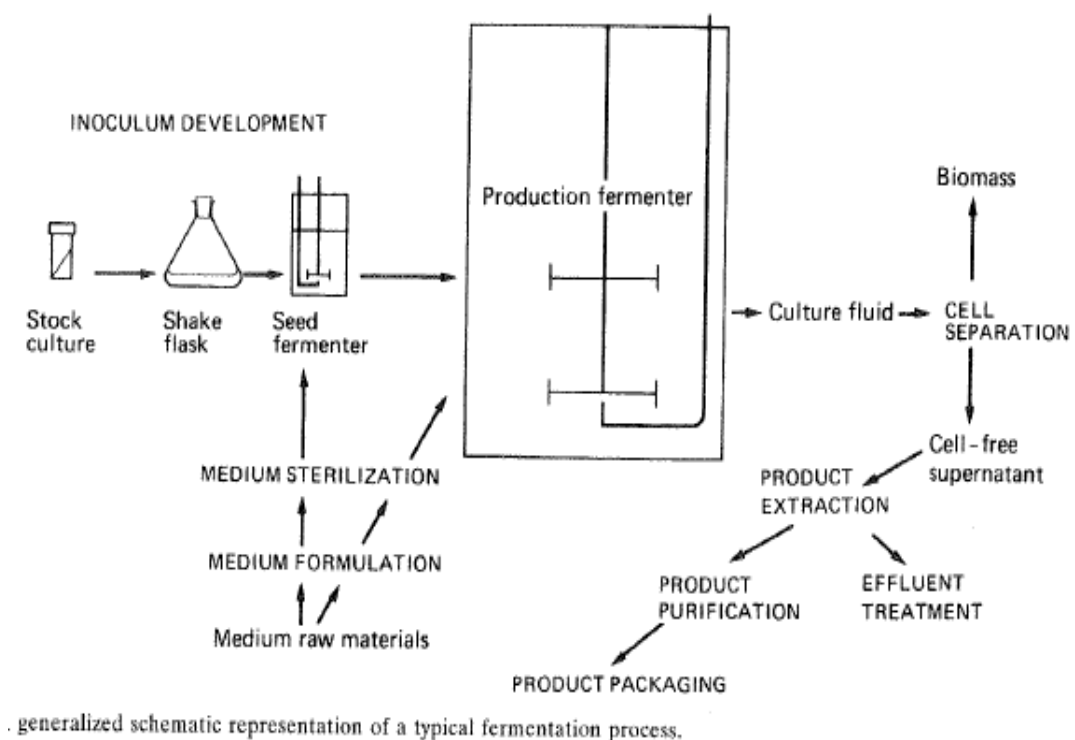
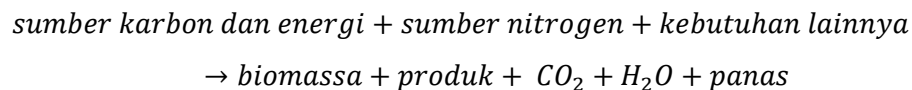
Proses fermentasi secara umum dikelompokkan ke dalam enam komponen penting, dengan pengecualian untuk proses transformasi, yaitu:

- a. Formulasi medium untuk penyiapan inokulum dan proses fermentasi
- b. Sterilisasi medium, fermentor dan peralatan bantu lainnya
- c. Produksi inokulum dari kultur murni, aktif dan dalam jumlah yang cukup
- d. Pertumbuhan organisme dalam tahap produksi di fermentor berada dalam kondisi optimum untuk menghasilkan produk
- e. Tahap ekstraksi dan purifikasi produk
- f. Limbah yang dihasilkan dari proses

Secara umum proses fermentasi dilakukan seperti skema pada Gambar 4.1.

2. Formulasi Media

Formulasi media merupakan tahap yang penting untuk keberhasilan proses fermentasi. Komposisi medium harus sesuai untuk kebutuhan untuk pertumbuhan sel dan pembentukan metabolit serta pemenuhan kebutuhan energi dan pemeliharaan sel. Proses fermentasi dapat didekati dengan persamaan yang menggambarkan pembentukan sel dan produk sebagai berikut:



Gambar 4.1. Skema proses fermentasi yang umum dilakukan (Stanbury & Whitaker, 1995)

Komposisi medium juga harus didesain dengan pertimbangan ekonomi dan limbah yang dihasilkan. Dalam merancang komposisi medium pengetahuan tentang komposisi kimia sel merupakan hal yang penting. Sel mikroorganisme mempunyai komposisi kimia utama yang terdiri dari C, H, O, N, S, P, Mg dan K. Oleh karena itu medium harus mengandung unsur-unsur tersebut. Beberapa mikroorganisme tidak dapat mensintesis nutrisi tertentu seperti asam amino, vitamin atau nukleotida. Unsur-unsur ini dapat

ditambahkan ke dalam medium dalam bentuk murni atau senyawa kompleks. Komponen penting lainnya yang diperlukan sel adalah oksigen yang dipasok dari aerasi kultur.

Secara umum nutrisi yang ada dalam medium dapat dikelompokkan dalam dua kategori:

- a. **Makro nutrisi:** kebutuhan $> 10^{-4}$ mol/L: sumber karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, sulfur, fosfor, Mg^{2+} dan K^{+}
- b. **Mikro nutrisi:** kebutuhan $< 10^{-4}$ mol/L: trace element seperti: Mo^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} , vitamin, hormon pertumbuhan, prekursor metabolit

a. Makro Nutrisi

Sumber karbon. Fungsi sumber karbon adalah untuk pertumbuhan, reproduksi, pembentukan produk, pemeliharaan sel dan sumber energi. Berdasarkan sumber karbonnya mikroba dibedakan:

- 1) Heterotrof menggunakan senyawa organik seperti karbohidrat, lemak dan hidrokarbon sebagai sumber energi;
- 2) Autotrof menggunakan CO_2 sebagai sumber karbon
 - a) Kemoautotrof menggunakan CO_2 sebagai sumber karbon dan memperoleh energi dari oksidasi senyawa anorganik
 - b) Fotoautotrof menggunakan CO_2 sebagai sumber karbon dan cahaya sebagai sumber energi.
 - c) Fakultatif autotrof secara normal tumbuh pada kondisi autotrof, namun juga dapat tumbuh pada kondisi heterotrof tanpa sumber energi anorganik

Sumber karbon yang banyak digunakan di industri fermentasi adalah molase (sukrosa), pati (glukosa, dekstrin), sirup jagung, dan limbah cair proses sulfatasi (glukose). Di laboratorium fermentasi sumber karbon yang banyak dipakai adalah glukosa, sukrosa, dan fruktosa. Sebagai alternatif sumber karbon yang cukup murah dapat digunakan metanol, etanol, dan metana. Pada fermentasi secara aerobik sekitar 50% substrat karbon digunakan untuk aktifitas sel dan 50% dari kebutuhan sel tersebut adalah untuk energi. Pada fermentasi anaerobik sebagian besar substrat karbon diubah menjadi produk dan hanya sedikit diubah menjadi sel (kurang dari 30%).

Sumber Nitrogen. Kandungan nitrogen dalam sel sekitar 10-14% dari berat sel kering. Nitrogen berada dalam sel dalam bentuk protein dan asam nukleat. Sumber nitrogen yang banyak dipakai adalah ammonia atau garam ammonium (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3), protein, peptida, dan asam amino. Urea dapat digunakan sebagai sumber nitrogen oleh beberapa mikroorganisme. Beberapa organisme seperti *Azotobacter spp.* dan *Cyanobacteria* dapat mengambil nitrogen dari atmosfer melalui proses nitrogen fiksasi untuk pembentukan ammonium. Sumber nitrogen organik seperti *yeast extract* dan pepton merupakan sumber nitrogen yang baik namun harganya mahal dibandingkan dengan garam ammonium.

Tabel 4.2. Sumber karbon dan nitrogen yang digunakan di industri fermentasi (Liu & Suny, 2013)

Carbon sources	Nitrogen sources
Starch waste (maize and potato)	Soya meal
Molasses (cane and beet)	Yeast extract
Whey	Distillers solubles
n-Alkanes	Cottonseed extract
Gas oil	Dried blood
Sulfite waste liquor	Corn steep liquor
Domestic sewage	Fish solubles and meal
Cellulose waste	Groundnut meal
Carbon bean	

Oksigen. Oksigen terdapat di seluruh komponen organik sel. Kandungan dalam sel sekitar 20% dari berat sel kering. Molekul oksigen dibutuhkan sebagai terminal *electron acceptor* dari senyawa karbon pada metabolisme aerob. Gas oksigen diumpankan ke dalam media fermentasi pertumbuhan dengan cara disemprotkan ke dalam medium atau aerasi permukaan.

Hidrogen. Kandungan hydrogen dalam sel sekitar 8% dari berat sel kering. Sebagian besar diperoleh dari peruraian sumber karbon seperti

karbohidrat. Beberapa mikroba seperti bakteri metanogen dapat menggunakan hidrogen sebagai sumber energi.

Fosfor. Kandungan dalam sel sekitar 3% dari berat sel kering. Fosfor berfungsi sebagai regulasi metabolisme sel. Terdapat dalam asam nukleat dan dinding sel seperti pada *teichoic acids* pada bakteri gram positif. KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 merupakan sumber fosfat yang paling banyak dipakai. Selain itu Gliserofosfat juga dapat digunakan sebagai sumber fosfat organik. Untuk pembentukan metabolit sekunder seperti antibiotik konsentrasi fosfat dalam media harus kurang dari 1 mmol/L.

Sulfur. Kandungan dalam sel sekitar 1% berat sel kering. Sulfur berada dalam bentuk protein dan koenzim. Sumber sulfur yang banyak digunakan adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sumber lainnya adalah asam amino yang mengandung sulfur. Beberapa mikroba autotrof menggunakan S^{2+} dan S^0 sebagai sumber energi.

Potasium. Potassium merupakan kofaktor dari berbagai enzim yang dibutuhkan untuk metabolisme karbohidrat. Sel cenderung aktif mengambil mineral dalam bentuk K^+ and Mg^{2+} dan membuang Na^+ dan Ca^{2+} . Sumber potasium yang sering digunakan adalah K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , and K_3PO_4 .

Magnesium. Magnesium merupakan kofaktor berbagai enzim. Magnesium terdapat dalam dinding sel dan membran sel. Ribosomes membutuhkan Mg^{2+} . Magnesium dipasok dalam bentuk $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ atau MgCl_2 .

Tabel 4.3. Mikro nutrisi dan fungsi fisiologinya (Liu & Suny, 2013)

Element	Physiological function	Required concentration, mol/L
Carbon	Constituent of organic cellular material. Often the energy source.	$>10^{-2}$
Nitrogen	Constituent of proteins, nucleic acids, and coenzymes.	10^{-3}
Hydrogen	Organic cellular material and water.	
Oxygen	Organic cellular material and water. Required for aerobic respiration.	
Sulfur	Constituent of proteins and certain coenzymes.	10^{-4}
Phosphorus	Constituent of nucleic acids, phospholipids, nucleotides, and certain coenzymes.	$10^{-4}-10^{-3}$
Potassium	Principal inorganic cation in the cell and cofactor for some enzymes.	$10^{-4}-10^{-3}$
Magnesium	Cofactor for many enzymes and chlorophylls (photosynthetic microbes) and present in cell walls and membranes.	$10^{-4}-10^{-3}$

b. Mikro Nutrisi (*Trace Element*)

Trace element merupakan kebutuhan essential untuk nutrisi mikroba. Kekurangan trace element esensial berakibat:

- 1) Memperpanjang fase lag (waktu yang dibutuhkan mulai dari inokulasi hingga menjadi sel aktif yang mampu membelah diri dengan cepat)
- 2) Menurunkan laju pertumbuhan spesifik dan perolehan

Trace elemen dapat dikategorikan dalam 3 kategori berdasarkan tingkat kebutuhan untuk metabolisme sel, yaitu:

- 1) Trace element paling dibutuhkan: Fe, Zn, and Mn.

Besi (Fe)

- a) Terdapat dalam ferredoxin dan sitokrom
- b) Merupakan kofaktor yang penting
- c) Berperan sebagai pengatur pada beberapa proses fermentasi (contoh: defisiensi besi diperlukan untuk eksresi riboflavin oleh *Ashbya gossypii* dan konsentrasi Fe juga digunakan untuk mengatur produksi penisilin oleh *Penicillium chrysogenum*).

Zinc (Zn)

- a) Merupakan kofaktor berbagai enzim
 - b) Berperan untuk mengatur proses fermentasi, seperti pada proses fermentasi penisilin
 - c) Mangan (Mn)
 - d) Merupakan kofaktor enzim
 - e) Berperan dalam pengaturan metabolisme sekunder dan ekskresi metabolit primer
- 2) Trace element yang diperlukan untuk pertumbuhan spesifik: Cu, Co, Mo, Ca, Na, Cl, Ni, dan Se.

Tembaga/Copper (Cu)

- a) Ada dalam rantai respirasi tertentu dan enzim
- b) Defisiensi tembaga dapat menstimulasi terbentuknya penisilin dan asam sitrat

Cobalt (Co)

- a) Ada sebagai komponen corrinoid seperti dalam vitamin B
- b) Diperlukan oleh bakteri propionat dan methanogen tertentu

Molybdenum (Mo)

- a) Merupakan kofaktor dari enzim nitrate reductase and nitrogenase
- b) Dibutuhkan untuk pertumbuhan jika sumber nitrogen NO_3 dan N_2

Calcium (Ca)

- a) Merupakan kofaktor untuk enzim amilase dan beberapa protease
- b) Terdapat pada beberapa spora bakteri dan dinding sel pada beberapa sel, seperti sel tanaman

Sodium (Na)

- a) Diperlukan dalam jumlah yg sangat kecil oleh beberapa bakteri, khususnya oleh bakteri methanogen untuk ion balance
- b) Diperlukan untuk transport spesies yang bermuatan dan sel eukariot.

Chloride (Cl^-)

- a) Diperlukan oleh beberapa halobacteria dan mikroba laut yang juga memerlukan Na^+

Nickel (Ni)

- a) Diperlukan oleh beberapa bakteri metanogen sebagai kofaktor

Selenium (Se)

- 1) Diperlukan untuk metabolisme pada beberapa organisme
- 3) Trace element yg jarang diperlukan: B, Al, Si, Cr, V, Sn, Be, F, Ti, Ga, Ge, Br, Zr, W, Li, and I.

Komponen ini diperlukan dalam konsentrasi $< 10^{-6}$ mol/L dan bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi, $> 10^{-4}$ mol/L.

Beberapa ion seperti Mg^{2+} , Fe^{3+} , dan PO_4^{+} dapat mengendap dalam medium shg tidak dapat dimetabolisme oleh sel. Oleh karena itu diperlukan senyawa pengkelat (*chelating agents*) untuk membuat ion tersbut tetap larut. Senyawa pengkelat mempunyai ligan yang dapat mengikat ion logam sehingga membentuk kompleks yang larut. Ligan utama terdiri dari kelompok carboxyl ($-\text{COOH}$), amine ($-\text{NH}_2$), dan mercapto ($-\text{SH}$). Senyawa pengkelat yang sering dipakai adalah asam sitrat, EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid), polifosfat, histidin, tirosin, dan sistein. Na_2EDTA merupakan senyawa pengkelat yang juga sering dipakai. EDTA dapat menghilangkan ion logam pada dinding sel, seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Zn^{2+} yang dapat mengakibatkan pecahnya dinding sel. Senyawa pengkelat asam sitrat dapat dimetabolisme oleh beberapa jenis bakteri. Senyawa pengkelat dibutuhkan dalam konsentrasi kecil (1 mmol/L).

c. *Growth Factor*

Senyawa ini digunakan untuk memacu pertumbuhan dan sintesis beberapa metabolit. Dalam kelompok ini adalah vitamin, hormon, dan asam amino. Vitamin berfungsi sebagai koenzim. Jenis vitamin yang diperlukan adalah tiamin (B1), riboflavin (B2), piridoksin (B6), biotin, sianokobalamin (B12), asam folat, asam lipoik, p-amino asam benzoat, dan vitamin K. Konsentrasi vitamin yg diperlukan antara 10^{-6} – 10^{-12} mol/L. Beberapa mikroorganisme membutuhkan asam amino yang harus ditambahkan dari luar dengan konsentrasi 10^{-6} – 10^{-13} mol/L. Beberapa asam lemak seperti asam oleat dan sterol diperlukan dalam jumlah kecil oleh beberapa mikroorganisme. Makhluk hidup tingkat tinggi, seperti hewan dan tanaman, memerlukan hormon untuk mengatur metabolisme. Senyawa insulin merupakan hormon umum yang dibutuhkan oleh sel hewan sedangkan hormon auxin and sitokinin diperlukan oleh tanaman.

d. Air

Air merupakan komponen utama dalam medium fermentasi dan dibutuhkan dalam jumlah yang besar. Faktor yang perlu diperhatikan dalam penyediaan air adalah pH, kandungan garam dan kontaminan dari luaran. Pada umumnya digunakan air yang telah diolah melalui proses deionisasi yang digunakan dalam proses fermentasi. Konsentrasi garam dan pH diatur untuk memperoleh kondisi yang sesuai.

e. Anti-busa

Sebagian proses yang menggunakan mikroorganisme menghadapi masalah dengan terbentuknya busa selama proses fermentasi. Penyebab utama timbulnya busa adalah terbentuknya protein dalam medium. Busa dapat menyebabkan sel terpisah medium sehingga menyebabkan lisis dan dapat berakibat meningkatkan stabilitas busa. Jika busa tidak terkontrol dapat menyebabkan filter udara keluar terbasahi sehingga berpotensi menjadi sumber kontaminasi. Anti-busa yang ideal harus mempunyai sifat-sifat:

- 1) Terdispersi dengan baik dan dapat cepat menghilangkan busa yang terbentuk
- 2) Aktif pada konsentrasi yang rendah
- 3) Dapat bekerja lama sehingga dapat mencegah terbentuknya busa baru

- 4) Tidak bersifat racun terhadap mikroorganisme
- 5) Tidak menyebabkan masalah pada proses ekstraksi produk
- 6) Tidak menyebabkan bahaya dalam penanganannya
- 7) Murah
- 8) Tidak berpengaruh terhadap transfer oksigen
- 9) Dapat disterilisasi dengan panas

Beberapa jenis senyawa anti-busa telah digunakan untuk proses fermentasi yang berbeda, yaitu:

- 1) Alkohol: stearyl dan oktil dekanol
- 2) Ester
- 3) Asam lemak dan turunannya, seperti gliserida, minyak biji kapuk, minyak kedelai, minyak zaitun, dan minyak castor
- 4) Silicon
- 5) Sulfonate
- 6) Lain-lain: alkaterge C, oxazoline, polipropilen glikol

f. Medium Pertumbuhan

Terdapat dua jenis medium fermentasi yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme, yaitu: *defined medium* dan *complex medium*. *Defined medium* adalah medium yang mengandung sejumlah tertentu senyawa kimia murni dengan komposisi kimia yang diketahui. Contoh: medium yg mengandung: glukosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KHPO_4 , dan MgCl_2 . Medium kompleks adalah medium yang mengandung senyawa alam dimana komposisi kimianya tidak diketahui dng pasti. Contoh: media yang mengandung ekstrak ragi, pepton, molase, atau *corn steep liquor*. Media kompleks biasanya mengandung senyawa pemacu pertumbuhan yang diperlukan, seperti vitamin, hormon, dan elemen trace, dan seringkali menghasilkan hasil sel yang lebih tinggi, dibandingkan dengan *defined medium*. Keuntungan menggunakan medium kompleks dibanding *defined medium* adalah seringkali lebih murah, hasil lebih dapat direproduksi dan dapat dikontrol dengan lebih baik. Rekoveri dan pemurnian produk seringkali lebih mudah dan lebih murah dibanding dengan *defined medium*. Medium komplek biasanya juga mengandung *growth factors*, seperti vitamin, hormon, dan trace element, sehingga dapat menghasilkan pertumbuhan sel yang lebih baik.

3. Jenis-Jenis Proses Fermentasi

Fermentasi padat. Fermentasi padat (*solid-state fermentation*; SSF) adalah fermentasi yang dilakukan dengan menggunakan substrat dalam bentuk padat, seperti dedak, ampas tebu, dan bubur kertas serta limbah organik lainnya. Proses fermentasi berjalan lambat, dapat terjadi secara alami, dan hanya membutuhkan kandungan air yang rendah sehingga membutuhkan waktu yang lama. Fermentasi padat dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba fungi. Produksi berbagai enzim seperti selulase, lipase, protease, glukoamilase, amilase, ligninase, silanase, pektinase dan peroksidase telah diproduksi melalui SSF. Bakteri tidak dapat digunakan untuk fermentasi padat karena bakteri memerlukan banyak air untuk hidupnya. Contoh dari proses fermentasi padat adalah pembuatan tempe, ocom, tape dan lain-lain.

Fermentasi cair / fermentasi terendam (*submerged fermentation*; SmF). Fermentasi cair merupakan fermentasi yang dilakukan dengan medium cair. Proses fermentasi cair berjalan lebih cepat dibanding fermentasi padat sehingga membutuhkan kondisi proses yang terkendali agar dapat menghasilkan produk diinginkan yang tinggi dan dengan produktifitas yang optimal. Mode operasi proses fermentasi dapat dilakukan secara curah, kontinyu atau unpa curah. Fermentasi cair telah banyak diaplikasikan di industri untuk menghasilkan berbagai produk seperti minuman beralkohol, asam organik (asam laktat, sitrat, dan cuka), monosodium glutamat, dan asam amino (aspartat).

C. Latihan Soal

1. Sebutkan industri fermentasi yang ada di daerah terdekat Anda. Carilah informasi sumber karbon dan nitrogen yang digunakan.
2. Sebutkan produk fermentasi makanan tradisional khas Indonesia? Sertakan cara fermentasinya dengan fermentasi padat atau cair?
3. Apa yang disebut dengan senyawa pengkelat? Jelaskan fungsinya dengan sebuah contoh.
4. Sebutkan keuntungan dan kerugian jika penggunaan medium kompleks dibanding defined medium dalam proses fermentasi.

5. Anda ingin memproduksi protein yang bernilai tinggi menggunakan teknologi DNA rekombinan. Apakah akan Anda gunakan medium kompleks atau *defined*? Mengapa?

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Back, J. G., (1996). Microbiology: Principles and Applications, 3rd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Liu, S and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier
- Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). Principles of Fermentation Technology, 2nd, Pergamon Press

PERTEMUAN 5

STERILISASI

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami prinsip sterilisasi medium pada proses fermentasi
2. Memahami prinsip sterilisasi udara pada proses fermentasi

B. Uraian Materi

Produk fermentasi dihasilkan oleh kultur yang ditumbuhkan dalam medium fermentasi. Jika fermentasi terkontaminasi dengan mikroorganisme asing maka hal-hal berikut dapat terjadi:

1. Medium akan mendukung pertumbuhan baik organisme yang diinginkan maupun kontaminan sehingga mengakibatkan produktifitas menurun
2. Jika proses fermentasi dilakukan secara kontinyu maka kontaminan dapat tumbuh dengan cepat mengalahkan pertumbuhan organisme yang diinginkan
3. Kontaminan dapat mengkontaminasi produk akhir, misal kontaminasi pada proses produksi yoghurt
4. Kontaminan dapat menghasilkan senyawa yang mengakibatkan proses purifikasi produk menjadi sulit
5. Kontaminan dapat mendegradasi produk yang diinginkan, hal ini sering terjadi pada proses fermentasi antibiotik. Bakteri kontaminan bersifat resisten terhadap antibiotik yang dihasilkan karena dapat merusak antibiotik tersebut. Contoh degradasi antibiotik betalaktam oleh betalaktamase yang dihasilkan oleh bakteri kontaminan yang resisten
6. Kontaminasi medium fermentasi dengan fag (phage) dapat menyebabkan sel lisis

Untuk mencegah terjadinya kontaminasi dapat dilakukan dengan tindakan-tindakan sebagai berikut:

1. Menggunakan inokulum murni untuk memulai proses fermentasi

2. Sterilisasi medium, fermentor, udara, dan seluruh bahan yang ditambahkan selama proses
3. Menjaga kondisi aseptik selama proses fermentasi berlangsung
4. Menggunakan prinsip seleksi alam untuk mencegah pertumbuhan kontaminan.
Contoh: dengan mengatur pH, proses fermentasi alkohol, suhu tinggi, dll.

Dalam hampir semua proses fermentasi, sangat penting untuk memperoleh kondisi proses yang terbebas dari kontaminan dengan biaya yang ekonomis mulai persiapan kultur hingga proses produksi di fermentor. Beberapa proses fermentasi dapat terbebas dari kontaminasi secara “alami” disebabkan oleh beberapa faktor, seperti penggunaan medium selektif yang hanya bisa digunakan oleh mikroorganisme tertentu, pertumbuhan mikroorganisme yang menghasilkan kondisi selektif, seperti terjadinya penurunan pH. Fermentasi produksi bir termasuk dalam kategori ini. Resin yang terdapat dalam bahan dapat menghambat tumbuhnya berbagai mikroorganisme. Selain itu tumbuhnya kapang penghasil bir selama proses fermentasi akan menyebabkan pH medium turun. Oleh karena itu medium untuk pembuatan bir tidak perlu disterilisasi namun cukup direbus hingga mendidih serta fermentor cukup dibersihkan dengan disinfektan, tidak perlu disterilisasi. Penyiapan inokulum untuk pembuatan bir juga tidak perlu seketat seperti penyiapan untuk proses fermentasi lain misal fermentasi antibiotik. Namun demikian sebagian besar proses fermentasi memerlukan kondisi yang steril.

1. Sterilisasi Medium Fermentasi

a. Sterilisasi batch

Medium fermentasi dapat disterilkan dengan menggunakan: filtrasi, radiasi, perlakuan ultrasonik, perlakuan kimiawi atau panas (mendidihkan atau mengalirkan uap langsung melalui medium, atau dengan mengukus medium di bawah tekanan - autoklaf). Sterilisasi panas menggunakan uap air yang paling banyak digunakan untuk sterilisasi medium fermentasi. Faktor-faktor yang berpengaruh dalam keberhasilan sterilisasi adalah:

- 1) Jumlah dan jenis mikroorganisme yang ada,
- 2) Komposisi medium kultur,
- 3) Nilai pH,
- 4) Ukuran partikel yang tersuspensi.

Proses pemusnahan mikroorganisme dengan uap air dapat dinyatakan sebagai reaksi kimia order satu dengan persamaan:

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (5.1)$$

dimana N : jumlah organisme hidup yang ada saat itu
 t : lama sterilisasi
 k : konstanta laju reaksi atau laju spesifik kematian

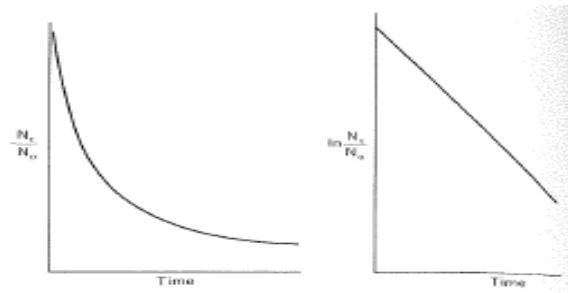
Jika diintegrasikan maka diperoleh:

$$-\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt} \quad (5.2)$$

dimana N_0 : jumlah organisme yang ada di awal proses sterilisasi
 N_t : jumlah organisme setelah proses sterilisasi selama waktu t

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt \quad (5.3)$$

Representasi secara grafik dari persamaan 5.1 dan 5.3 ditunjukkan oleh Gambar 5.1. Gambar tersebut menunjukkan bahwa jumlah mikroorganisme yang masih hidup menurun secara eksponensial selama sterilisasi. Plot antara nilai $\ln (N_t/N_0)$ terhadap waktu menghasilkan garis lurus dengan nilai slope $-k$. Kinetika ini menunjukkan bahwa diperlukan waktu tak terhingga untuk memperoleh populasi mikroorganisme yang hidup menjadi nol. Hal ini berarti bahwa sterilisasi secara total tidak pernah bisa dicapai. Berdasarkan perhitungan akan dapat diperoleh nilai organisme hidup di bawah satu. Realitanya hal ini tidak mungkin karena organisme hidup merupakan bagian dari sel utuh. Oleh karena itu jika nilai N_t lebih kecil dari satu maka harus dianggap sebagai nilai probabilitas organisme yang masih bertahan hidup. Sebagai contoh jika nilai N_t 0,1, maka hal ini menunjukkan probabilitas organisme yang hidup adalah satu per sepuluh, artinya masih ada resiko satu batch dalam 10 batch terjadi kontaminasi.

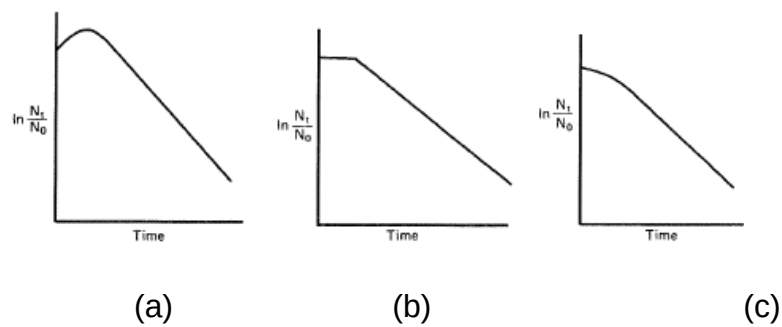


Gambar 5.1. Plot proporsi organisme yang masih hidup dan proporsi logaritmik dari populasi mikroorganisme setelah diberi perlakuan suhu untuk pemusnahan terhadap waktu (Stanbury & Whitaker, 1995).

Gambar 5.1 hanya berlaku untuk sterilisasi terhadap kultur murni dimana populasi organisme hanya mempunyai satu bentuk fisiologi dan dengan kondisi sterilisasi yang ideal. Nilai k tergantung dari jenis spesies seperti ditunjukkan pada Tabel 5.1, serta bentuk fisiologinya. Sebagai contoh endospore dari *Bacillus* jauh lebih tahan terhadap paparan panas dibanding sel vegetatif. Sel vegetatif dapat dimusnahkan dengan cepat pada suhu yang relatif rendah, namun pemusnahan spora memerlukan suhu yang tinggi, yaitu 121°C. Spora *Bacillus stearothermophilus* adalah yang paling tahan terhadap panas. Oleh karena itu *Bacillus stearothermophilus* sering digunakan sebagai organisme uji untuk pengujian sterilisasi berbagai peralatan. Richard (1968) menunjukkan adanya penyimpangan teori tersebut dibandingkan dengan kenyataan di lapangan. Gambar 5.2(a), 5.2(b) dan 5.2(c) menunjukkan pengaruh lama waktu perlakuan suhu terhadap jumlah organisme yang hidup dari populasi endospora bakteri.

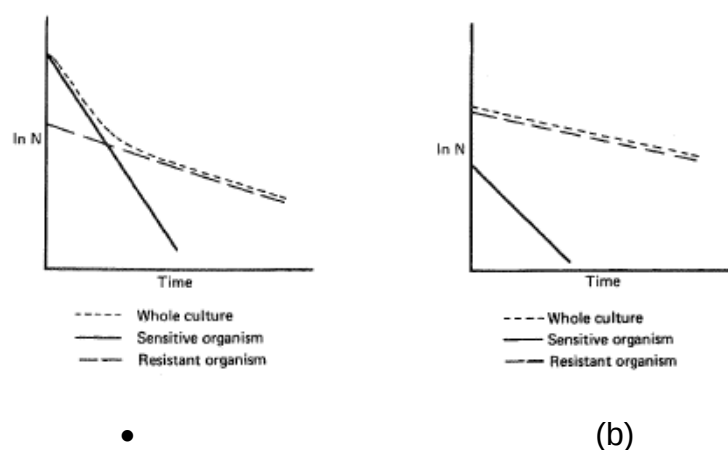
Tabel 5.1 Waktu dan suhu sterilisasi berbagai kelompok organisme

Jenis sel	Waktu sterilisasi, menit	Suhu sterilisasi, °C
Sel vegetatif	5-10	60
Spora jamur/kapang	15	80
Spora bakteri; umumnya	5	121
Spora <i>Bacillus stearothermophilus</i>	15	121



Gambar 5.2. Profile jumlah endospore bakteri yang hidup selama proses sterilisasi. (a) Populasi awal meningkat karena terjadinya aktivasi oleh panas pada awal proses sterilisasi; (b). Populasi awal tetap pada saat awal sterilisasi karena jumlah sel yang mati sama dengan sel yang teraktivasi; (c) Populasi menurun perlahan pada saat awal sterilisasi karena jumlah sel yang mati lebih besar dari pada sel yang teraktivasi. (Richard, 1968)

Gambar 5.3 menggambarkan tipikal proses sterilisasi yang melibatkan dua spesies dengan sensitifitas terhadap panas yang berbeda-beda. Gambar 5.3(a) menunjukkan populasi pada awalnya didominasi oleh spesies yang tidak resisten panas. Penurunan populasi awal yang cepat terjadi karena destruksi sel yang tidak resisten panas, selanjutnya penurunan populasi mulai melambat karena destruksi sel yang lebih resisten panas. Gambar 5.3(b). menggambarkan sebaliknya, dimana populasi awal sel yang resisten panas lebih tinggi dari pada sel yang tidak resisten panas.



Gambar 5.3. (a). Efek sterilisasi pada kultur campuran dimana pada awalnya populasi didominasi oleh kultur yang sensitif panas; (b) Efek sterilisasi pada

kultur campuran dimana pada awalnya populasi didominasi oleh kultur yang resisten panas (Richards, 1968).

Seperti halnya reaksi kimia order satu, dimana laju reaksi meningkat dengan naiknya suhu karena naiknya konstanta laju reaksi. Demikian pula pada proses sterilisasi, konstanta laju pemusnahan organisme juga meningkat dengan naiknya suhu. Hubungan tersebut dapat digambarkan menggunakan persamaan Arrhenius.

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2} \quad (5.4)$$

dimana E : energi aktivasi
 R : konstanta gas ideal
 T : suhu absolut

Jika diintegrasikan akan diperoleh

$$k = Ae^{-E/RT} \quad (5.5)$$

dan dibuat dalam bentuk logaritmik

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (5.6)$$

Kombinasi dari persamaan 5.3 dan 5.5, diperoleh

$$\ln \frac{N_0}{N_t} = A \cdot t \cdot e^{-\left(\frac{E}{RT}\right)} \quad (5.7)$$

Nilai $\ln (N_0/N_t)$ disebut faktor Del, dengan symbol ∇ yang digunakan sebagai kriteria desain untuk proses sterilisasi, oleh karena itu

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} = kt$$

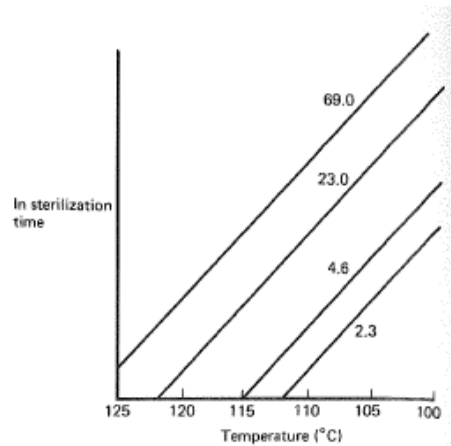
$$kt = A \cdot t \cdot e^{-\left(\frac{E}{RT}\right)}$$

$$\nabla = A \cdot t \cdot e^{-\left(\frac{E}{RT}\right)} \quad (5.8)$$

$$\ln t = \frac{E}{RT} + \ln \left(\frac{\nabla}{A} \right) \quad (5.9)$$

Berdasarkan persamaan (5.9) maka plot logaritmik waktu dengan nilai faktor Del (∇) tertentu pada berbagai temperature akan diperoleh garis lurus, dimana slope tergantung dari nilai energi aktivasi, seperti ditunjukkan pada

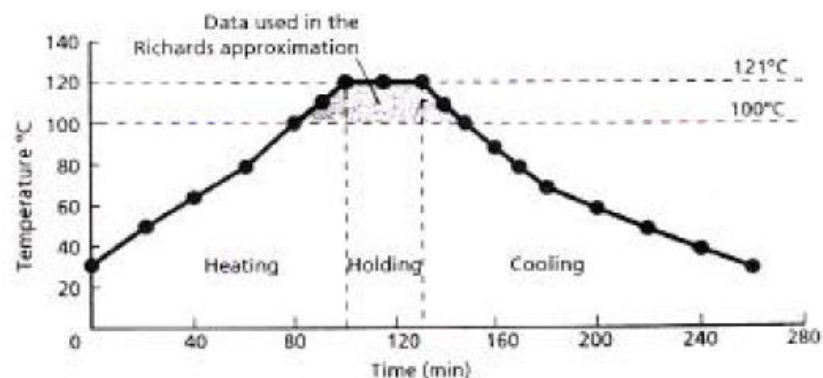
Gambar 5.4. Dari gambar tersebut terlihat bahwa untuk memperoleh kriteria sterilisasi yang sama (∇) dapat dicapai dengan rentang waktu dan suhu absolut yang beragam.



Gambar 5.4. Pengaruh lama dan suhu sterilisasi terhadap Faktor Del untuk memperoleh proses sterilisasi yang diinginkan. Gambar dari setiap garis lurus menunjukkan Faktor Del (Richards, 1968).

Profil proses sterilisasi medium fermentasi secara umum ditunjukkan pada Gambar 5.5, yang secara umum terdiri dari:

- Pemanasan dan pendinginan dalam rentang suhu 0 – 100°C dianggap tidak penting
- Pemanasan dari 100 ke 121°C dengan laju 1° C per menit atau selama 20 menit
- Pendinginan dari 121 ke 100°C dengan laju 1° C per menit atau selama 20 menit



Gambar 5.5. Profil sterilisasi untuk proses fermentasi secara umum (Richard, 1968)

Untuk proses sterilisasi dimana terjadi proses pemusnahan sel, bagian yang penting terdiri dari tiga peristiwa yang terjadi di atas suhu 100°C, yaitu: pemanasan dari 100 ke 121°C, penahanan pada suhu 121°C dan pendinginan dari 121 ke 100°C. Oleh karena itu faktor Del keseluruhan adalah:

$$\nabla_{\text{keseluruhan}} = \nabla_{\text{pemanasan}} + \nabla_{\text{penahanan}} + \nabla_{\text{pendinginan}} \quad (5.10)$$

b. Desain Proses Sterilisasi *Batch*

Keunggulan proses sterilisasi batch dibanding sterilisasi kontinyu adalah:

- 1) Biaya investasi lebih rendah
- 2) Resiko kontaminasi lebih rendah – proses kontinyu memerlukan proses transfer yang aseptik dari medium steril ke tangki steril
- 3) Kontrol proses lebih mudah
- 4) Lebih mudah digunakan untuk medium yang mempunyai kandungan padatan yang tinggi.

Dalam desain proses sterilisasi secara *batch* maka harus tersedia data sebagai berikut:

- 1) Profil kenaikan dan penurunan suhu dari medium fermentasi selama proses pemanasan dan pendinginan dalam siklus sterilisasi.
- 2) Jumlah organisme awal yang ada dalam medium
- 3) Karakteristik pemusnahan termal dari organisme yang ingin dimusnahkan, dan dianggap sebagai spora *Bacillus stearothermophilus*
- 4) Tingkat resiko kontaminasi yang masih diperbolehkan untuk proses

Pada umumnya, proses sterilisasi dilakukan dengan nilai probabilitas kontaminasi yang dapat diterima sebesar 0,1% (1 dalam 1000) yang berarti jumlah sel hidup (N_t) yang masih dapat diterima adalah 10^{-3} . Oleh karena itu, jika jumlah sel awal (N_o) diketahui, maka faktor Del ($\nabla = N_o / N_t$) dapat dihitung. Sebagai contoh jika sebelum sterilisasi medium mengandung kontaminan 10^{11} organisme hidup, maka factor Del adalah:

$$\nabla = \ln \frac{N_o}{N_t} = \ln \frac{10^{11}}{10^{-3}} = 32,2$$

Oleh karena itu faktor Del keseluruhan yang dibutuhkan adalah 32,2. Dengan diketahui profil suhu terhadap waktu selama proses pemanasan dan pendinginan medium fermentasi selama proses sterilisasi (tergantung dari karakteristik peralatannya) maka faktor Del untuk penahan pada suhu konstan dapat diketahui.

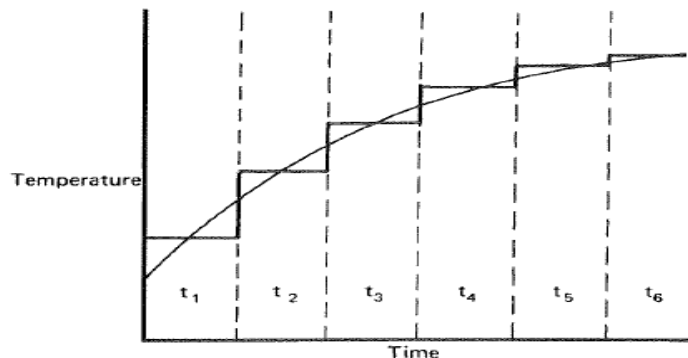
Faktor Del untuk pemanasan dan pendinginan dapat dihitung menggunakan Persamaan 5.8. Namun karena selama selang waktu ini suhu tidak konstan, maka perhitungan ∇ memerlukan integrasi dari Persamaan 8.8. Richards (1968) menggunakan penggunaan metode grafis untuk menyelesaikan persamaan integral tersebut seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.6. Dalam gambar ini sumbu waktu dibagi menjadi sejumlah kenaikan yang sama t_1, t_2, t_3 , dll. Untuk setiap kenaikan, suhu yang sesuai dengan waktu titik tengahnya ditentukan. Faktor Del total dari periode pemanasan sama dengan jumlah faktor Del dari titik tengah suhu untuk setiap kenaikan waktu. Nilai faktor Del yang sesuai dengan setiap kenaikan waktu selanjutnya dapat dihitung dari persamaan:

$$\nabla_1 = k_1 t$$

$$\nabla_2 = k_2 t$$

$$\nabla_3 = k_3 t \dots\dots \text{dst}$$

Jumlah faktor Del untuk semua selang kenaikan akan sama dengan faktor Del pemanasan. Faktor Del untuk periode pendinginan dapat dihitung dengan cara yang sama.



Gambar 5.6. Integrasi dengan cara grafis dari kenaikan suhu selama selang waktu t_1, t_2 dst dengan interval waktu yang sama (Richard, 1968)

Perhitungan faktor Del untuk penahanan pada suhu konstan. Dari perhitungan sebelumnya, faktor Del keseluruhan, serta faktor Del dari bagian dari siklus pemanasan dan pendinginan, telah ditentukan. Oleh karena itu, faktor Del yang akan dicapai selama waktu penahanan dapat dihitung dengan persamaan 5.10. Dari contoh sebelumnya dimana faktor Del keseluruhan adalah 32,2 dan jika diambil faktor Del pemanasan adalah 9,8 dan faktor Del pendinginan 10,1, maka faktor Del penahanan dapat dihitung:

$$\nabla_{\text{penahanan}} = 32,2 - 9,8 - 10,1 = 12,3$$

$$\nabla = kt$$

Dan laju pemusnahan spesifik spora *B. stearothermophilus* pada suhu 121°C adalah 2,54 menit⁻¹. Oleh karena itu

$$t = \frac{\nabla}{k} = \frac{12,3}{2,54} = 4,84 \text{ mnt}$$

Jika kontribusi faktor Del pemanasan dan pendinginan diabaikan maka waktu yang diperlukan untuk menahan suhu konstan adalah:

$$t = \frac{\nabla_{\text{keseluruhan}}}{k} = \frac{32,2}{2,54} = 12,68 \text{ mnt}$$

Oleh karena itu, dengan mempertimbangkan kontribusi bagian pemanasan dan pendinginan dari siklus dalam proses sterilisasi, pengurangan waktu pemaparan panas yang cukup besar dapat dicapai.

Cara yang lebih mudah diusulkan oleh Richards (1968). Metode ini mengasumsikan bahwa seluruh pemusnahan spora terjadi pada suhu di atas 100°C. Richard memberikan Table faktor Del untuk *B. stearothermophilus* seperti yang ditampilkan pada Tabel 5.2. Jika laju perubahan suhu adalah 1°C per menit maka nilai faktor Del dapat dibaca secara langsung pada table. Jika laju perubahan suhu tidak sama dengan 1°C per menit maka faktor Del dapat dihitung dengan mudah.

Tabel 5.2. Nilai faktor Del spora *B. stearothermophilus* dengan pemanasan pada suhu mulai 100 hingga 130°C. Asumsi bahwa laju pemanasan adalah 1°C per menit dan pemusnahan spora pada suhu di bawah 100°C diabaikan.

T (°C)	k (min ⁻¹)	∇
100	0.019	—
101	0.025	0.044
102	0.032	0.076
103	0.040	0.116
104	0.051	0.168
105	0.065	0.233
106	0.083	0.316
107	0.105	0.420
108	0.133	0.553
109	0.168	0.720
110	0.212	0.932
111	0.267	1.199
112	0.336	1.535
113	0.423	1.957
114	0.531	2.488
115	0.666	3.154
116	0.835	3.989
117	1.045	5.034
118	1.307	6.341
119	1.633	7.973
120	2.037	10.010
121	2.538	12.549
122	3.160	15.708
123	3.929	19.638
124	4.881	24.518
125	6.056	30.574
126	7.506	38.080
127	9.293	47.373
128	11.494	58.867
129	14.200	73.067
130	17.524	90.591

Sebagai contoh medium fermentasi dipanaskan dari 100 – 121°C dalam 30 menit dan didinginkan dari 121 – 100°C dalam 17 menit, maka faktor Del pada siklus pemanasan dan pendinginan adalah sebagai berikut:

Untuk siklus pemanasan dan pendinginan dengan laju 1°C per menit nilai faktor Del = 12,549. Jika siklus pemanasan mempunyai laju 21°C dalam 30 menit maka:

$$\nabla_{pemanasan} = \frac{12,549 \times 30}{21} = 17,93 \text{ mnt}$$

Dan jika siklus pendinginan mempunyai laju 21°C dalam 17 menit maka:

$$\nabla_{pendinginan} = \frac{12,549 \times 17}{21} = 10,16 \text{ mnt}$$

c. Perbesaran Skala Proses Sterilisasi *Batch*

Faktor Del dapat digunakan sebagai acuan untuk proses perbesaran skala. Perlu diingat dalam perhitungan faktor Del yang diperlukan adalah data jumlah organisme hidup (Nt) bukan konsentrasi, oleh karena itu jika

perbesaran skala dilakukan maka volume harus diperhitungkan. Sebagai contoh jika sterilisasi dilakukan untuk fermentor dengan volume 1000 dm³ dengan medium yang mengandung kontaminan 10⁶ organisme/cm³ serta menggunakan probabilitas kontaminasi 1 dalam 1000, maka faktor Del akan menjadi:

$$\nabla = \ln \left(\frac{10^6 \times 10^3 \times 10^3}{10^{-3}} \right) = 34,5$$

Jika digunakan probabilitas kontaminasi yang sama untuk fermentor ukuran 10.000 dm³ maka fak Del akan menjadi:

$$\nabla = \ln \left(\frac{10^6 \times 10^3 \times 10^4}{10^{-3}} \right) = 36,8$$

Oleh karena itu faktor Del akan meningkat dengan bertambah besarnya volume fermentor.

d. Sterilisasi Kontinyu

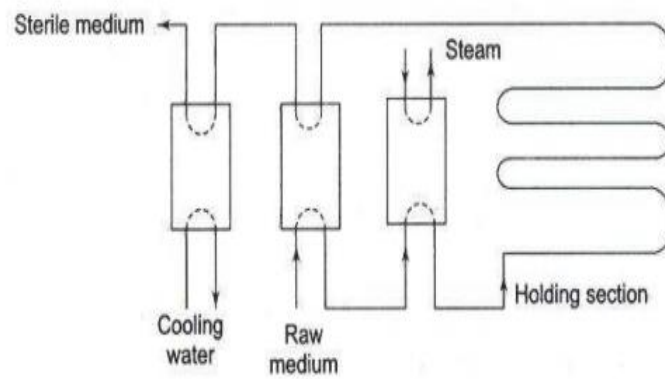
Keunggulan sterilisasi kontinyu dibanding batch adalah:

- 1) Kualitas medium setelah sterilisasi lebih baik dibandingkan sterilisasi batch
- 2) Lebih mudah dilakukan perbesaran skala
- 3) Lebih mudah dalam membuat peralatan kontrol otomatis
- 4) Menurunkan kapasitas uap air yang terbuang
- 5) Menurunkan siklus waktu untuk sterilisasi
- 6) Pada keadaan tertentu dapat menurunkan tingkat korosi fermentor

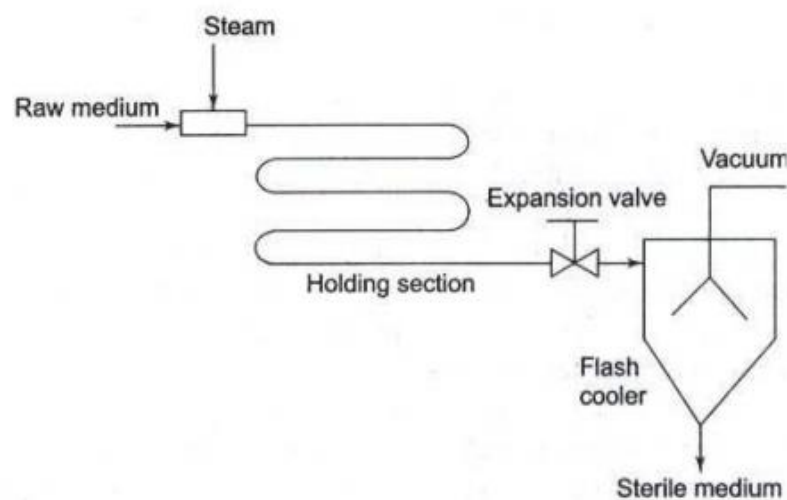
Terdapat dua metode sterilisasi kontinyu, yaitu:

- 1) Pertukaran panas melalui pelat secara kontinyu
- 2) Injeksi uap secara kontinyu dan pendinginan flash

Skema sterilisasi kontinyu dengan kedua metode tersebut ditunjukkan pada Gambar 5.9.



(a)



(b)

Gambar 5.9. a) Pertukaran panas melalui pelat secara kontinyu; (b) Injeksi uap secara kontinyu dan pendinginan *flash*

Untuk metode pertukaran panas melalui pelat secara kontinyu:

- 1) Medium tidak steril yang masuk dipanaskan terlebih dahulu dengan panas berasal dari alat penukar panas dari medium steril keluar.
- 2) Selanjutnya dipanaskan dengan uap di dalam alat penukar panas dan melewati bagian penahanan
- 3) Pada bagian penahanan medium diatur sesuai dengan waktu penahanan yang diinginkan, dan laju alir medium.

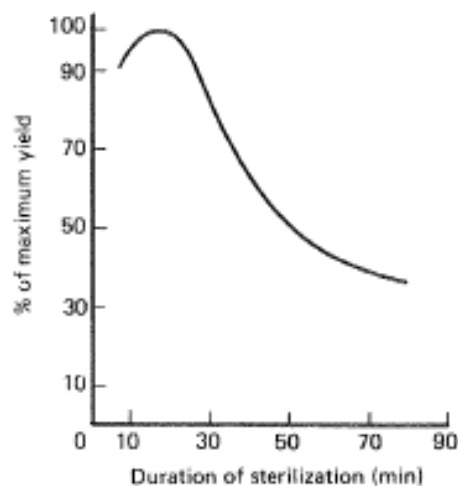
Untuk metode injeksi uap secara kontinyu dan pendinginan *flash*:

- 1) Uap air diinjeksikan secara langsung dan terus menerus bersama dengan mediumnya

- 2) Oleh karena itu, waktu pemanasan dan waktu bagian pemanasan diabaikan
- 3) Waktu penahanan didasarkan pada panjang pipa penahan, dimana sterilisasi terjadi
- 4) Uap air dan medium steril bertekanan melewati katup ekspansi ke ruang vakum, dimana uap air dibuang
- 5) Medium steril masuk ke dalam alat penukar panas awal dan melepaskan panas ke medium tidak steril masuk dan selanjutnya masuk ke daerah pendinginan

e. Kerusakan medium

Efek dari proses sterilisasi, selain musnahnya organisme hidup, komponen dalam medium fermentasi juga akan mengalami penurunan kualitas nutrisi. Gambar 5.7 menunjukkan pengaruh pemanasan terhadap perolehan produk fermentasi. Peningkatan perolehan produk fermentasi pada awal sterilisasi disebabkan oleh adanya efek “pemasakan” terhadap medium sehingga menjadi bentuk yang lebih mudah dikonsumsi oleh mikroorganisme.



Gambar 5.7. Pengaruh lama sterilisasi terhadap perolehan produk fermentasi (Richards, 1968)

Dua jenis reaksi yang berkontribusi terhadap penurunan kualitas nutrisi medium selama proses sterilisasi adalah:

- 1) Interaksi antar komponen dalam medium. Yang umum terjadi selama proses sterilisasi adalah terjadinya reaksi *Maillard*, yaitu berubahnya

medium menjadi berwarna coklat. Reaksi ini biasanya terjadi antara gugus karbonil, biasanya dari gula reduksi dengan asam amino dan protein. Jika reaksi pencoklatan terjadi maka sterilisasi komponen karbohidrat sebaiknya dilakukan secara terpisah dengan komponen lainnya dan dicampur kembali setelah dingin.

- 2) Degradasi dari komponen yang tidak tahan panas seperti vitamin dan asam amino. Kerusakan komponen ini dapat diminimalkan dengan melakukan sterilisasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Kerusakan komponen medium yang tidak tahan panas juga dapat digambarkan sebagai reaksi order satu, sehingga persamaannya mirip dengan kinetika pemusnahan organisme:

$$\frac{x_t}{x_0} = e^{-kt} \quad (5.11)$$

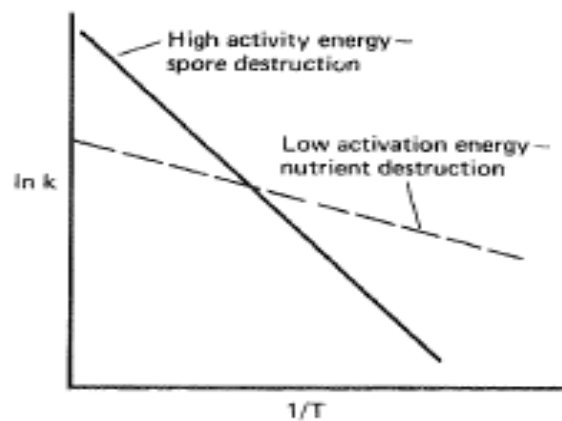
dimana x_t : jumlah nutrien setelah disterilisasi selama waktu t

x_0 : jumlah awal nutrien pada saat awal sterilisasi

Pengaruh suhu terhadap konstanta laju reaksi dapat dinyatakan dengan persamaan Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (5.12)$$

Plot logaritmik natural terhadap $1/T$ menghasilkan garis lurus dengan slope $-(E/RT)$. Karena R merupakan suatu konstanta, maka nilai slope ditentukan oleh energi aktivasi. Energi aktivasi dari spora *B. stearothermophilus* adalah 67,7 kcal.mol⁻¹ sedangkan destruksi nutrient adalah 10⁻³⁰ kcal.mol⁻¹ (Richards, 1968). Gambar 5.8 menunjukkan plot Arrhenius untuk dua reaksi yang mempunyai nilai energi aktivasi yang berbeda. Dari gambar tersebut terlihat bahwa jika suhu dinaikkan maka komponen yang mempunyai nilai energi aktivasi yang lebih tinggi akan mempunyai laju reaksi yang lebih cepat. Oleh karena itu berdasarkan energi aktivasi pemusnahan spora *B. stearothermophilus* dan degradasi medium maka kenaikan suhu akan mempercepat pemusnahan spora dari pada degradasi medium.



Gambar 5.8. Pengaruh energi aktivasi terhadap pemusnahan spora dan degradasi medium

f. Sterilisasi Medium dengan Filter

Metode filtrasi juga sering digunakan untuk sterilisasi medium yang tidak tahan terhadap panas. Filter dapat berupa membrane yang terbuat dari ester selulosa atau polimer yang lain digunakan untuk sterilisasi medium yang tidak tahan terhadap panas, seperti vitamin, protein, asam amino dll. Filter dapat mempunyai ukuran pori antara 0,22 – 0,45 μm . Membran tersebut sebelum digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan uap air atau radiasi. Partikel atau organisme yang berukuran lebih besar dari pori-pori membrane akan tertahan dipermukaan membrane sedangkan cairan steril akan melewati membrane dan ditampung dalam wadah yang steril. Metode sterilisasi ini tidak efektif dibandingkan dengan sterilisasi menggunakan uap air.

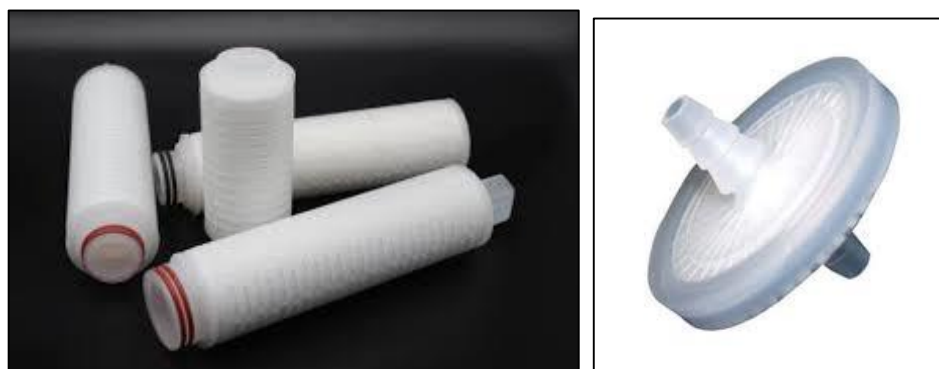
2. Sterilisasi Udara

Jumlah sel mikroba di udara berkisar antara 10^3 – 10^4 / m^3 . Kebutuhan oksigen untuk metabolisme sel dalam fermentasi aerobik dipasok dari udara yang terlebih dahulu disterilisasi. Selain itu campuran gas keluar dari fermentor juga harus steril untuk menghindari lolosnya organisme yang tidak diinginkan ke lingkungan. Beberapa metode sterilisasi dapat dilakukan seperti sterilisasi dengan panas, namun ini tidak praktis dan tidak ekonomis, radiasi dengan sinar UV, penyemprotan bahan antijamur seperti fenol etilen oksida, dan formalin, dan sterilisasi dengan cara filtrasi. Hingga saat ini metode utama yang digunakan

untuk mensterilkan gas masuk dan keluar fermentor adalah dengan filtrasi/penyaringan. Dua jenis filter yang sering digunakan untuk sterilisasi udara adalah:

Absolut Filter. Filter ini mempunyai pori-pori dengan ukuran yang lebih kecil dari mikroorganisme yang akan difilter. Filter dapat terbuat dari keramik, kaca sinter, bahan sintesis seperti Teflon, atau logam. Membran filter yang tersedia mempunyai ukuran pori nominal 0,2-0,01 μm . Membran mempunyai efektifitas hingga 100% dalam menghilangkan mikroorganisme. Filter absolut secara umum memiliki dua kelemahan utama ketika digunakan untuk mensterilisasi udara dengan volume yang besar, yaitu biaya yang mahal dan terjadinya penurunan tekanan yang besar.

Filter Berserat. Filter ini mempunyai diameter pori yang lebih besar dari pada mikroorganisme yang akan disaring. Filter biasanya dibuat dari unggun (bed) atau lapisan dari bahan berserat seperti kertas, kapas atau kaca, dan wol terak mineral. Diameter serat pada umumnya berkisar antara 0,5–15 μm dan dalam banyak kasus celah antar serat mempunyai jarak yang lebih besar dari pada diameter porinya. Meskipun demikian, filter tersebut cukup efektif untuk menghilangkan spora bakteri dari aliran udara yang diameternya kira-kira 1 μm atau kurang. Terdapat beberapa faktor yang berkontribusi dalam menghilangkan kontaminan dari aliran gas. Faktor terpenting diantaranya adalah penjeraban langsung oleh serat, impaksi inersia, pengendapan secara gravitasi, gerak Brown, konveksi, gaya tarik listrik yang timbul akibat adanya perbedaan muatan awal antara partikel dan serat, dan gaya tarik listrik yang timbul dari perbedaan muatan hasil induksi.



Gambar 5.9. Filter untuk sterilisasi udara

C. Latihan Soal

1. Apa perbedaan antara kondisi steril dan aseptik?
2. Jelaskan secara singkat berbagai teknik sterilisasi yang digunakan dalam proses produksi industri?
3. Adakah peran agen antibakteri di medium sterilisasi.
4. Hitung nilai faktor Del pada setiap tahap siklus sterilisasi untuk proses sterilisasi fermentor 1000 dm^3 menggunakan suhu 121°C jika pada pemanasan dari 100 ke 121°C dan serta pendinginan dari 121 ke 100°C memerlukan waktu berturut-turut 25 dan 20 menit. Jumlah mikroba awal (*B. stearothermophilus*) adalah 10^{13} dan probabilitas kontaminasi yang diinginkan adalah 10^{-3} .
5. Dari data soal no 4 jika dilakukan perbesaran skala menjadi volume fermentor 10.000 dm^3 , berapa nilai faktor Del?

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Bader FG (1986) Sterilization: Prevention of contamination. In: Demain A and Solomon NA (eds.) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, pp. 345–361. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). Principles of Fermentation Technology, 2nd, Pergamon Press
- Richards JW (1968) Introduction to Industrial Sterilisation. London: Academic Press.
- Wallhäusser KH, (1985) Chapture Sterilisation. In: Rehm H-J and Reed G (eds.) Sterilisation: Biotechnology, vol. 2, pp. 700–716. Weinheim: VCH.

PERTEMUAN 6

KINETIKA PERTUMBUHAN SEL

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami kinetika pertumbuhan sel untuk kultur curah
2. Memahami perhitungan perolehan sel dinyatakan terhadap konsumsi bahan yang lain
3. Memahami kinetika pertumbuhan sel dengan model Monod dan model penghambatan

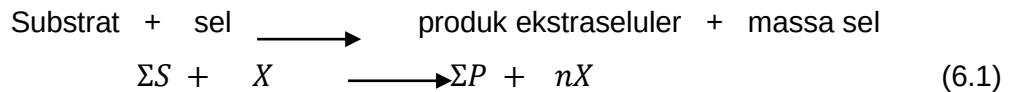
B. Uraian Materi

Pertumbuhan adalah respon yang paling penting dari mikroba terhadap lingkungan fisikokimianya. Pertumbuhan merupakan hasil dari replikasi dan perubahan ukuran sel. Mikroorganisme dapat tumbuh di bawah berbagai kondisi fisik, kimia, dan nutrisi. Dalam media dengan nutrisi yang sesuai, organisme mampu tumbuh dengan baik dengan memanfaatkan nutrisi untuk diubah menjadi berbagai senyawa metabolit, energi, serta biosintesis dan pembentukan produk. Seiring dengan waktu fermentasi, konsumsi nutrisi akan meningkatkan jumlah biomasanya. Secara teoritis, pertumbuhan sel sangat rumit karena jalur metabolisme yang juga rumit. Dalam bab ini, kita akan mempelajari bagaimana secara kuantitatif sel tumbuh berdasarkan pengamatan eksperimental, bagaimana kinetika yang rumit dapat disederhanakan serta bagaimana kultur sel dan fermentasi dimodelkan atau diprediksi secara kuantitatif.

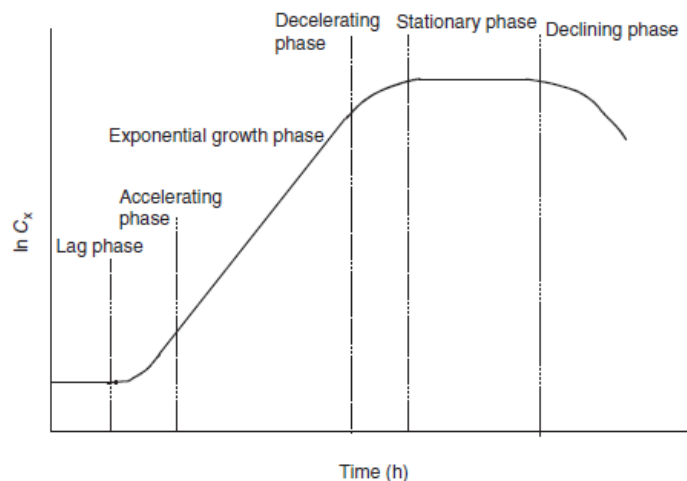
1. Kinetika Pertumbuhan dalam Reaktor Curah

Pertumbuhan merupakan respon organisme yang paling penting terhadap lingkungan fisikokimianya. Pertumbuhan merupakan hasil dari replikasi dan perubahan ukuran sel. Mikroorganisme dapat tumbuh pada berbagai kondisi fisik, kimia, dan nutrisi. Dalam media yang sesuai, organisme mengambil nutrisi dan mengubahnya menjadi senyawa biologis, energi dan produk. Mikroba mengandung 80-90% air, beberapa elemen penting – seperti karbon, nitrogen,

fosfor, belerang, serta beberapa elemen logam lainnya oleh karena itu komponen-komponen tersebut harus tersedia dalam medium pertumbuhannya. Sebagai hasil dari pemanfaatan nutrisi, massa mikroba meningkat seiring dengan waktu yang dapat dinyatakan secara sederhana sebagai berikut:



Jika media cair diinokulasi dengan inokulum, maka mikroba akan menggunakan nutrisi tersebut dan mengubahnya menjadi biomassa. Mikroba akan tumbuh dengan fase-fase berikut: (1) fase lag, (2) logaritmik atau fase pertumbuhan eksponensial, (3) fase perlambatan, (4) fase diam, dan (5) fase kematian. Gambar 6.1 menunjukkan siklus pertumbuhan mikroba dalam reaktor curah.



Gambar 6.1. Kurva pertumbuhan sel kultur curah

a. Fase lag

Fase lag merupakan fase adaptasi, dimana sel beradaptasi dengan lingkungan baru setelah inokulasi. Mikroba mereorganisasi konstituen molekulnya ketika dipindahkan ke media baru. Enzim baru akan disintesis dan enzim yang lain dihambat, menyesuaikan dengan lingkungan baru. Perubahan ini menunjukkan terjadinya mekanisme regulasi intraseluler dari proses metabolisme sel. Selama fase ini, massa sel hanya meningkat sedikit tanpa peningkatan kepadatan jumlah sel. Jika jumlah inokulum kecil dan memiliki kepadatan sel yang rendah atau nutrisi yang tidak sesuai, maka

akan ada fase lag yang panjang (*fase pseudo-lag*). Umur kultur inokulum juga sangat berpengaruh terhadap lamanya fase lag. Oleh karena itu untuk memperpendek fase lag maka media pertumbuhan dan kondisi sebelum inokulasi harus sesuai, sel inokulum harus berumur muda (atau dalam fase eksponensial) dan aktif, serta jumlah inokulum harus besar (biasanya 5% sampai 10% volume). Fase lag berganda (*multiple lag phase*) dapat terjadi jika media mengandung lebih dari satu sumber karbon. Fenomena ini dikenal dengan *diauxic growth* yang disebabkan oleh terjadinya perubahan jalur metabolisme. Setelah satu sumber karbon habis, sel akan menyesuaikan aktivitas metabolismenya untuk memanfaatkan sumber karbon kedua. Sumber karbon yang pertama kali dikonsumsi sel adalah yang paling mudah digunakan terlebih dahulu hingga habis dan selanjutnya baru mengonsumsi sumber karbon kedua. Adanya sumber karbon yang lebih mudah digunakan akan menekan sintesis enzim yang diperlukan untuk metabolisme substrat kedua.

b. Fase Pertumbuhan Eksponensial

Fase pertumbuhan eksponensial juga dikenal sebagai fase pertumbuhan logaritmik. Pada fase pertumbuhan ini, sel-sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya sehingga dapat berkembang biak dengan cepat dengan kecepatan maksimum. Massa sel dan kepadatan jumlah sel meningkat secara eksponensial dengan berjalannya waktu. Malthus memberikan persamaan laju pertumbuhan sel dengan basis sel kering r_x (dinyatakan sebagai $\text{kg sel kering} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{jam}^{-1}$) sebagai berikut:

$$r_X = \frac{dC_X}{dt} = \mu C_X \quad (6.2)$$

Integrasi persamaan 4.2. pada laju pertumbuhan maksimum diperoleh:

$$\ln \frac{C_X}{C_{X0}} = \mu_{max} t \quad (6.3)$$

$$\text{atau} \quad C_X = C_{X0} e^{\mu_{max} t} \quad (6.4)$$

di mana C_x adalah konsentrasi sel (berat kering sel per satuan volume media), dan μ_{max} (h^{-1}) adalah laju pertumbuhan spesifik maksimum. Contoh laju pertumbuhan spesifik dari beberapa mikroorganisme diberikan pada Tabel 6.1.

Tabel 6.1. Laju pertumbuhan spesifik beberapa mikroba

Bacteria or cells	Temperature (°C)	Specific growth rate (h ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i>	40	2.0
<i>Aspergillus niger</i>	30	0.35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	0.17–0.35
HeLa cell	37	0.015–0.023

Waktu yang diperlukan oleh sel untuk meningkatkan konsentrasi sel (massa atau jumlah) menjadi dua kalinya (waktu penggandaan (*doubling time*), t_d (h)) dapat dihitung dengan mengintegrasikan persamaan 6.5, diperoleh:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (6.5)$$

c. Fase Perlambatan Pertumbuhan

Pada fase perlambatan, pertumbuhan sel melambat karena berkurangnya nutrisi atau terakumulasi produk samping yang dapat menghambat pertumbuhan. Lingkungan yang berubah dengan cepat menghasilkan pertumbuhan yang tidak seimbang sehingga menyebabkan komposisi dan ukuran sel akan berubah. Pada fase eksponensial, sistem metabolisme sel berada pada kondisi untuk mencapai laju reproduksi maksimum. Pada fase perlambatan, karena nutrisi sudah berkurang atau adanya akumulasi produk samping maka terjadi restrukturisasi sel sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang kurang sesuai. Model Malthus tidak dapat dipakai lagi pada fase ini. Verhulst memodifikasi model ini dengan menambahkan faktor penghambatan pertumbuhan biomassa, yang ditulis menjadi:

$$r_X = kC_X \left(1 - \frac{C_X}{C_{X\infty}}\right) \quad (6.6)$$

di mana $C_{X\infty}$ adalah kapasitas sel dalam medium dan k adalah koefisien kapasitas sel. Integrasi persamaan (6.7) diperoleh:

$$C_X = \frac{C_{X0}e^{kt}}{1 - \frac{C_{X0}}{C_{X\infty}}(1 - e^{kt})} \quad (6.7)$$

Persamaan 6.7 disebut juga dengan persamaan logistic. Model logistic ini dapat menjelaskan pertumbuhan pada fase logaritmik, fase perlambatan maupun stasioner.

d. Fase Stasioner

Fase stasioner dimulai dari akhir fase perlambatan, ketika laju pertumbuhan adalah nol maka tingkat pertumbuhan sama dengan tingkat kematian sel. Sel yang mati mengalami lisis dan nutrisi intraseluler dilepaskan ke dalam medium yang selanjutnya digunakan oleh sel selama fase stasioner. Meskipun laju pertumbuhan nol namun sel masih aktif secara metabolik dan dapat menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan produk yang dihasilkan sel yang tidak terkait dengan pertumbuhan, sebaliknya metabolit primer adalah produk yang terkait pertumbuhan. Pada fase ini berbagai produk metabolit sekunder yang bermanfaat telah dihasilkan hingga skala industri, seperti antibiotik, hormone, dll. Selama fase stasioner, satu atau lebih dari fenomena berikut ini mungkin terjadi:

- 1) Konsentrasi massa sel total tetap konstan, tetapi jumlah sel yang hidup berkurang.
- 2) Lisis sel dapat terjadi, dan massa sel yang hidup turun. Fase pertumbuhan kedua dapat terjadi, dimana sel tumbuh dengan mengkonsumsi produk lisis dari sel (cryptic growth).
- 3) Sel tidak tumbuh tetapi memiliki metabolisme yang aktif untuk menghasilkan metabolit sekunder. Metabolisme sel berubah ketika konsentrasi metabolit tertentu (karbon, nitrogen, fosfat) rendah. Metabolit sekunder dihasilkan sebagai hasil dari deregulasi metabolit.

e. Fase Kematian

Fase kematian (atau fase penurunan) adalah fase dimana terjadi laju kematian sel lebih tinggi dari pada pertumbuhan. Di akhir stasioner, baik karena kurangnya nutrisi atau akumulasi produk beracun, maka mulai terjadi fase kematian. Laju kematian dapat dianggap sebagai reaksi orde satu dan dapat ditulis:

$$r_X = -k_d C_X \quad (6.8)$$

K_d adalah konstanta laju kematian yang merupakan order satu. Perhitungan neraca massa sel di dalam reaktor menghasilkan:

$$-k_d C_X V = r_x V = \frac{d(C_X V)}{dt} \quad (6.9)$$

Integrasi persamaan 6.9 dengan V konstan diperoleh:

$$C_X = C_{X_{S0}} e^{-k_d t} \quad (6.10)$$

dimana $C_{X_{S0}}$ adalah konsentrasi massa sel pada awal fase stasioner.

2. Perolehan Biomassa

Pirt (1975) mengkaitkan kinetika pertumbuhan dengan produk yang terkait dengan pertumbuhan sel secara sederhana. Parameter perolehan (*yield*) seperti biomassa dan produk yang dihasilkan selama pertumbuhan sel dinyatakan terhadap konsumsi bahan yang lain. Untuk perolehan biomassa dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$Y_{X/S} = \frac{C_X - C_{X0}}{C_{S0} - C_S} \quad (6.11)$$

di mana C_S adalah konsentrasi massa substrat, C_{S0} dan C_{X0} masing-masing adalah nilai awal C_S dan C_X . Perolehan sel untuk beberapa mikroorganisme dengan beberapa substrat diberikan pada Tabel 6.2. Pertumbuhan sel dapat juga dinyatakan dalam nutrisi yang lain, seperti oksigen:

$$Y_{X/O_2} = \frac{dC_X|_{growth}}{-d[O_2]} \quad (6.12)$$

Sedangkan untuk laju perolehan produk dapat dinyatakan sebagai:

$$Y_{P/S} = \frac{dC_P}{-dS} \quad (6.13)$$

Tabel 6.2. Perolehan sel beberapa mikroorganisme

Microorganisms	Substrate	Y_{xs} (kg dry cell (kg substrate) ⁻¹)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Glucose	0.40
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose (aerobic)	0.50
<i>Candida utilis</i>	Glucose	0.51
<i>Candida utilis</i>	Acetic acid	0.36
<i>Candida utilis</i>	Ethanol	0.68
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glucose	0.38

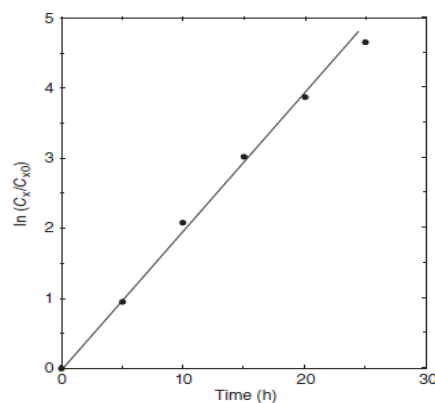
Contoh 6.1

Sel ragi tumbuh pada fase eksponensial. Konsentrasi massa sel diberikan pada tabel di bawah. Hitung laju pertumbuhan spesifik, $\mu_{\max}$.

Waktu (jam)	0	5	10	15	20	25
Konsentrasi sel, C_x	0,5	1,3	4,0	10,2	24,0	52,5

Jawab:

Plot $\ln(C_x/C_{x0})$ terhadap waktu kultivasi (Gambar 6.2) memberikan garis lurus, dengan kemiringan yang merupakan nilai $\mu_{\max} = 0,20 \text{ jam}^{-1}$.



Gambar 6.2. Penentuan laju pertumbuhan spesifik pada fase pertumbuhan eksponensial

Contoh 6.2.

Kultivasi kapang yang ditumbuhkan dalam kultur curah menggunakan sumber karbon glukosa menghasilkan data sebagai berikut:

Waktu, jam	Konsentrasi sel, g/L	Konsentrasi Glukosa, g/L
0	1.0	50.0
10	1.5	48.5
18	2.9	45.2
25	5.5	38.8
33	11.40	24.0
37	16.3	11.8
40	19.2	4.5
44	20,9	0,3

- Hitunglah laju pertumbuhan spesifik maksimum.
- Hitunglah perolehan sel.
- Berapa konsentrasi sel maksimum yang dapat dihasilkan jika digunakan 150 g glukosa dengan menggunakan jumlah inokulum yang sama?
- Berapa generasi sel yang ada dalam kultur pada bagian c).

Jawab:

- Laju pertumbuhan spesifik maksimum dapat dihitung dari selisih laju pada setiap waktu seperti ditampilkan pada tabel berikut:

Waktu, jam	Konsentrasi sel, g/L	$\Delta C_x / (C_x \cdot \Delta t) \text{ h}^{-1}$
0	1.0	
10	1.5	0.033
18	2.9	0.060
25	5.5	0.068
33	11.4	0.065
37	16.3	0.075

40	19.2	0.050
44	20.9	0.020

Dari tabel di atas diperoleh laju pertumbuhan spesifik maksimum, $\mu_{\max} = 0,075 \text{ jam}^{-1}$.

$$\text{b. } Y_{C_X/C_S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{20,9-1,0}{50,0-0,3} = 0,400$$

$$\text{c. } C_{X_{\max}} = C_{X_0} + Y_{C_X/C_S} C_{S_0} = 1,0 + 0,4(150) = 61,0 \text{ g sel/L}$$

d. Sel berlipat ganda dengan meningkatnya generasi, oleh karena itu:

$$\frac{C_X}{C_{X_0}} = 2^n \text{ atau } n = \ln\left(\frac{C_X}{C_{X_0}}\right) / \ln 2$$

$$\text{atau } n = \frac{\ln\left(\frac{C_X}{C_{X_0}}\right)}{\ln 2} = \frac{\ln\left(\frac{61,0}{1,0}\right)}{\ln 2} = 5,93$$

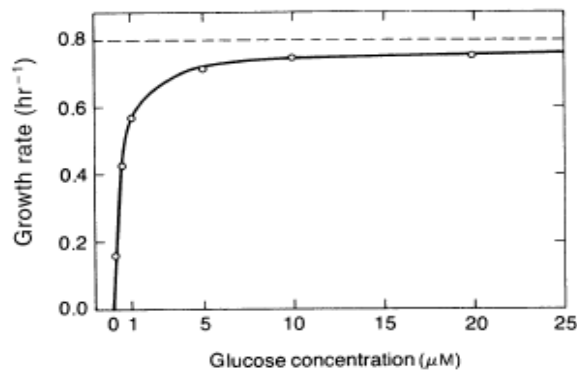
Sehingga terdapat: $1+6 = 7$ generasi pada akhir kultivasi

3. Model Pertumbuhan Sel Monod

Laju pertumbuhan sel dipengaruhi oleh suhu, pH, komposisi medium, tingkat pasokan udara, dan faktor lainnya. Dalam hal semua kondisi lain dipertahankan konstan, laju pertumbuhan spesifik dipengaruhi oleh konsentrasi substrat tertentu (substrat pembatas) seperti ditunjukkan pada Gambar 6.3. Ekspresi empiris paling sederhana untuk efek konsentrasi substrat pada laju pertumbuhan spesifik adalah diberikan oleh Persamaan Monod, yang bentuknya mirip dengan persamaan Michael-Menten untuk reaksi enzim:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \quad (6.14)$$

dimana C_S adalah konsentrasi substrat pembatas (kmol.m^{-3}) dan konstanta K_S sama dengan konsentrasi substrat di mana laju pertumbuhan spesifiknya adalah setengah dari $\mu_{\max}$ (h^{-1}). Persamaan Monod sesuai untuk menggambarkan pertumbuhan sel dengan substrat tunggal sebagai factor pembatas untuk sel dengan pertumbuhan lambat serta dan kepadatannya rendah. Dalam keadaan ini, kondisi lingkungan yang mempengaruhi hanya konsentrasi substrat saja.



Gambar 6.3. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju pertumbuhan spesifik dari *E. coli*.

Jika konsumsi substrat cepat, maka dapat terbentuk produk samping yang beracun. Pada kepadatan sel yang tinggi, akumulasi produk samping yang beracun perlu dipertimbangkan. Persamaan laju pertumbuhan sel untuk kultur padat dan tumbuh cepat dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_{S0} C_{S0} + C_S} \quad (6.15)$$

dimana C_{S0} adalah konsentrasi substrat awal, dan K_{S0} merupakan bilangan tak berdimensi.

a. Model Pertumbuhan dengan Faktor Penghambatan

Penghambatan substrat. Pada konsentrasi substrat yang tinggi, laju pertumbuhan sel akan dihambat oleh substrat. Seperti dalam kinetika enzim, penghambatan pertumbuhan substrat dapat bersifat kompetitif atau nonkompetitif. Model dan ekspresi penghambatan pertumbuhan oleh substrat adalah sebagai berikut:

1. Hambatan oleh substrat secara kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{K_{CS} \left(1 + \frac{K_{CS}}{C_S} \right) \left(1 + \frac{C_S}{K_I} \right)} \quad (6.16)$$

2. Hambatan oleh substrat secara kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_{CS} \left(1 + \frac{C_S}{K_I} \right) + C_S} \quad (6.17)$$

Penghambatan produk. Konsentrasi produk yang tinggi juga dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Penghambatan produk dapat bersifat kompetitif atau nonkompetitif. Model dan ekspresi penghambatan pertumbuhan oleh produk adalah sebagai berikut:

- 1) Hambatan oleh produk secara non-kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{\left(1 + \frac{K_{CS}}{C_S}\right) \left(1 + \frac{C_P}{K_{CP}}\right)} \quad (6.18)$$

- 2) Hambatan oleh produk secara kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_{CS} \left(1 + \frac{C_P}{K_{CP}}\right) + C_S} \quad (6.19)$$

Fermentasi etanol dari glukosa oleh ragi merupakan contoh dari penghambatan oleh produk secara nonkompetitif. Penghambatan oleh etanol terjadi ketika konsentrasi etanol di atas 5%.

Penghambatan oleh senyawa beracun: Model penghambatan oleh senyawa beracun dapat bersifat kompetitif, tidak kompetitif, dan unkompetitif analog dengan penghambatan enzim.

- 1) Hambatan secara kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_{CS} \left(1 + \frac{C_I}{K_{CI}}\right) + C_S} \quad (6.20)$$

- 2) Hambatan oleh produk secara non-kompetitif:

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{\left(1 + \frac{K_{CS}}{C_S}\right) + \left(1 + \frac{C_I}{K_{CI}}\right)} \quad (6.21)$$

- 3) Hambatan oleh produk secara *uncompetitive*:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{\left(\frac{K_{CS}}{\left(1 + \frac{C_I}{K_{CI}}\right)} + C_S\right) + \left(1 + \frac{C_I}{K_{CI}}\right)} \quad (6.22)$$

C. Latihan Soal

1. *Escherichia coli* tumbuh dengan waktu penggandaan 0,5 jam ketika pada fase pertumbuhan eksponensial.
 - a. Berapa nilai laju pertumbuhan spesifik?
 - b. Berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk menumbuhkan kultur sel dari 0,1 menjadi 10 kg sel kering.m⁻³?
2. *E. coli* tumbuh dari 0,10 menjadi 0,50 kg sel kering.m⁻³ dalam waktu 1 jam.
 - a. Dengan asumsi pada periode ini adalah fase pertumbuhan eksponensial, hitung laju pertumbuhan spesifiknya.
 - b. Hitung waktu penggandaan selama fase pertumbuhan eksponensialnya.
 - c. Berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh dari 0,10 menjadi 1,0 kg sel kering.m⁻³?
3. *Pichia pastoris* (ragi) dengan konsentrasi sel 1,0 kg sel kering m⁻³ diinokulasikan ke dalam media yang mengandung 15% gliserol dan dikultivasi secara curah. Konsentrasi sel yang tergantung dari waktu ditunjukkan pada tabel berikut:

Waktu (jam)	C_x^*
0	1,0
1	1,0
2	1,0
3	1,1
5	1,7
10	4,1
15	8,3
20	18,2
25	36,2

30 64,3

40 86,1

50 98,4

*kg sel kering.m⁻³

- a. Gambarkan kurva pertumbuhan sel dengan memplot logaritma konsentrasi sel terhadap waktu kultivasi.
 - b. Tentukan fase percepatan, pertumbuhan eksponensial, dan perlambatan dari kurva pertumbuhan di bagian a.
 - c. Hitung laju pertumbuhan spesifik pada fase pertumbuhan eksponensial.
4. Fermentasi curah sederhana dari bakteri aerobik yang tumbuh pada metanol memberikan hasil yang ditunjukkan dalam table di bawah. Hitung:
- a. Laju pertumbuhan maksimum ($\mu_{\max}$)
 - b. Hasil pada substrat (YX/S)
 - c. Waktu penggandaan massa (t_d)
 - d. Konstanta saturasi (K_s)
 - e. Laju pertumbuhan spesifik (μ) pada $t = 10$ jam

Waktu (jam)	X (g/l)	S (g/l)
0	0.2	9.23
2	0.211	9.21
4	0.305	9.07
8	0.98	8.03
10	1.77	6.8
12	3.2	4.6
14	5.6	0.92

16	6.15	0.077
18	6.2	0

5. Sel ragi tumbuh dari 19 menjadi 54 kg sel kering.m⁻³ dalam 7 jam. Dalam selang waktu ini sebanyak 81 g gliserol dikonsumsi per 1 L kaldu fermentasi. Tentukan laju pertumbuhan spesifik rata-ratanya dan perolehan sel terhadap gliserol.

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Back, J. G., (1996). Microbiology: Principles and Applications, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Shigeo Katoh, Jun-ichi Horiuchi, and Fumitake Yoshida (2015). Biochemical Engineering, Textbook for Engineers, Chemists and Biologists, Second Completely Revised and Enlarged Edition, WILEY-VCH.
- Liu, S. and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier
- Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

PERTEMUAN 7

BIOREAKTOR

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu memahami jenis-jenis bioreaktor, prinsip kerja dan aplikasinya.

B. Uraian Materi

Bioreaktor adalah suatu unit alat yang digunakan untuk melangsungkan proses biokimia dari suatu bahan baku menjadi produk yang diinginkan, dimana prosesnya dilakukan dengan menggunakan sel mikroorganisme, sel tanaman, sel hewan atau dengan menggunakan agen biologi lainnya, seperti enzim, dan lainnya. Pada sub-bab ini bioreaktor yang didiskusikan adalah bioreaktor untuk proses fermentasi cair (*submerged fermentation*). Bioreaktor untuk proses fermentasi disebut juga dengan fermentor. Hal-hal penting yang perlu diketahui terkait dengan bioreaktor:

Fungsi bioreaktor :

1. Memberikan lingkungan yang dapat dikontrol untuk pertumbuhan mikroorganisme dan aktivitas metabolisme yang optimal dalam menghasilkan suatu produk yang diinginkan
2. Mencegah terjadinya kontaminasi selama proses fermentasi dari lingkungan ke kultur serta mencegah keluarnya kultur ke lingkungan.

1. Jenis-Jenis Bioreaktor

Fermentor dengan tipe tangki berpengaduk merupakan reaktor yang paling umum digunakan dalam bioproses. Namun, beragam jenis bioreaktor digunakan dalam industri bioproses. Berbagai konfigurasi bioreaktor baru terus dikembangkan untuk berbagai aplikasi khusus serta menyesuaikan dengan bentuk biokatalis yang baru. Tantangan terbesar dalam desain bioreaktor terletak pada pengadukan dan aerasi untuk memenuhi kebutuhan oksigen selama proses fermentasi aerobik. Sebaliknya, fermentor untuk kultur anaerobik konstruksinya seringkali sangat sederhana, tanpa memerlukan penyumbatan

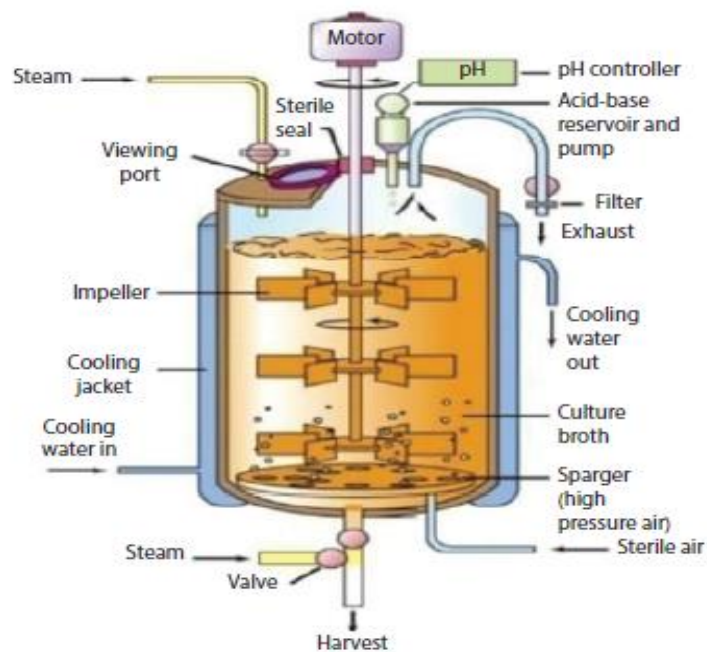
udara (*sparging*) atau agitasi. Dalam pembahasan konfigurasi bioreaktor berikut, berlaku untuk proses operasi fermentasi aerobik. Berdasarkan desainnya, bioreaktor dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis:

- a. Bioreaktor tangki berpengaduk (*stirred tank reactor*)
- b. Bioreaktor kolom bergelembung (*bubble coloumn bioreactor*)
- c. Bioreaktor airlift
- d. Bioreaktor unggun tetap (*packed bed bioreactor*)
- e. Bioreaktor unggun terfluidisasi (*fluidized bed bioreactor*)
- f. Bioreaktor trikale bed
- g. Fotobioreaktor (*photobioreactor*)
- h. Bioreaktor membran

a. Bioreaktor Tangki Berpengaduk

Gambar skematik bioreaktor berpengaduk yang konvensional ditunjukkan Gambar 6.1. Pencampuran dan pendispersian gelembung udara dilakukan dengan cara agitasi secara mekanis, oleh karena itu membutuhkan biaya operasional yang relatif tinggi untuk energi per satuan volumenya. Baffle dalam reaktor diperlukan untuk mengurangi efek pusaran aliran (*vortexing*). Berbagai macam ukuran dan bentuk impeller tersedia untuk menghasilkan pola aliran yang berbeda di dalam fermentor. Pada fermentor yang tinggi, dibutuhkan pemasangan beberapa impeler untuk meningkatkan pencampuran. Jenis bioreaktor ini banyak digunakan untuk produksi antibiotik, enzim, MSG dan lain-lain.

Pada umumnya volume cairan dalam fermentor hanya sekitar 70 hingga 80% volume reaktor. Hal ini untuk memberikan ruang di atas cairan yang cukup untuk terjadinya kondensasi dari cairan yang terbawa dalam gas buang serta untuk mengantisipasi terjadinya busa yang terbentuk selama proses fermentasi. Jika busa yang terbentuk menjadi masalah yang serius maka perlu dilengkapi dengan impeler yang berfungsi sebagai pemecah busa seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.1. Dapat juga dilakukan dengan mengatur posisi impeller paling atas agar masalah busa dapat diatasi secara maksimal. Bahan kimia antibusa sering kali juga digunakan, namun perlu diingat bahwa penggunaan antibusa dapat menurunkan laju transfer oksigen.



Gambar 7.1. Tipe bioreaktor tangki berpengaduk untuk fermentasi aerobik
(Singhal *et al.*, 2018)

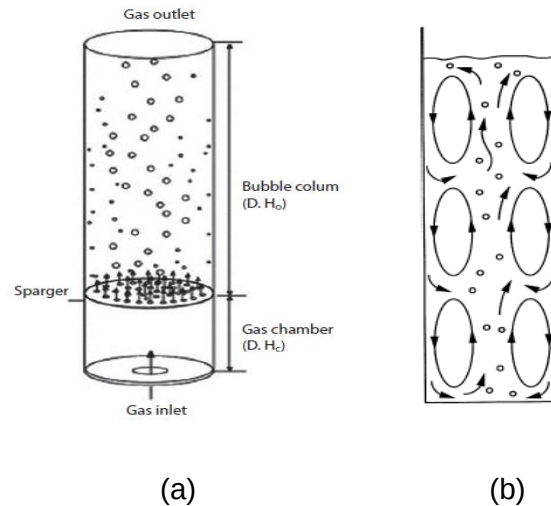
Aspek rasio tangki berpengaduk (yaitu, rasio tinggi terhadap diameter) dapat bervariasi. Bentuk yang paling murah untuk dimanufaktur jika aspek rasio sekitar 1. Bentuk ini memiliki luas permukaan terkecil sehingga membutuhkan sedikit bahan untuk manufakturnya. Namun, jika aerasi merupakan faktor yang penting dalam proses, maka aspek rasio yang digunakan harus lebih besar. Hal ini untuk memberikan waktu kontak antara gelembung dengan cairan yang lebih lama serta menghasilkan tekanan hidrostatik yang lebih besar di dasar bejana untuk meningkatkan kelarutan oksigen.

Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.1, kontrol suhu dan perpindahan panas dalam tangki berpengaduk dapat dilakukan dengan menggunakan koil dengan pendingin internal. Reaktor tangki berpengaduk seringkali digunakan untuk reaksi enzimatis dengan enzim bebas maupun terimobilisasi serta untuk proses fermentasi dengan kultur sel tersuspensi maupun terimobilisasi. Perlu diperhatikan enzim terimobilisasi dapat rusak atau hancur oleh putaran impeler dengan kecepatan tinggi. Gaya gesek yang tinggi juga dapat merusak kultur sel-sel yang sensitif, terutama untuk kultur dari sel tumbuhan dan hewan.

b. Bioreaktor Kolom Bergelembung (*Bubble Column Bioreactor*)

Bioreaktor kolom bergelembung merupakan reaktor tanpa pengadukan mekanis. Aerasi dan pencampuran dalam reaktor dilakukan dengan menyemburkan gelembung ke dalam cairan di dalam reaktor sehingga membutuhkan energi yang lebih kecil dibanding dengan pengadukan mekanis. Reaktor kolom bergelembung banyak digunakan di industri untuk produksi ragi roti, bir, dan cuka, serta untuk pengolahan air limbah.

Desain bioreaktor kolom bergelembung sangat sederhana, seperti ditunjukkan pada Gambar 7.2(a), yang terdiri dari tangki silinder dengan tinggi lebih dari dua kali diameter. Reaktor dilengkapi dengan sparger untuk masuknya udara bertekanan. Rasio tinggi : diameter sekitar 3: 1 banyak digunakan dalam produksi ragi roti, namun untuk aplikasi lain ada juga desain dengan rasio 6: 1. Plat berlubang (seperti *tray*) yang dipasang secara horizontal dapat ditambahkan untuk reaktor yang tinggi, guna memecah dan mendistribusikan kembali gelembung yang menyatu. Keuntungan dari bioreaktor kolom bergelembung adalah biaya investasi rendah, sedikit bagian yang bergerak, serta perpindahan massa dan panas yang baik. Seperti pada tangki berpengaduk, timbulnya busa sering kali menjadi masalah, sehingga diperlukan pendispersi mekanis atau penambahan antibusa ke medium. Hidrodinamika kolom gelembung dan karakteristik perpindahan massa bergantung sepenuhnya pada perilaku gelembung yang keluar dari sparger. Rezim aliran yang berbeda dapat terjadi tergantung pada laju alir gas, desain sparger, diameter kolom, dan sifat-sifat medium seperti viskositas. Aliran homogen hanya terjadi pada laju aliran gas rendah dan jika gelembung yang keluar dari sparger dapat didistribusikan secara merata di seluruh penampang kolom. Dalam aliran homogen, semua gelembung naik dengan kecepatan yang sama ke atas dan hanya sedikit atau tidak ada gas balik. Pencampuran cairan yang baik dalam rezim aliran ini terbatas, hanya terjadi di sekitar keluarnya gelembung. Sebaliknya, pada kondisi operasi normal dimana laju alir gas tinggi, sel akan teraduk secara turbulen sehingga aliran heterogen terjadi seperti yang diilustrasikan pada Gambar 7.2(b). Dalam rezim ini, gelembung dan cairan cenderung naik ke tengah kolom sedangkan cairan yang bergerak ke bawah terjadi di dekat dinding.



Gambar 7.2. (a) Bioreaktor kolom bergelembung (Singhal *et al.*, 2018) dan (b) Aliran heterogen dalam kolom gelembung (Doran, 2016)

Kecepatan linier cairan dalam kolom gelembung tergantung dari rezim aliran. Kecepatan aliran yang berada di tengah kolom dengan diameter kolom dan kecepatan aliran gas berturut-turut adalah $0,1 < D < 7,5$ m dan $0 < U_G < 0,4$ m/s dapat digunakan persamaan berikut:

$$U_L = 0,9 (g D U_G)^{0,33} \quad (7.1)$$

dimana U_L adalah kecepatan linier cairan, g adalah percepatan gravitasi, D adalah diameter kolom, dan U_G adalah kecepatan superficial gas. U_G sama dengan laju volumetrik aliran gas pada tekanan atmosfer dibagi dengan luas penampang reaktor. Dari persamaan ini maka waktu pencampuran t_m (waktu yang dibutuhkan untuk mencapai kondisi homogen) dalam kolom gelembung bisa dihitung:

$$t_m = 11 \frac{H}{D} (g U_G D^{-2})^{-0,33} \quad (7.2)$$

dimana H adalah tinggi kolom gelembung. Nilai koefisien perpindahan massa cairan-gas dalam bioreaktor sangat bergantung pada diameter gelembung dan waktu tinggal gas. Dalam kolom gelembung yang berisi cairan yang tidak kental (viskos), variabel ini hanya bergantung pada laju aliran gas. Namun, karena ukuran gelembung yang tepat dan pola sirkulasi cairan yang tepat tidak mungkin diukur maka estimasi perpindahan massa yang akurat sulit dilakukan. Persamaan berikut dapat digunakan untuk

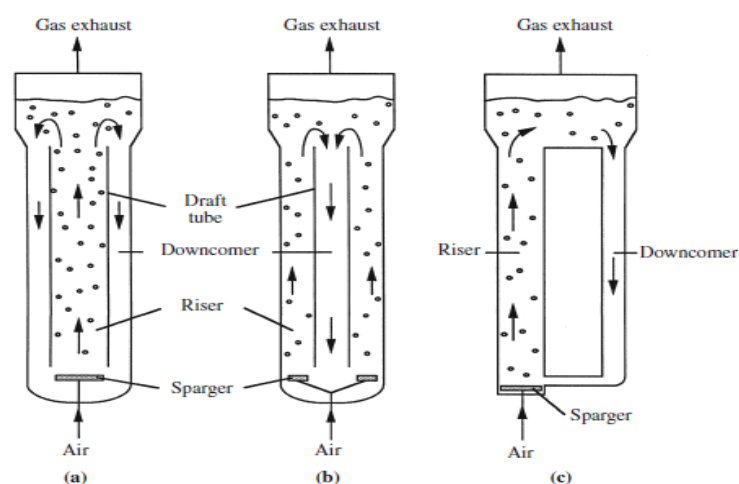
memprediksi perpindahan massa untuk cairan yang tidak kental (non-viskos) dengan pola aliran yang heterogen:

$$k_{La} \approx 0,32 U_G^{0,7} \quad (7.3)$$

dimana k_{La} adalah koefisien perpindahan massa volumetrik gabungan dan U_G adalah kecepatan gas superfisial. Persamaan (7.3) berlaku untuk gelembung dengan diameter rata-rata sekitar 6 mm; $0,08 \text{ m} < D < 11,6 \text{ m}$; $0,3 \text{ m} < H < 21 \text{ m}$; dan $0 < U_G < 0,3 \text{ m/s}$. Jika gelembung yang dihasilkan oleh sparger lebih kecil dan medium tidak menggumpal, maka nilai k_{La} akan lebih besar dari nilai perhitungan.

c. Bioreaktor *Airlift*

Seperti pada bioreaktor kolom bergelembung, pencampuran dalam reaktor airlift dilakukan tanpa menggunakan pengadukan mekanis. Hal yang membedakan dengan reaktor kolom bergelembung terletak pada pola aliran cairan yang lebih spesifik, dengan adanya pembatas fisik antara aliran yang naik dan yang turun seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.3. Gas disebarkan pada bagian tertentu dari tangki, yang disebut dengan *riser*. Adanya gelembung gas dan penurunan densitas cairan menyebabkan cairan di *raiser* bergerak ke atas. Ketika gelembung gas dilepas ke udara dari cairan pada bagian atas tangki, cairan yang bebas gelembung akan mengalir ke bawah melalui *downcomer*. Sirkulasi cairan ini timbul karena perbedaan densitas antara di bagian *riser* dan *downcomer*.



Gambar 7.3. Konfigurasi reaktor airlift: (a) dan (b) reaktor dengan loop internal; (b) loop eksternal (Doran, 2016)

Reaktor *airlift* pada umumnya memberikan efek pencampuran yang lebih baik dari pada reaktor kolom bergelembung, kecuali jika dioperasikan dengan kecepatan cairan yang rendah. Pola aliran cairan juga lebih stabil, penerapan laju aliran gas yang lebih tinggi dapat digunakan tanpa menimbulkan masalah seperti cairan yang mengalir perlahan ataupun percikan cairan. Reaktor *airlift* telah digunakan untuk berbagai aplikasi, seperti: produksi protein sel tunggal dari substrat methanol dan minyak bumi, pengolahan limbah kota dan industri, dan untuk kultivasi sel tumbuhan dan hewan. Reaktor *airlift* juga telah dibangun dengan kapasitas hingga ribuan meter kubik.

Gas hold-up dan laju perpindahan massa cairan gas di loop internal *airlifts* serupa dengan yang ada di kolom gelembung. Namun, pada loop eksternal, hampir seluruh gelembung terlepas di bagian atas tangki sehingga menurunkan gas hold up. Perpindahan massa lebih rendah pada laju alir gas yang sama dengan kolom gelembung. Oleh karena itu, identic dengan Persamaan. (7.3), maka perpindahan massa udara di reactor *airlift* dengan loop eksternal:

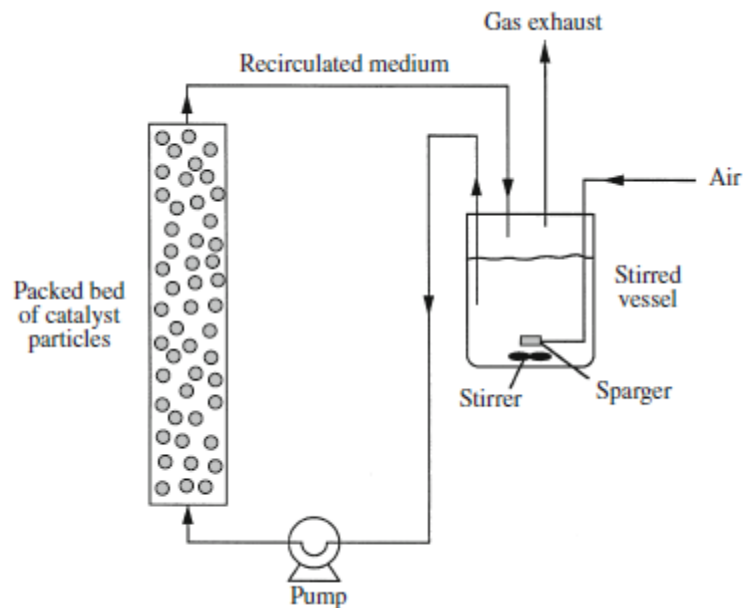
$$k_{La} < 0,32 U_G^{0,7} \quad (7.4)$$

d. Bioreaktor unggun tetap (*packed bed bioreactor*)

Reaktor unggun terdiri dari sebuah kolom yang diisi dengan biokatalis terimobilisasi. Substrat dapat diumpankan baik melalui bagian atas atau bawah kolom. Kerusakan biokatalis akibat gesekan antar partikel dapat diminimalkan dalam reaktor unggun tetap dibandingkan dengan reaktor dengan pengadukan mekanik. Reaktor unggun tetap telah diaplikasikan secara komersial dengan menggunakan sel ataupun enzim terimobilisasi untuk produksi berbagai produk seperti aspartat dan fumarat, konversi penisilin menjadi asam 6-aminopenicillanic acid, dan isomer asam amino.

Perpindahan massa dari substrat cair ke biokatalis padat dan sebaliknya terjadi oleh adanya laju aliran cairan yang melalui unggun. Untuk tujuan tertentu, reaktor unggun tetap sering dioperasikan dengan mensirkulasi substrat cair seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.4. Biokatalis ditahan dengan penyaring sehingga tidak keluar dari kolom. Media yang disirkulasi harus bersih dan bebas dari kotoran yang dapat mengganggu

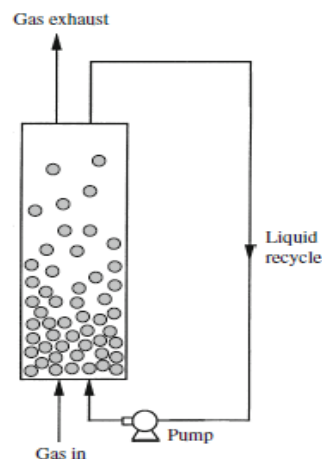
kerja unggul biokatalis. Jika diperlukan aerasi maka pada umumnya dilakukan di tangki yang terpisah. Jika aerasi dilakukan dalam kolom yang berisi unggul tetap maka akan terjadi penyatuan gelembung udara sehingga menghasilkan kantong gas diantara partikel serta distribusi gas/substart yang tidak baik.



Gambar 7.4. Bioreaktor unggul tetap dengan aliran medium yang disirkulasi
(Doran, 2016)

e. Bioreaktor Unggun Terfluidisasi (*Fluidized Bed Bioreactor*)

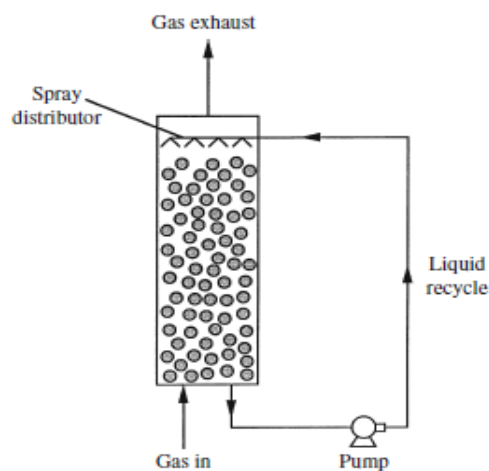
Jika bioreaktor unggul tetap dioperasikan dengan aliran cairan ke atas maka partikel biokatalis terimobilisasi akan mengembang dan terangkat hingga tinggi tertentu mengikuti aliran cairan. Bioreaktor ini dikenal dengan bioreaktor unggul terfluidisasi, seperti ditampilkan pada Gambar 7.5. Karena partikel dalam unggul terfluidisasi bergerak konstan, maka penyumbatan unggul dan *flow channeling* dapat dihindari. Reaktor unggul terfluidisasi banyak digunakan dalam pengolahan limbah yang berisi campuran lumpur atau bahan pendukung lainnya untuk melekatnya populasi mikroba. Bioreaktor ini juga digunakan untuk organisme dalam bentuk terflokulasi untuk pembuatan bir dan produksi cuka.



Gambar 7.5. Reaktor unggun terfluidisasi dengan aliran cairan ke atas yang menyebabkan unggun mengembang dan terfluidisasi. Permasalahan penyumbatan, aliran channeling dapat dicegah (Doran, 2016)

f. Bioreaktor *Trickle Bed*

Bioreaktor trickle bed merupakan variasi dari reaktor unggun tetap seperti yang diilustrasikan dalam Gambar 7.6. Cairan disemprotkan ke bagian atas unggun tetap dan mengalir ke bawah melalui unggun dalam bentuk aliran-aliran kecil. Udara dapat diumpankan dari bagian bawah kolom karena cairan tidak menutupi di seluruh area di dalam kolom. Udara atau gas lainnya yang diumpankan ke kolom dapat bergerak dengan mudah di sekitar unggun. Bioreaktor trickle bed banyak digunakan untuk pengolahan air limbah secara aerobik.



Gambar 7.6. Bioreaktor trickle bed dengan lumpur atau material lainnya di dalam kolom untuk tempat melekatnya mikroba (Doran, 2016)

g. Fotobioreaktor (*Photobioreactor*)

Fotobioreaktor adalah sebuah sistem bioreaktor yang digunakan untuk tempat kultivasi mikroalga secara monokultur. Sistem ini menjamin tersedianya cahaya dan nutrisi yang masuk ke dalam bioreaktor untuk mendorong pertumbuhan mikroalga yang ada di dalam fotobioreaktor. Fotobioreaktor dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu fotobioreaktor sistem tertutup dan fotobioreaktor sistem terbuka. Pada kultivasi mikroalga menggunakan sistem terbuka, dilakukan dengan menggunakan kolam-kolam. Sumber cahaya yang digunakan berasal dari sumber cahaya alami (matahari). Fotobioreaktor sistem tertutup menggunakan bioreaktor yang dirancang khusus untuk menumbuhkan alga. Sumber cahaya yang digunakan pada fotobioreaktor sistem tertutup dapat berasal dari sumber cahaya alami (matahari) ataupun sumber cahaya buatan seperti lampu LED. Fotobioreaktor sistem tertutup memiliki beberapa keunggulan daripada sistem terbuka.



(a)

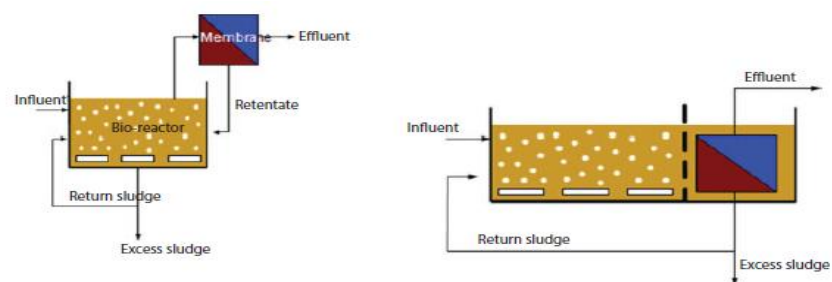


(b)

Gambar 7.7. Fotobioreaktor (a) terbuka dan (b) tertutup untuk produksi mikroalgae

h. Bioreaktor Membran

Bioreaktor membran (*Membrane Bioreactor*; MBR) telah digunakan sejak tahun 90-an. Bioreaktor ini menggabungkan sistem pengolahan konvensional dengan sistem filtrasi melalui membran untuk pemisahan bahan organik dan padatan tersuspensi ataupun nutrisi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.8. Membran dalam sistem MBR terendam dalam reaktor biologis yang diaerasi. Ukuran pori membran berkisar dari 0,035 mikron hingga 0,4 mikron. Setelah pertengahan 90-an, dengan berkembangnya sistem MBR aplikasinya meluas dan berkembang pesat baik dalam penelitian maupun aplikasi secara komersial diantaranya digunakan dalam pengolahan air limbah dari beberapa sumber.



Gambar 7.8. Diagram bioreaktor membran (Singhal *et al.*, 2018)

C. Latihan Soal

1. Sebutkan bagian-bagian penting dari bioreaktor tangki berpengaduk dan jelaskan fungsi bagian tersebut.
2. Berikan contoh aplikasi dari bioreaktor unggun tetap dengan aliran yang disirkulasi serta jelaskan proses untuk menghasilkan produk tersebut.
3. Jelaskan kelebihan dan kekurangan dari bioreaktor airlift. Berikan contoh aplikasinya.
4. Bioreaktor unggun tetap dan terfluidisasi banyak diaplikasikan untuk pengolahan limbah. Bandingkan kelebihan dan kekurangan dari bioreaktor tersebut.
5. Berikan contoh aplikasi industri dari bioreaktor membran dan uraikan kelebihan dan kelemahan aplikasi bioreaktor tersebut.

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) *Biochemical Engineering*, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). *Principles of Fermentation Technology*, 2nd, Pergamon Press
- Richards JW (1968) *Introduction to Industrial Sterilisation*. London: Academic Press.
- Doran, P.M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd edition, Academic Press
- Singhal, G., Verma, V., Bhagyawant, S.S., Srivastava, S., *Fermentation Technology Prospecting on Bioreactors/Fermenters: Design and Types dalam Applications of Fermentation Technology* (2018). Arindam Kuila, A. (editor) and Vinay Sharma (editor), John Wiley & Sons, Inc. and Scrivener Publishing LLC.

PERTEMUAN 8

REKAYASA BIOREAKTOR

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami aspek kinerja bioreaktor.
2. Memahami dasar perancangan bioreaktor.
3. Memahami cara untuk mencapai dan mempertahankan kondisi aseptik

B. Uraian Materi

1. Aspek Kinerja Bioreaktor

Bioreaktor adalah jantung dari proses fermentasi atau proses konversi enzimatis. Merancang bioreaktor merupakan tugas yang rumit, harus menerapkan prinsip-prinsip ilmiah dan teknis yang baik yang dikombinasikan dengan berbagai aturan praktis. Desain reaktor berpengaruh secara signifikan terhadap kinerja proses secara keseluruhan. Pengetahuan tentang kinetika reaksi sangat penting untuk memahami bagaimana reaktor biologis bekerja. Pengetahuan lainnya yang juga penting adalah seperti neraca massa dan energi, pencampuran, perpindahan massa, dan perpindahan panas.

Kinerja bioreaktor yang terkait dengan desain dan operasinya bergantung pada beberapa aspek utama seperti:

- a. Konfigurasi reaktor. Apakah akan dipilih tipe reaktor tangki berpengaduk mekanis atau tanpa pengadukan mekanis (pengadukan dengan udara)?
- b. Ukuran reaktor. Berapa ukuran reaktor yang dibutuhkan untuk mencapai kapasitas produksi yang diinginkan?
- c. Mode operasi. Apakah reaktor dioperasikan secara curah (batch) atau kontinu? Apakah substrat diumpankan sekaligus atau bertahap (fed-batch)? Apakah berupa reaktor tunggal atau reaktor seri?
- d. Kondisi proses di dalam reaktor. Bagaimana kondisi reaksi yang diinginkan? seperti suhu, pH, dan konsentrasi oksigen terlarut. Bagaimana parameter tersebut dapat dipantau dan dikendalikan untuk mengoptimalkan kinerja proses? Bagaimana kontaminasi bisa dihindari?

2. Perancangan Bioreaktor

Industri fermentasi yang modern pada umumnya menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk yang didesain sesuai kebutuhan. Desain bioreaktor merupakan pekerjaan teknik yang relatif kompleks. Desain harus dapat memberikan kondisi yang optimal agar mikroorganisme atau sel dapat menjalankan fungsi yang diinginkan. Kondisi lingkungan bioreaktor seperti laju aliran gas (yaitu: udara/oksigen, nitrogen, karbon dioksida), suhu, pH dan kadar oksigen terlarut, serta kecepatan agitasi / laju sirkulasi perlu dipantau dan dikontrol dengan baik.

Persyaratan-persyaratan penting dalam perancangan bioreaktor adalah:

- a. Desain dan konstruksi reaktor biokimia harus mampu mencegah terjadinya kontaminasi (menjaga sterilitas). Selanjutnya, kondisi aseptik harus dapat dijaga selama proses fermentasi berlangsung.
- b. Pengadukan yang optimal. Pengadukan harus optimal dengan gaya gesek yang rendah sehingga tidak menghancurkan sel organisme.
- c. Aerasi memadai untuk memastikan transfer oksigen terjadi dengan baik.
- d. Konsumsi energi serendah mungkin
- e. Tersedia perangkat untuk kontrol suhu
- f. Tersedia perangkat untuk kontrol pH
- g. Tersedia pipa untuk pengambilan sampel
- h. Kehilangan cairan karena evaporasi tidak boleh terlalu tinggi
- i. Reaktor didesain sehingga operasionalnya hanya memerlukan pekerja yang minimal, serta mudah untuk proses pemanenan, pembersihan dan perawatan
- j. Reaktor dapat digunakan untuk berbagai proses fermentasi, namun demikian kemungkinan terjadinya kontaminasi silang harus diperhatikan
- k. Permukaan reaktor bagian dalam harus halus dan sambungan antar logamnya dilas serta dihindari memakai joint flange jika memungkinkan
- l. Reaktor harus mempunyai geometri yang sama, baik untuk reaktor ukuran kecil dan besar untuk skala pilot maupun skala industri untuk memudahkan proses perbesaran skala (scale up)
- m. Sebaiknya digunakan material dengan harga termurah yang masih memberikan hasil yang terbaik
- n. Dilengkapi dengan unit pendukung seperti tertera dalam Tabel 8.1
- o. Laju aliran dapat diukur dengan baik,

- p. Laju pengumpanan substrat dapat diatur untuk mencegah terjadinya kekurangan atau kelebihan pasokan,
- q. Perpindahan panas perlahan dan merata,
- r. Mengikuti persyaratan desain lainnya seperti: dapat disterilisasi; konstruksi sederhana; pengukuran sederhana, dapat dikontrol, teknik pengaturan; scale up; fleksibilitas; stabilitas jangka panjang; kompatibilitas dengan proses hulu-hilir; pencegahan busa.

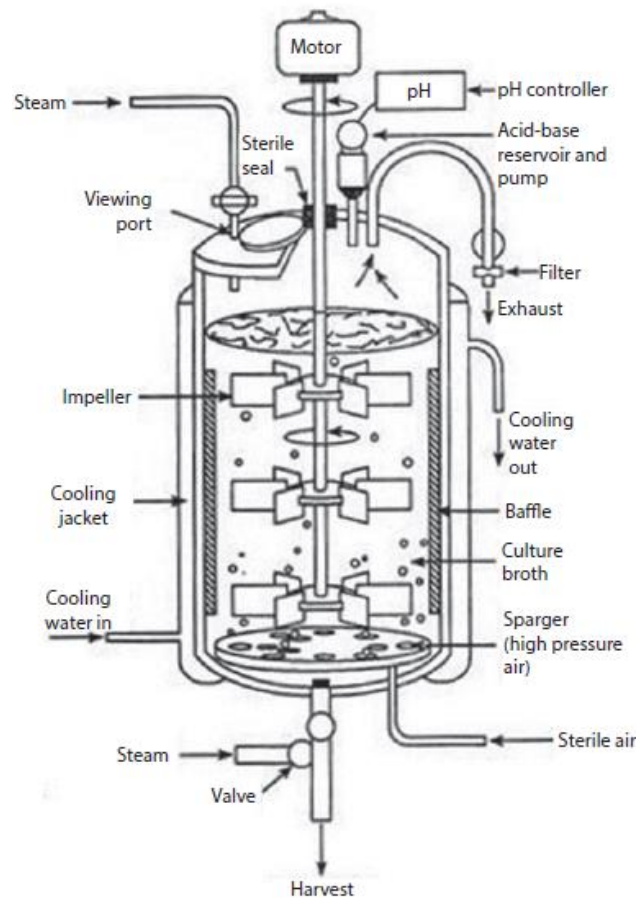
Tabel 8.1. Fasilitas pendukung yang diperlukan untuk operasional pabrik berbasis fermentasi

-
- Udara bertekanan
 - Udara bertekanan steril (pada 1,5 hingga 3 atm)
 - Air pendingin (12 hingga 15°C)
 - Air pendingin (4°C)
 - Air panas
 - Uap air (tekanan tinggi)
 - Kondensat uap air
 - Kelistrikan
 - Generator untuk kondisi darurat
 - Saluran pembuangan
 - Motor
 - Ruang untuk penyimpanan media
 - Peralatan kontrol dan monitoring untuk fermentor
 - Fasilitas perawatan
 - Peralatan ekstraksi dan rekoveri
 - Akses untuk pengiriman material
 - Fasilitas pembuangan limbah yang memadai
-

Bioreaktor yang baik harus memiliki konfigurasi berikut:

- Konfigurasi perpindahan panas dan oksigen
- Prosedur sterilisasi
- Kontrol busa
- Sistem pembersihan yang cepat dan menyeluruh
- Sistem pemantauan dan kontrol yang handal

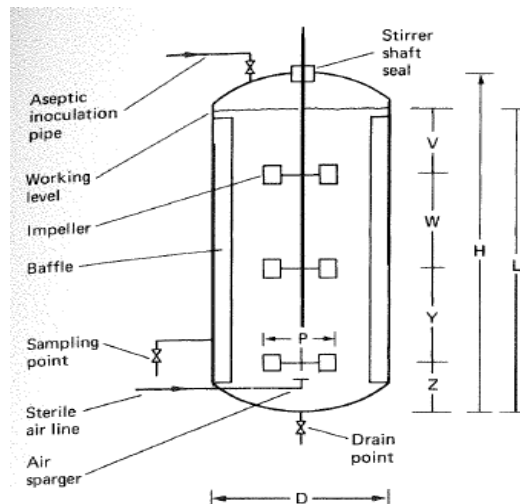
Bioreaktor tangki berpengaduk mempunyai kapasitas mulai 1 liter hingga ribuan liter. Bagian-bagian fermentor ditampilkan pada Gambar 7.1.



Gambar 8.1. Fermentor dengan pengaduk multi-blade dan bagiannya (Singhal *et al.*, 2018)

a. Faktor Geometri

Gambar skematik yang menunjukkan geometri fermentor dengan pengaduk multi-blade yang umum digunakan untuk proses fermentasi diberikan pada Gambar 7.2. Nilai rasio geometri yang merupakan rasio dari diameter terhadap tinggi fermentor dan komponen lainnya diberikan pada Tabel 7.2.



Gambar 8.2. Diagram skematik yang menunjukkan geometri fermentor dengan pengaduk multiple blade

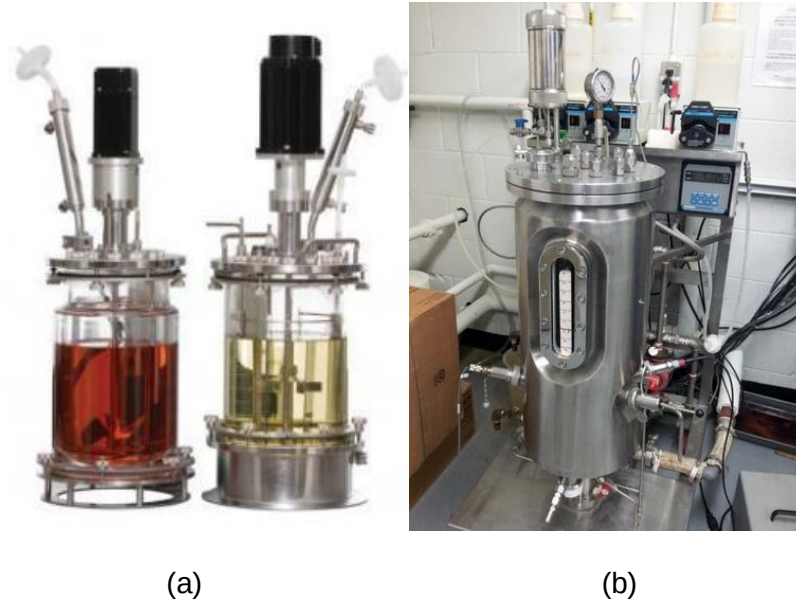
Tabel 8.2. Detail rasio geometri dari fermentor dengan pengaduk *multiblade* (Stanbury & Whitaker, 1995)

Dimension	Jackson (1958)	Aiba <i>et al.</i> (1973)	Paca <i>et al.</i> (1976)
Operating volume	—	100,000 dm ³ (total)	170 dm ³
Liquid height (L)	—	—	150 cm
L/D (tank diameter)	—	—	1.7
Impeller diameter	0.34–0.5	0.4	0.33
Baffle width/D	0.08–0.1	0.095	0.098
Impeller height/D	0.5	0.24	0.37
P/V	0.5–1.0	—	0.74
P/W	0.5–1.0	0.85	0.77
P/Y	0.5–1.0	0.85	0.77
P/Z	—	2.1	0.91
H/D	1.0–1.6	2.2	2.95

b. Material Konstruksi

Material bioreaktor harus terbuat dari bahan yang tidak beracun dan tahan korosi. Secara umum penggunaan material untuk membuat fermentor tergantung dari volume fermentor, yaitu:

- 1) Fermentor kapasitas 1-30 liter biasanya terbuat dari gelas atau stainless steel, permukaannya halus, tidak menimbulkan efek toksik dan tahan karat.
- 2) Fermentor kapasitas > 30 liter biasanya terbuat dari stainless steel atau mild-steel.



Gambar 8.3. Fermentor (a) gelas, (b) stainless steel

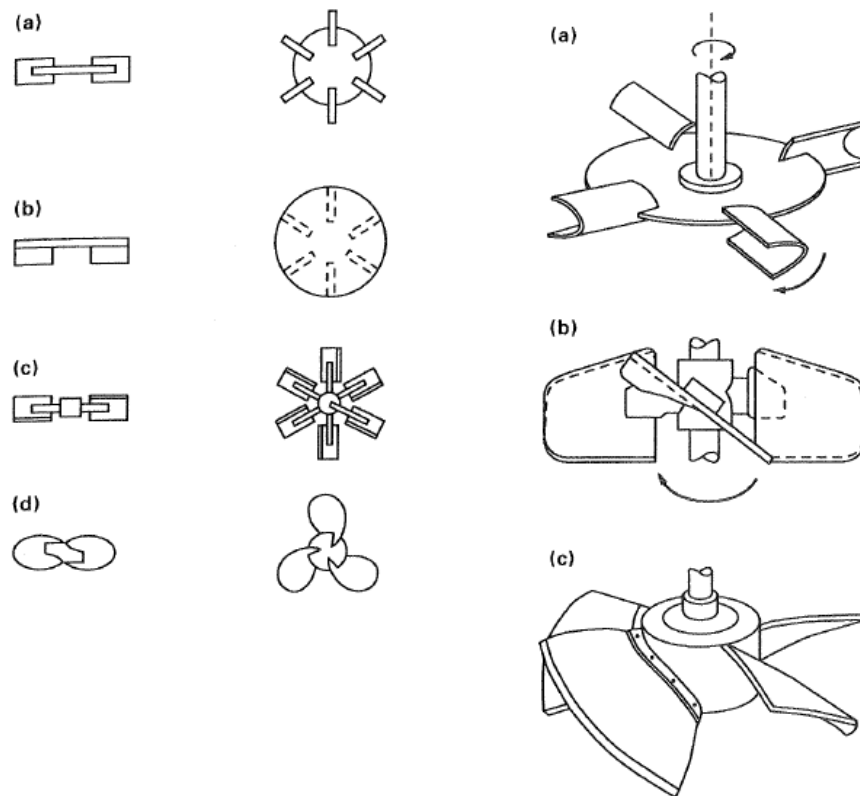
c. Pengaduk (Agitator, Impeller)

Pengaduk diperlukan terkait dengan tujuan dari pengadukan seperti pencampuran padatan dan gas, dispersi gas, transfer oksigen, transfer panas, suspensi partikel padatan, menjaga homogenitas dari cairan di seluruh titik dalam tangki. Desain fermentor harus mempertimbangkan jenis agitator yang sesuai, sparger, baffle, posisi terbaik untuk memasukkan umpan, asam atau basa untuk control pH dan penambahan antibusa. Desain juga perlu untuk menentukan ukuran dan jumlah agitator, kecepatan pengaduk serta power yang dibutuhkan.

Poros pengaduk masuk ke fermentor dapat dengan beberapa cara, yaitu dari bagian atas, samping atau bawah fermentor. Poros pengaduk yang dipasang dari bagian atas fermentor merupakan yang paling umum, namun banyak juga yang dipasang dari bagian bawah fermentor. Pemasangan poros fermentor dari bawah dapat memberikan keuntungan berupa bagian atas fermentor yang akan menjadi lebih luas sehingga memudahkan penempatan posisi berbagai pipa masuk yang diperlukan serta pengaduk menjadi lebih pendek sehingga dapat mempunyai kecepatan putar yang lebih tinggi.

Jenis pengaduk terdiri dari *disc turbine*, *vaned disc*, *open turbine*, *variable pitch*, dan *propeller* seperti ditampilkan pada Gambar 8.4. Pengaduk

jenis disc turbin yang paling banyak digunakan karena dapat memecah gelembung udara dengan cepat.

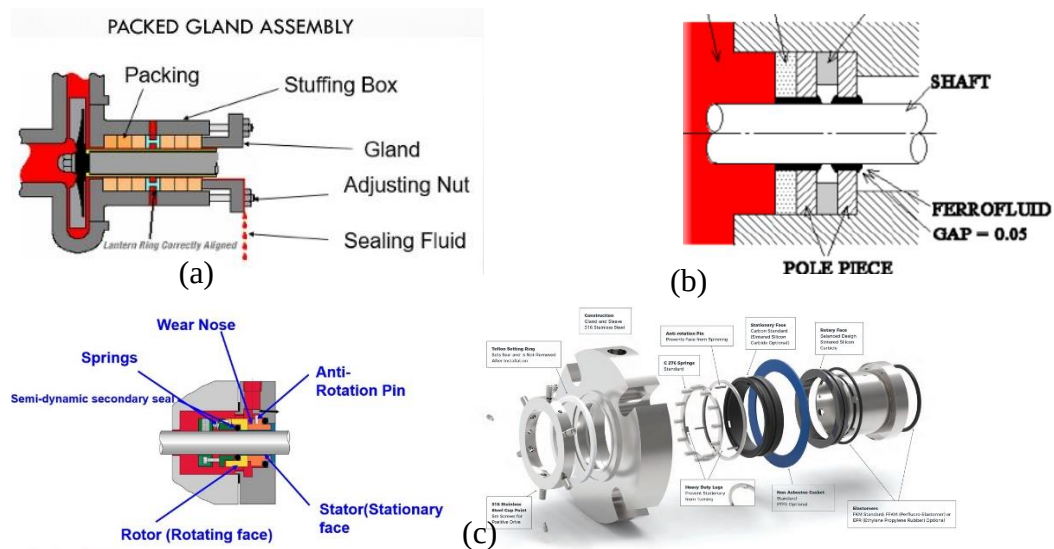


Gambar 8.4. Jenis impeller: (a) disc turbine, (b) vaned disc, (c) opened turbine dan (d) propeller

d. Segel Pengaduk (*Agitator Seal*)

Dalam konstruksi fermentor, segel pengaduk merupakan salah satu bagian yang sulit. Desain segel pengaduk sangat penting untuk memastikan proses dapat beroperasi secara aseptik untuk waktu yang panjang. Terdapat tiga jenis seal yang sering digunakan di fermentor untuk memperoleh *aseptic seal*. **Packed gland seal:** poros pengaduk disegel dengan beberapa *packing ring* asbes yang ditekan oleh *gland* ke arah poros. **Segel mekanis (*mechanical seal*):** jenis segel ini terdiri dari dua bagian, bagian stasioner dalam bantalan dan bagian yang berputar pada poros. Kedua bagian tersebut ditekan dengan bantuan pegas. Selama operasional, kondensat uap air digunakan untuk melumasi dan mendinginkan segel.

Segel penggerak magnetis (*magnetic drives seal*): Penggerak ini melibatkan dua jenis magnet, yaitu magnet penggerak dan magnet yang digerakkan. Magnet penggerak terletak di bagian luar bantalan pelat kepala dan terkait dengan poros penggerak, sedangkan magnet penggerak ditempatkan di ujung poros impeller yang ditahan dengan bantalan permukaan bagian dalam pelat kepala. Perbedaan ketiga segel secara skematik diberikan pada Gambar 8.5. Segel jenis mekanis adalah yang paling banyak digunakan.



Gambar 8.5. Berbagai jenis segel yang digunakan untuk pengaduk pada fermentor (a) *Packed gland seal*, (b) segel magnetik dan (c) segel mekanis

e. Baffle

Pada umumnya fermentor dilengkapi dengan empat buah baffle untuk menghindari terjadinya pusaran arus (*vortex*) dan meningkatkan efisiensi aerasi. Baffle adalah plat logam dengan ukuran kurang lebih 1/10 dari diameter fermentor dan diletakkan dengan posisi berdiri di dekat dinding fermentor (Gambar 8.2). Baffle dengan ukuran yang lebih lebar hanya berpengaruh kecil terhadap pengadukan, namun jika ukurannya lebih kecil maka akan sangat berpengaruh terhadap efektifitas pengadukan.

f. Sistem Aerasi (*Sparger*)

Sparger merupakan peralatan untuk memasukkan udara ke dalam cairan di dalam fermentor. Ada tiga jenis sparger yang sering digunakan, yaitu porous sparger, orifice sparger dan nozzle sparger. Gelembung udara

yang keluar dari sparger naik ke zona impeller, dan akan mengalami gaya geser yang tinggi dengan adanya pengaduk yang berputar sehingga menyebabkan pecahnya gelembung. Gelembung kecil yang dihasilkan akan terdispersi ke seluruh cairan curah yang ada di dalam tangki. **Porous Sparger:** Sparger terbuat dari sintered glass, ceramic atau logam. Sparger ini banyak digunakan untuk fermentor tanpa pengaduk mekanis. Gelembung yang dihasilkan sedikit karena adanya penurunan tekanan di sepanjang sparger dan juga sangat potensial terjadinya penyumbatan lubang pori-pori sparger oleh sel mikroorganisme. **Orifice Sparger.** Sparger ini berupa pipa yang berlubang. Pada fermentor ukuran kecil sparger diposisikan di bawah pengaduk. Lubang sparger berdiameter 6 mm untuk mencegah terjadinya penyumbatan. Pada cairan fermentasi dengan viskositas rendah, udara dapat disebarkan dengan kecepatan 1 vvm ($\text{volume udara} \cdot \text{volume medium}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$) dengan power input 1 W kg^{-1} . Orifice sparger tanpa pengadukan telah digunakan untuk produksi ragi roti, pengolahan limbah dan protein sel tunggal. **Nozzle sparger.** Sebagian besar desain fermentor dengan mekanikal stirrer mulai dari lab hingga skala industri menggunakan jenis nozzle sparger, dengan memasukkan udara melalui hollow agitator shaft yang melepas udara melalui lubang yang ada di cakram. Desain ini menghasilkan aerasi yang baik.

3. Mencapai dan Menjaga Kondisi Aseptis

Desain aerasi dan agitasi sangat penting untuk memastikan fermentor dapat mencapai dan mempertahankan kondisi aseptis yang diinginkan untuk jangka waktu yang lama serta mencegah terjadinya kebocoran. Fermentor harus dapat disterilisasi dan dijaga sterilitasnya selama proses fermentasi berlangsung. Hal lain yang juga perlu diperhatikan adalah desain fermentor juga harus dapat melindungi pekerja dan lingkungan dari terpaparnya mikroorganisme yang berbahaya ataupun dengan sel binatang.

Operasi berikut harus dilakukan mengikuti prosedur tertentu untuk mencapai dan mempertahankan kondisi aseptis serta pencegahan kebocoran selama proses fermentasi berlangsung:

- a. Sterilisasi fermentor
- b. Sterilisasi pasokan udara dan gas yang keluar

- c. Aerasi dan agitasi
- d. Penambahan inoculum, nutrient, dan suplemen lainnya
- e. Pengambilan sampel
- f. Kontrol busa
- g. Monitoring dan pengontrolan berbagai parameter

Penjelasannya adalah sebagai berikut:

a. Sterilisasi Fermentor

Fermentor harus didesain untuk dapat disterilisasi menggunakan uap air bertekanan. Medium dapat disterilisasi langsung di dalam fermentor atau sterilisasi secara terpisah yang selanjutnya dimasukkan secara aseptis. Jika medium disterilisasi secara in situ (secara langsung di fermentor), suhu medium harus dinaikkan terlebih dahulu menggunakan koil atau jaket pemanas sebelum dikontakkan secara langsung dengan uap air untuk mencegah penambahan volume media oleh kondensat yang terlalu besar. Setiap titik pemasukan atau pengeluaran dari fermentor merupakan sumber potensial terjadinya kontaminasi, oleh karena itu uap air harus dapat diaplikasikan pada titik-titik tersebut kecuali pada udara keluar.

Seluruh perpipaan harus didesain sesederhana mungkin, mempunyai sudut kemiringan ke arah titik pembuangan untuk memastikan seluruh perpipaan dapat dijangkau oleh uap air tanpa terhalang oleh kondensat yang menggenang. Seluruh titik pembuangan dilengkapi dengan *steam trap*. Harus dipastikan tidak ada celah pada sambungan, seperti flange seal, yang dapat terisi oleh media ataupun mikroorganisme kontaminan. Permukaan dinding fermentor harus sangat halus dan bebas cekungan dengan ke dalam yang lebih besar dari 0,05 mm. Untuk tujuan menjaga kondisi aseptis maka semua sambungan jika memungkinkan dilas, meskipun untuk perawatan dan perbaikan harus dilakukan pemotongan dan pengelasan kembali.

b. Sterilisasi Udara Masuk

Udara steril diperlukan untuk memasok kebutuhan oksigen pada fermentasi aerobik. Sterilisasi udara banyak dilakukan dengan cara pemanasan dan filtrasi. Sterilisasi udara dengan pemanasan memerlukan biaya operasional yang mahal, oleh karena itu pada umumnya sterilisasi udara dilakukan menggunakan filter.

c. Sterilisasi Gas Keluar Fermentor

Sterilisasi gas keluar fermentor dapat dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 μm yang dipasang pada pipa keluar. Pada kondisi normal, pembentukan aerosol akan terjadi di dalam fermentor sehingga kandungan uap air yang membawa partikel dapat menyumbat filter. Guna mencegah hal tersebut maka bagian atas fermentor dilengkapi dengan siklon untuk pemisahan padatan dan gas yang dipasang secara serial di pipa gas keluar.

d. Pengumpanan Inokulum, Nutrien dan Suplemen lainnya

Untuk mencegah kontaminasi maka fermentor harus dioperasikan dengan tekanan positif dan dilengkapi dengan pasokan uap air. Pencegahan kebocoran juga harus dilakukan sedemikian rupa sehingga keluarnya mikroorganisme ke lingkungan dapat dihindari. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan membran yang dilengkapi dengan saluran uap air.

e. Instrumentasi dan Alat Kontrol

Keberhasilan proses fermentasi sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan yang sesuai untuk terjadinya pertumbuhan biomassa dan pembentukan produk. Untuk mencapai kondisi ini maka perlu untuk mengetahui bagaimana proses fermentasi berlangsung dan bagaimana mengontrol proses agar kondisi lingkungan yang sesuai dapat tercapai. Guna mencapai kondisi tersebut maka diperlukan untuk memonitor dan menganalisis proses fermentasi sehingga setiap penyimpangan dari kondisi optimum dapat dikoreksi oleh system secara terkontrol. Terdapat tiga kategori sensor yang perlu ada pada fermentor:

- 1) Sensor yang dimasukkan hingga ke bagian dalam fermentor, contoh elektroda pH dan oksigen terlarut,
- 2) Sensor yang dioperasikan terhadap sampel yang diambil secara periodic dari fermentor, contoh exhaust gas analyzer
- 3) Sensor yang tidak berkontak dengan kaldu ataupun gas hasil fermentasi, contoh tachometer, alat penghitung jumlah sel

Sensor dikelompokkan berkaitan dengan penggunaannya:

- 1) *In-line sensor*: sensor yang dipasang secara terintegrasi dengan fermentor dan nilai yang diperoleh langsung dapat digunakan untuk mengontrol proses.
- 2) *On-line sensor*: meskipun sensor dipasang secara terintegrasi dengan fermentor namun nilai yang diperoleh tidak bisa secara langsung digunakan untuk mengontrol proses. Operator harus memasukkan nilai yang diperoleh jika ingin digunakan untuk mengontrol proses.
- 3) *Off-line sensor*: Sensor bukan merupakan bagian dari fermentor. Nilai yang diperoleh tidak bisa langsung digunakan untuk mengontrol proses. Operator harus memasukkan nilai ke dalam system control agar dapat mengontrol proses. Contoh: analisa medium, analisa berat kering sel.

C. Latihan Soal

1. Faktor-faktor apa saja yang harus dipertimbangkan terkait dengan penggunaan bioreaktor berpengaduk mekanis atau berpengaduk non mekanis untuk menghasilkan suatu produk?
2. Sebutkan kelebihan dan kekurangan bioreaktor yang dioperasikan secara curah, umpan-curah (fed-batch) dan kontinyu?
3. Alat kelengkapan fermentor apa saja yang dapat digunakan untuk mengatur kelarutan oksigen dalam medium fermentasi?
4. Apa perbedaan antara kondisi steril dan aseptis?
5. Apa tujuan udara keluar dari fermentor harus dibuat steril?

D. Daftar Pustaka

- Bader FG (1986) Sterilization: Prevention of contamination. In: Demain A and Solomon NA (eds.) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 345–361. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). *Principles of Fermentation Technology*, 2nd, Pergamon Press
- Richards JW (1968) *Introduction to Industrial Sterilisation*. London: Academic Press.

Doran, P.M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd edition, Academic Press

Singhal, G., Verma, V., Bhagyawant, S.S., Srivastava, S., *Fermentation Technology Prospecting on Bioreactors/Fermenters: Design and Types dalam Applications of Fermentation Technology* (2018). Arindam Kuila, A. (editor) and Vinay Sharma (editor), John Wiley & Sons, Inc. and Scrivener Publishing LLC.

PERTEMUAN 9

PROSES HILIR: KLARIFIKASI DAN REKOVERI SEL

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami tahapan proses hilir
2. Memahami teknik-teknik klarifikasi kaldu (*broth*) fermentasi dan *recovery* sel

B. Uraian Materi

1. Tahapan Proses Hilir dalam Bioproses

Proses produksi melalui bioproses pada umumnya dibagi menjadi dua tahap, yaitu proses hulu (*upstream process*) dan proses hilir (*downstream process*). Proses hulu berkaitan dengan sintesis produk secara biologis dan proses hilir berkaitan dengan proses pemisahan dan pemurnian produk. Proses hilir atau proses rekovert dari industry bioproses merupakan tahap penting untuk memperoleh produk akhir yang stabil dan murni. Proses rekovert bisa mudah ataupun sulit dan mahal tergantung dari proses yang harus dilakukan. Proses rekovert pada umumnya dapat berkontribusi 15-70% dari total biaya manufaktur. Sebagai contoh biaya untuk proses rekovert pada industri alkohol mencapai 15% dari total biaya produk, rekovert industry antibiotik penisilin G 20-30% dan industry enzim hingga 70%.

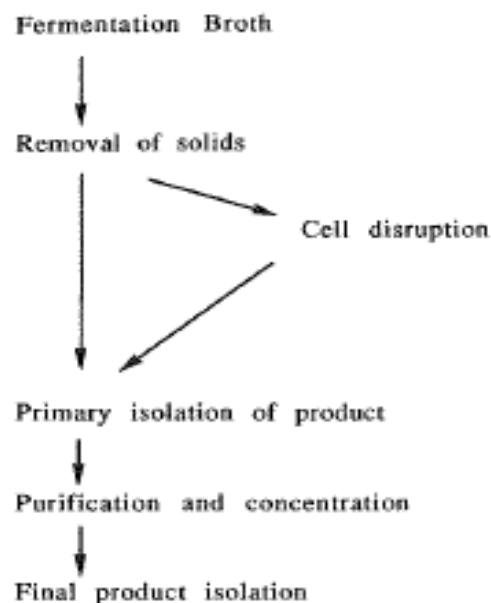
Kaldu fermentasi (*fermentation broth*) merupakan cairan kompleks yang terdiri dari sel utuh maupun pecahan sel, metabolit intraseluler dan ekstraseluler serta sisa substrat yang tidak bereaksi. Produk dalam kaldu fermentasi pada umumnya mempunyai konsentrasi yang kecil, dapat berada dalam sel (intraseluler) atau diluar sel (ekstraseluler), tidak tahan panas dan pH, dan mudah dirusak oleh mikroba pengkontaminasi. Hal-hal tersebut yang mempersulit proses rekovert produk. Untuk memperoleh hasil yang baik, maka faktor kecepatan dalam melakukan proses rekovert juga sangat penting. Oleh karena itu faktor pemilihan jenis dan ukuran peralatan sangat penting sehingga proses rekovert dapat dilakukan secara cepat. Kriteria-kriteria dalam pemilihan proses rekovert adalah sebagai berikut:

- a. Lokasi produk, berada di dalam sel (intraseluler) atau di luar sel (ekstraseluler)
- b. Konsentrasi produk dalam kaldu fermentasi
- c. Sifat-sifat fisika dan kimia dari produk yang diinginkan
- d. Kegunaan dari produk
- e. Tingkat kemurnian produk yang diinginkan
- f. Tingkat berbahaya dari produk atau kaldu fermentasi
- g. Pengotor yang ada dalam kaldu fermentasi
- h. Harga dari produk

Tahap pertama dari proses rekoveri adalah proses klarifikasi atau penjernihan dengan tujuan untuk memisahkan partikel (sel ataupun pecahan sel) dari cairan fermentasi. Jika produk berada di luar sel maka terlebih dahulu dilakukan pemisahan sel dan partikel-partikel yang berukuran besar lainnya. Jika produk berada di dalam sel maka perlu dilakukan proses pemecahan sel (sel lisis) yang dapat dilakukan secara mekanis, panas maupun enzimatis terlebih dahulu. Operasi yang terlibat terdiri dari filtrasi, sentrifugasi dan sedimentasi. **Tahap kedua** adalah proses isolasi dimana cairan fermentasi diisolasi atau difraksinasi melalui operasi yang dapat terdiri dari ekstraksi cair-cair, ekstraksi dua fasa, adsorpsi, ultrafiltrasi, reverse osmosis atau pengendapan. **Tahap ketiga** adalah proses pemurnian fraksi yang mengandung produk dengan cara pengendapan fraksional atau kromatografi. **Tahap keempat** adalah proses polishing dan formulasi produk yang meliputi proses kristalisasi, pengeringan, granulasi, ekstrusi, sterilisasi dan lain-lain. Tahapan proses rekoveri produk dari kaldu fermentasi secara umum ditampilkan pada Gambar 9.1. Upaya-upaya untuk mempermudah proses rekoveri produk dapat dilakukan dengan cara:

- a. Menggunakan mikroba yang tidak menghasilkan pigmen atau produk metabolit yang tidak diinginkan
- b. Modifikasi kondisi fermentasi untuk menurunkan produksi metabolit yang tidak diinginkan
- c. Menentukan waktu pemanenan yang tepat
- d. Kontrol pH setelah pemanenan
- e. Perlakuan suhu setelah pemanenan
- f. Penambahan bahan flokulan
- g. Menggunakan enzim untuk merusak dinding sel

Perlu diingat bahwa proses fermentasi dan rekoveri merupakan satu kesatuan proses dalam menghasilkan produk yang diinginkan. Jika kedua proses tersebut dipandang secara terpisah maka dapat terjadi salah satu proses akan mengalami kesulitan sehingga biaya produksi akan menjadi tinggi. Pada umumnya pemisahan sel dan material tidak larut lainnya dari cairannya atau pemisahan antara padatan dan cairannya dilakukan dengan cara filtrasi atau sentrifugasi.



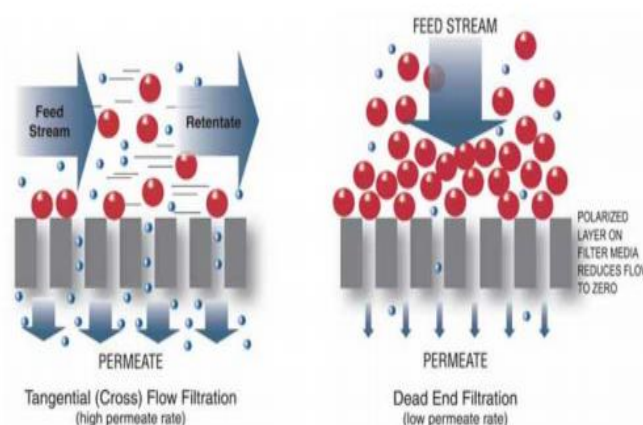
Gambar 9.1. Tahapan proses rekoveri produk dari kaldu fermentasi

2. Klarifikasi Kaldu Fermentasi & *Recovery* Sel

Klarifikasi kaldu fermentasi merupakan tahap awal yang sangat penting dan selalu ada dalam urutan proses rekoveri produk bioteknologi berbasis fermentasi modern. Biasanya proses melibatkan pemisahan padat-cair untuk memisahkan sel dan/atau pecahan sel dari cairan fermentasi. Karena klarifikasi merupakan tahap awal dalam proses rekoveri produk bioteknologi maka kualitas dan perolehan produk dari proses klarifikasi akan sangat menentukan proses-proses pada tahap selanjutnya termasuk tingkat perolehan produk akhir. Keragaman jenis sel yang digunakan dalam proses fermentasi mengharuskan perancangan proses yang beragam pula untuk proses rekoverinya. Pada tahap klarifikasi proses yang terlibat dapat terdiri dari: filtrasi, filtrasi membran dan sentrifugasi.

a. Filtrasi

Filtrasi adalah proses pemisahan campuran padat-cair dimana umpan (suspensi) dilewatkan melalui media berpori yang disebut filter. Padatan akan tertahan di atas filter sedangkan cairan dapat melewatinya. Padatan yang tertahan disebut "residu" atau "cake/endapan" sedangkan cairan yang jernih disebut "efluen" atau "filtrat". Filtrasi secara umum dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori (lihat Gambar 10.1), yaitu: 1) Jika umpan mengandung padatan dengan konsentrasi yang tinggi (*slurry*) maka disebut dengan *cake filtration*, 2) Penjernihan (klarifikasi) jika konsentrasi padatan tidak lebih dari 1% berat. Pada proses penjernihan filtrat adalah produk utama, dan 3) filtrasi aliran silang di mana cairan mengalir sejajar dengan media filtrasi, yang dikenal filtrasi membran. Jika dilihat berdasarkan arah aliran terhadap media filtrasi maka filtrasi dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu *dead-end filtration*, dan *tangential flow filtration* seperti diilustrasikan pada Gambar 9.2.



Gambar 9.2. *Dead-end dan tangential flow filtration*

Pemilihan peralatan jenis filtrasi perlu disesuaikan dengan kebutuhan yang diinginkan sehingga dapat beroperasi secara optimal. Faktor-faktor penting yang berpengaruh dalam pemilihan jenis filtrasi antara lain adalah:

- 1) Karakteristik filtrat khususnya viskositas dan densitas
- 2) Karakteristik partikel khususnya ukuran dan bentuknya, distribusi ukuran serta karakteristik bentuk pemadatannya
- 3) Perbandingan padatan : cairan

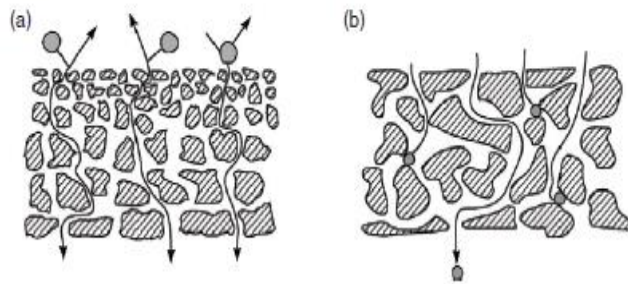
- 4) Karakteristik padatan atau cairan yang diinginkan untuk proses selanjutnya
- 5) Skala operasi
- 6) Proses yang diinginkan curah atau kontinyu
- 7) Perlu tidaknya proses dilakukan secara aseptis
- 8) Proses memerlukan kondisi vakum atau bertekanan untuk memperoleh laju alir yang diinginkan

Teori filtrasi

Filtrasi dengan arah aliran tegak lurus terhadap media filtrasi (*dead-end filtration*) dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan mekanisme bagaimana padatan ditahan oleh filter seperti ditunjukkan oleh Gambar 9.3, yaitu: filter saringan (*screen filter*) dan filter kedalaman (*depth filter*).

Filter saringan (*screen filter*) atau *mesh filter* disebut juga dengan *surface filtration*, atau *absolute filtration*. Filter ini mempunyai ukuran pori yang tertentu sehingga hanya partikel dengan diameter lebih kecil ukuran pori filter yang akan dapat melewati filter. Partikel dengan ukuran yang lebih besar akan ditahan langsung di permukaan saringan.

Filter kedalaman (*depth filter*) disebut juga dengan *cake filtration*. Filter ini tidak memiliki ukuran atau struktur pori yang spesifik, oleh karena itu partikel dengan rentang ukuran yang lebar dapat melewati filter. Partikel dengan ukuran yang lebih besar dari pori filter akan terperangkap di permukaan filter, sedangkan partikel dengan ukuran yang lebih kecil akan mengalami terperangkap dan teradsorpsi secara acak di dalam struktur media filter. Filter kedalaman dapat juga bekerja berdasarkan muatan listrik yang membantu penjebakan partikel yang lebih kecil. Filter kedalaman memiliki konstruksi yang lebih tebal dan porositas yang lebih tinggi. Hal ini memiliki beberapa keuntungan, seperti laju aliran dan kapasitas pemuatan partikel lebih tinggi jika dibandingkan dengan saringan dan filter membrane serta harga yang lebih murah.

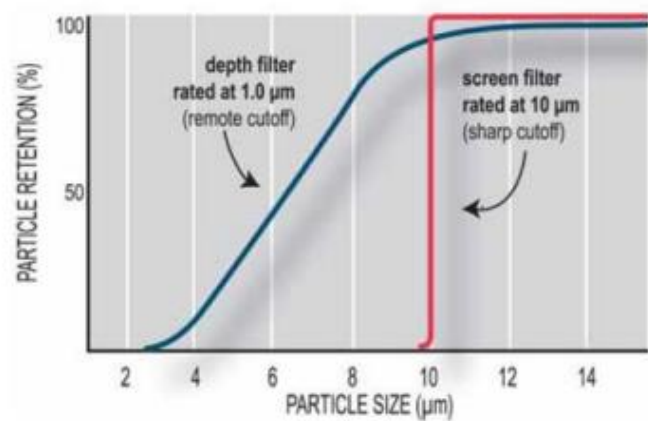


Gambar 9.3. (a) filter saringan dimana filter bersifat absolut sehingga partikel dengan ukuran lebih besar dari pori filter akan tertahan dipermukaan, (b) filter kedalaman dimana partikel akan terjebak ketika melewati ketebalan filter.

Media filter

Fungsi utama media filter sebagai penghalang impermeabel dari partikel. Pada proses klarifikasi media filtrasi pada awalnya bertindak sebagai satu-satunya penghalang partikel, namun setelah endapan terbentuk maka endapan akan menjadi penghalang utama partikel yang lolos melewati media filter dan selanjutnya fungsi utama media filter hanya sebagai penyangga endapan. Media filter harus mempunyai kekuatan mekanik yang baik, tahan terhadap sifat korosif cairan dan mempunyai resistansi yang rendah terhadap aliran filtrat. Media filter yang biasa digunakan adalah:

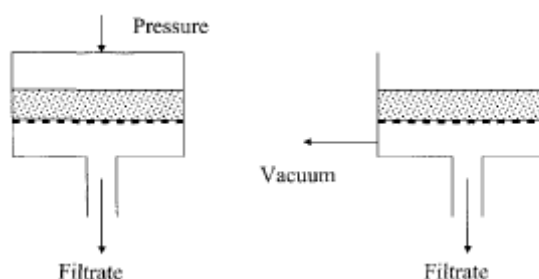
- 1) Kertas saring
- 2) Bahan tenun (misalnya saringan keju, serat polimer, serat gelas)
- 3) Bahan serat bukan tenun
- 4) Gelas berpori yang disinter
- 5) Logam berpori yang disinter
- 6) Keramik
- 7) Membran sintetis



Gambar 9.4. Perbandingan karakteristik filter saringan dan kedalaman

Faktor Penggerak

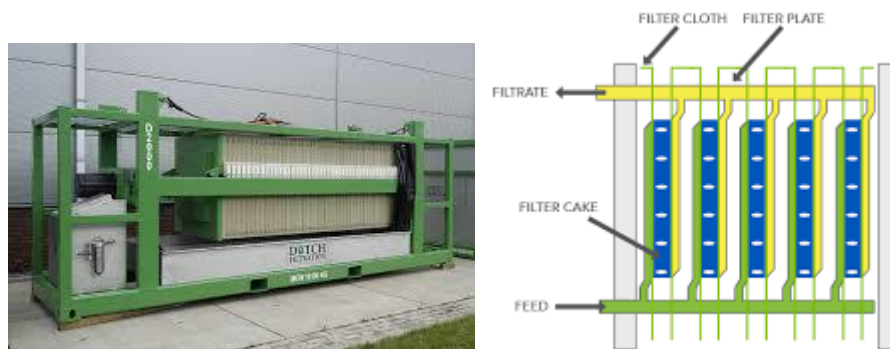
Filtrasi digerakkan oleh adanya penurunan tekanan pada media filter. Faktor penggerak dapat ditimbulkan dengan memberi tekanan pada sisi umpan (filtrasi tekanan positif) atau dengan menciptakan ruang hampa di sisi filtrat (filtrasi tekanan negatif atau filtrasi vakum). Kedua jenis filtrasi ini ditunjukkan pada Gambar 9.5. Di industri, filter bertekanan dan vakum sering digunakan. Filtrasi bertekanan dilakukan dengan memberi tekanan pada sisi umpan menggunakan udara terkompresi atau dengan tekanan hidrostatik ataupun dengan pompa. Filtrasi vakum sering digunakan di laboratorium dengan menggunakan pompa vakum ataupun *water jet injector*. Filtrasi vakum lebih banyak dipakai karena faktor keamanan, namun pada filtrasi vakum biasanya penurunan tekanan maksimum dibatasi hanya sampai 1 atmosfer. Selain itu bahan yang membentuk busa juga tidak dapat disaring dengan filtrasi vakum.



Gambar 9.5. Filtrasi bertekanan dan vakum

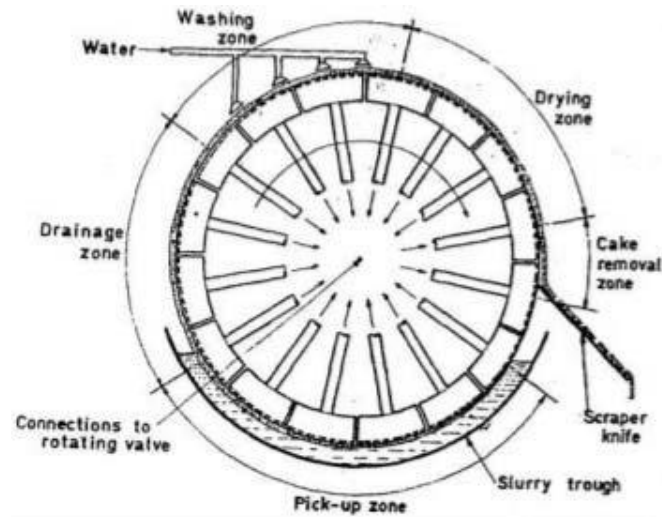
Peralatan filtrasi

Filter press. Filter press terdiri dari serangkaian elemen filter vertikal yang diatur secara horizontal, masing-masing terdiri dari bingkai di mana endapan diakumulasikan di antara media filter di kedua sisi. Setiap media filter pada pelat memiliki alur untuk memudahkan pengumpulan filtrat. Struktur luar bingkai filter ditekan sehingga tidak terjadi kebocoran dirangkaian elemen filter. Gambar 10.7 menunjukkan gambar skematis aliran filter press.



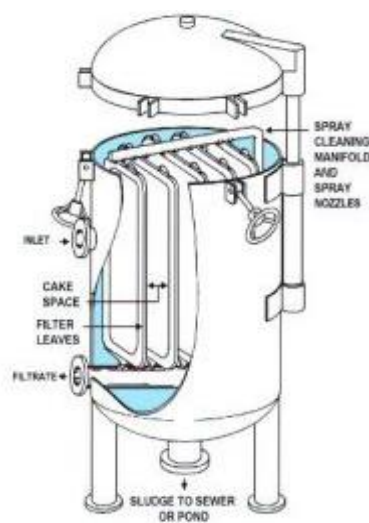
Gambar 9.8. Filterpress dan mekanisme kerjanya

Filter vakum drum putar. Filter vakum drum putar merupakan peralatan filtrasi kontinu dimana padatan dipisahkan dengan kain saring berpori atau media filtrasi serupa filter yang dililitkan pada struktur seperti drum dengan permukaan berlubang. Sebagian permukaan drum yang berputar terendam dalam cairan umpan. Filtrat mengalir melalui media saring ke bagian dalam drum dan endapan menumpuk di atas filter bagian luar. Prinsip kerja filter drum putar ditunjukkan pada Gambar 9.9. Keuntungan proses ini dapat dilakukan secara kontinyu dan memperoleh endapan yang kering. Kekurangan mempunyai factor pengendali yang rendah (faktor pengendali vakum) dan desain rumit karena banyak bagian yang bergerak.



Gambar 9.9. Prinsip kerja filter vakum drum putar

Filter daun bertekanan. Filter daun bertekanan terdiri dari sejumlah unit filter persegi panjang (juga disebut daun) yang dirangkai menjadi satu secara paralel dalam suatu manifold tabung. Setiap filter daun dibuat menggunakan bingkai logam ringan dengan jaring kawat. Daun filter selanjut dilapisi dengan kain saring. Unit filter daun ditempatkan di dalam sebuah bejana bertekanan dimana umpan dipompakan dengan tekanan tinggi. Dengan adanya tekanan, filtrat terdorong melalui filter dan endapan terakumulasi di dalam bejana bertekanan. Keuntungan alat ini desainnya sederhana dan penggunaan yang fleksibel. Kekurangannya adalah memerlukan tenaga kerja yang banyak.



Gambar 9.10. Filter daun

b. Filtrasi Membran

Membran adalah penghalang semi permeabel tipis yang dapat digunakan untuk jenis pemisahan berikut:

- 1) Pemisahan partikel-cairan
- 2) Pemisahan partikel-zat terlarut
- 3) Pemisahan pelarut-pelarut
- 4) Pemisahan zat terlarut-zat terlarut

Membran dapat diaplikasikan untuk: pemekatan produk, sterilisasi produk, fraksinasi zat terlarut, penghilangan zat terlarut dari larutan (misalnya desalinasi, demineralisasi), pemurnian dan penjernihan. Beberapa faktor penggerak yang digunakan dalam pemisahan berbasis membran, adalah:

- 1) Ukuran zat terlarut
- 2) Muatan listrik statis
- 3) Difusivitas
- 4) Bentuk zat terlarut

Perpindahan massa melalui membran dapat disebabkan oleh faktor konveksi atau difusi atau kombinasi keduanya. Perpindahan berbasis konveksi terjadi karena adanya tekanan dipermukaan membran, sedangkan perpindahan difusi terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi sehingga massa dapat melintasi membran. Bahan membran dapat dibuat dari polimer organik atau anorganik seperti kaca, logam dan keramik, atau bahkan cairan. Contoh dari membran polimerik (atau organik) termasuk yang terbuat dari selulosa, selulosa asetat (CA), polisulfon (PS), polietersulfon (PES), poliamida (PA), polivinilidena fluorida (PVDF), poliakrilonitril (PANCI). Membran anorganik dapat dibuat dari keramik, kaca, karbon pirolisis dan baja tahan karat.

Klasifikasi proses membran

Proses bioseparasi berbasis membran bertekanan dapat diklasifikasikan menjadi empat jenis berdasarkan ukuran porinya, yaitu: mikrofiltrasi, nanofiltrasi dan osmosa balik seperti ditampilkan pada Tabel 9.1. Untuk proses klarifikasi kaldu fermentasi dapat digunakan proses pemisahan membran menggunakan mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi.

Tabel 9.1. Klasifikasi membran berdasarkan ukuran pori

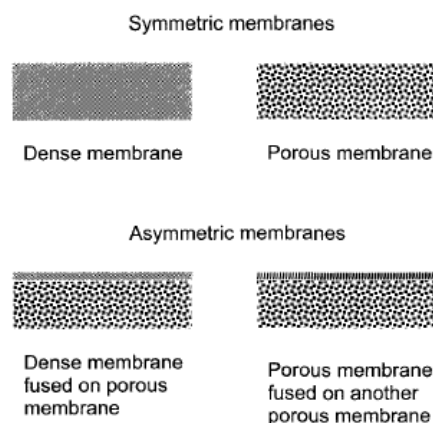
Jenis	Ukuran pori (MWCO)	Tertahan	Aplikasi
Mikrofiltrasi	100 nm-10 μ m	Sel, pecahan sel	Penjernihan, sterilisasi
Ultrafiltrasi	10-100 nm (5-500 kDa)	Partikel halus, virus, dan protein besar	Penjernihan, penghilangan virus, fraksinasi protein berdasar ukuran, pemekatan dan diafiltrasi
Nanofiltrasi	1-10 nm (1-5 kDa)	Asam nukleat, virus dan protein	Purifikasi protein, dan penghilangan virus
Reverse osmosis	0,1-1 nm (<1 kDa)	Garam dan gula	Pemurnian air

MWCO: molecular weight cut off

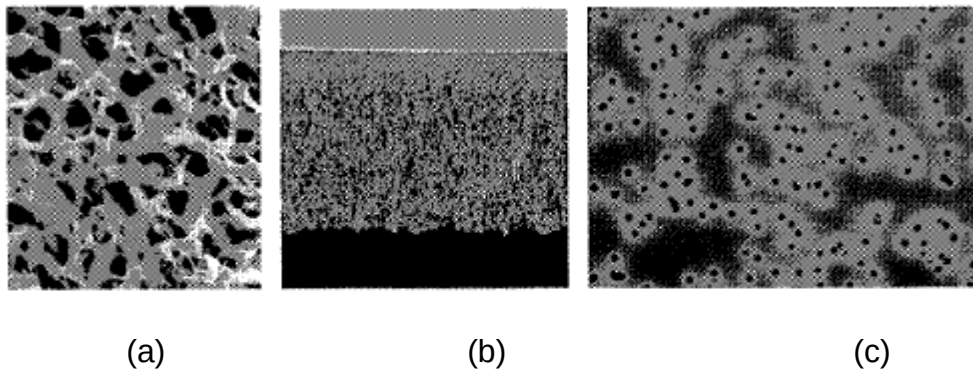
Struktur membran

Berdasarkan strukturnya, membran maka dibagi menjadi dua jenis yaitu:

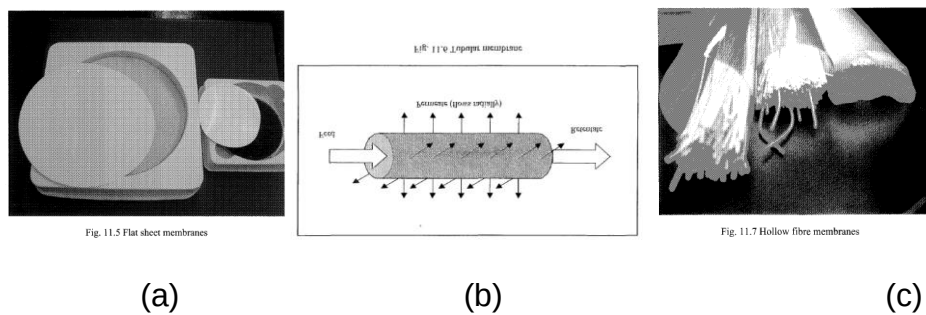
- 1) Simetris (atau isotropik)
- 2) Asimetris (atau anisotropik)



Gambar 9.11. Struktur pori membran simetrik dan asimetrik



Gambar 9.12. Membran berpori: (a) membran berpori simetrik, (b) membran berpori asimetrik, (c) membran isopori



Gambar 9.13. Bentuk membran: (a) lembaran datar, (b) *spiral wound*, (c) *hollow fiber*

Gambar 9.11 menunjukkan struktur pori membran. Membran simetris memiliki struktur komposisi dan morfologi yang seragam di semua titik di dalamnya, sedangkan membran asimetris mempunyai dua atau lebih bidang struktural dengan komposisi atau morfologi yang tidak identik. Berdasarkan morfologinya membran dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori, yaitu: membran berpori dimana membran memiliki pori-pori atau jaringan pori dan membran tidak berpori (*dense*), dimana tidak terdapat pori-pori pada membran (Gambar 9.11). Perpindahan zat terlarut atau pelarut terjadi melalui mekanisme difusi. Berdasarkan bentuknya membran dapat dibedakan menjadi membran lembaran datar, membran tubular dan hollow fiber (Gambar 9.12).

Pada bab ini akan diuraikan filtrasi membran yang sering digunakan untuk proses klarifikasi kaldu fermentasi yaitu mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi.

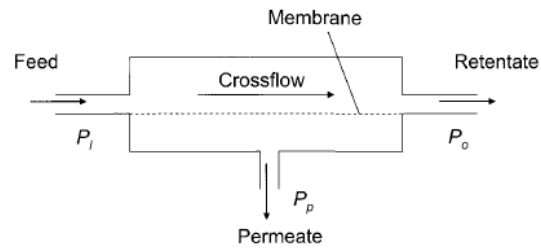
Mikrofiltrasi (MF) digunakan untuk pemisahan partikel dari larutan dengan mekanisme penyaringan. Mikrofiltrasi dapat dioperasikan baik

secara *dead-end* maupun *cross flow*. Aliran *dead-end* digunakan untuk penyaringan udara, proses penghilangan virus dan sterilisasi. Untuk aplikasi lain biasanya digunakan pola aliran *crossflow*. Faktor penggerak dari mikrofiltrasi adalah tekanan di permukaan membran yang berkisar antara 1 hingga 50 psig untuk aliran *crossflow*. Partikel akan tertahan pada permukaan membran. MF sering digunakan untuk penjernihan, sterilisasi dan pemekatan. Kebanyakan membran MF simetris. Polarisasi konsentrasi dan membran fouling menjadi masalah utama pada mikrofiltrasi yang menyebabkan turunnya fluks filtrasi. Polarisasi konsentrasi terjadi karena difusivitas partikel untuk kembali ke dalam aliran umpan lebih kecil dari pada pengendapan makromolekul, oleh karena itu terjadi kecenderungan pembentukan endapan. Fenomena lainnya adalah membran fouling dimana terjadi pengendapan [partikel](#) pada permukaan [membran](#) atau dalam pori-pori membran sehingga menyebabkan kinerja membran menurun.

Membran ultrafiltrasi (UF) Ultrafiltrasi digunakan untuk memisahkan zat terlarut dengan kisaran berat molekul 5 – 500 kDa. Membran UF memiliki diameter pori-pori mulai dari 1 hingga 20 nm diameter. Sebagian besar membran UF bersifat anisotropik, dengan "lapisan kulit" tipis, biasanya dengan ketebalan 10 μm yang berada di atas lapisan penyangga mikropori. Lapisan kulit memberi selektivitas pada membran sedangkan lapisan pendukung mikroporous memberikan dukungan mekanis. Mekanisme pemisahan terjadi selain berdasarkan ukuran molekul, juga dipengaruhi oleh interaksi fisikokimia antara zat terlarut dan membran, dan kondisi operasi. Tekanan transmembran pada ultrafiltrasi berkisar dari 10 hingga 100 psig. Sebagian besar membran UF asimetris. Kemampuan membran ultrafiltrasi dalam menyaring makromolekul dinyatakan dengan istilah molecular weight cut-off (MWCO). Nilai MWCO sebesar 10 kDa berarti membran dapat menahan 90% molekul dalam larutan umpan yang memiliki berat molekul 10 kDa.

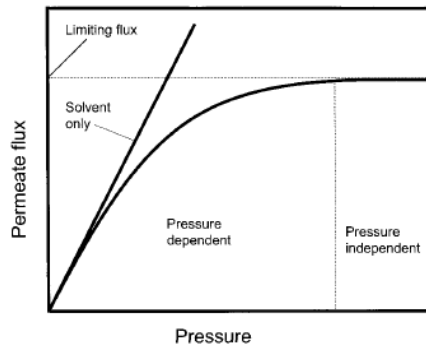
P_o : tekanan keluar pada sisi umpan (Pa)

P_p : tekanan pada sisi permeate (Pa)



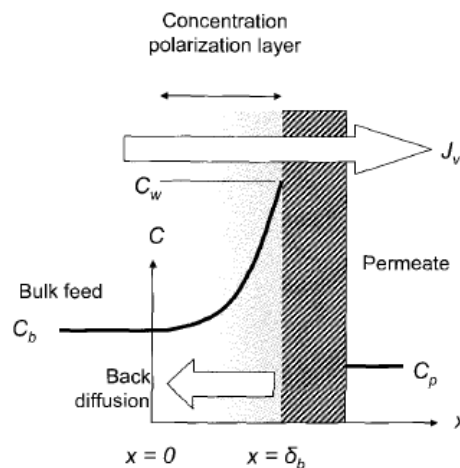
Gambar 9.14. Filtrasi membran dengan aliran silang

Ketika larutan makromolekul difiltrasi menggunakan ultrafiltrasi, maka akan terjadi akumulasi makromolekul di permukaan membran, yang dikenal dengan polarisasi konsentrasi. Pada kondisi tunak (*steady state*), gradien konsentrasi akan stabil karena terjadi difusi balik zat terlarut dari permukaan membran. Terjadinya polarisasi konsentrasi mengakibatkan tambahan tahanan hidrolis terhadap aliran pelarut dan juga menghasilkan tekanan osmotik yang bekerja melawan tekanan transmembran. Pembentukan lapisan polarisasi konsentrasi dan lapisan gel dipengaruhi oleh fluks permeat dan tekanan transmembran. Gambar 9.15 menunjukkan profil fluks UF-tekanan. Pada nilai tekanan transmembran yang rendah, fluks permeat meningkat secara linier dengan meningkatnya tekanan, dengan pola hampir berimpit dengan profil pelarut. Namun, jika tekanan dinaikkan lebih lanjut, terjadi penyimpangan dari profil pelarut, hal ini disebabkan oleh terjadinya polarisasi konsentrasi. Pada tekanan transmembran yang sangat tinggi, fluks permeat akan menurun tajam yang menunjukkan terjadinya pembentukan lapisan gel. Di atas titik ini, peningkatan tekanan transmembran tidak memiliki pengaruh lagi terhadap fluks permeat. Nilai fluks permeat ini disebut dengan fluks pembatas (*limiting fluks*), J_{lim} . Profil yang ditunjukkan pada Gambar 9.15 dapat dibagi menjadi dua daerah: daerah yang dimana fluks permeate masih dipengaruhi oleh tekanan, yang terdiri dari bagian dengan profil linier dan non-linier, dimana daerah non linier menunjukkan terjadinya polarisasi konsentrasi, serta daerah yang tidak dipengaruhi lagi oleh tekanan, di mana fluks pembatas telah tercapai. Proses ultrafiltrasi biasanya dioperasikan pada daerah yang masih tergantung tekanan.



Gambar 9.15. Pengaruh tekanan *transmembrane* terhadap *fluks permeate*

Karena adanya penumpukan molekul zat terlarut yang tertolak di dekat permukaan membran dan terjadinya difusi kembali zat terlarut ke dalam umpan, maka profil konsentrasi molekul zat terlarut dapat ditunjukkan pada Gambar 9.16. Pada kondisi tunak, keseimbangan material molekul zat terlarut dalam volume kontrol pada lapisan polarisasi konsentrasi dapat menimbulkan polarisasi gel, yang menunjukkan ketika C_w sama dengan C_g , fluks permeat tidak bergantung pada TMP. Di daerah bebas tekanan, fluks permeat untuk larutan umpan tertentu hanya bergantung pada koefisien perpindahan massa. Untuk koefisien perpindahan massa tertentu, nilai fluks permeat yang datar disebut dengan fluks pembatasnya (J_{lim}).



Gambar 9.16. Polarisasi konsentrasi

c. *Sentrifuge*

Sentrifuge (sentrifus) adalah alat yang digunakan untuk memisahkan partikel dari suspensi atau bahkan makromolekul dari larutan berdasarkan ukuran, bentuk dan densitasnya dengan menerapkan sistem dispersi ke

dalam area gravitasi yang diinduksi secara artifisial. Sentrifugasi hanya dapat digunakan jika bahan terdispersi mempunyai densitas yang lebih tinggi dari media di mana padatan tersebar. Tabel 9.2 menunjukkan densitas beberapa biologis yang biasanya dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Pada Tabel 6.1 hal yang perlu diperhatikan, seolah-olah protein dan asam nukleat akan mengendap lebih cepat dari pada sel dan organel, namun ini tidak benar. Makromolekul biologis dalam larutan air akan terhidrasi yaitu berasosiasi dengan molekul air dalam jumlah yang tinggi. Oleh karena itu densitas efektif zat-zat ini dalam larutan hanya sedikit lebih tinggi dari air. Makromolekul mempunyai densitas yang jauh lebih kecil dari sel sehingga tidak dapat dipisahkan menggunakan sentrifuse. Dalam proses sentrifugasi, kecepatan pengendapan diperbesar menggunakan induksi gravitasi secara buatan. Sel, komponen sub seluler, partikel virus dan protein besar dapat dipisahkan dengan mudah dengan sentrifugasi biasa, namun untuk mikromolekul seperti protein ukuran kecil, asam nukleat dan karbohidrat memerlukan alat khusus yang disebut ultrasentrifugasi yang mempunyai medan gravitasi buatan yang lebih tinggi. Prinsip pemisahan oleh sentrifugasi ditunjukkan pada Gambar 9.17 Sentrifuse diklasifikasikan menjadi dua:

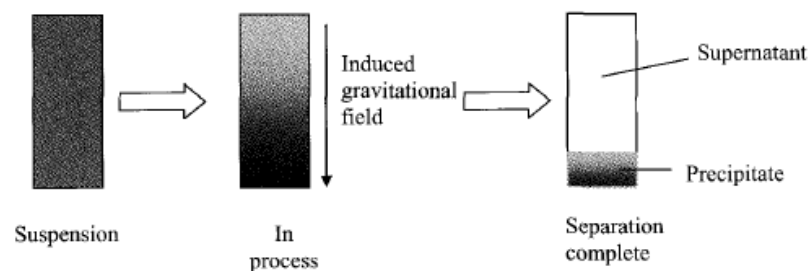
- 1) Sentrifuse laboratorium
- 2) Sentrifuse preparative

Tabel 9.2. Densitas materi biologis

Materi	Densitas (g/cm ³)
Sel mikroba	1,05 – 1,15
Sel mamalia	1,04 – 1,10
Organel	1,10 – 1,60
Protein	1,30
DNA	1,70
RNA	2,00

Sentrifus laboratorium

Sentrifuse laboratorium digunakan untuk pemisahan skala kecil dan klarifikasi (yaitu penghilangan partikel dari cairan). Volume kerja biasanya berkisar antara 1 - 5000 ml. Gambar 9.18 menunjukkan diagram sentrifus laboratorium. Suspensi yang akan disentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi (yang terlihat seperti tabung reaksi) yang dipasang secara simetris ke dalam blok berputar yang disebut rotor. Ada dua jenis rotor: rotor dengan sudut tetap dan rotor berayun. Pada sentrifuse dengan sudut rotor tetap, tabung sentrifus diputar dan ditahan dengan sudut tertentu terhadap sumbu rotasi. Sedangkan untuk sentrifus berayun rotor akan menahan tabung sentrifus dan jika berputar maka tabung sentrifus akan berayun keluar sedemikian rupa sehingga tegak lurus dengan sumbu rotasi. Ketika tabung sentrifugal berputar, akan tercipta gaya sentrifugal yang menginduksi medan gravitasi ke arah luar relatif terhadap sumbu rotasi dan mendorong partikel atau materi yang diendapkan ke bagian bawah tabung. Kecepatan putaran sentrifugal laboratorium biasanya berkisar antara 1.000 - 15.000 rpm. Besarnya medan gravitasi yang diinduksi diukur dalam nilai G: nilai G 1000 mengacu pada induksi medan gravitasi yang lebih kuat seribu kali. Nilai G disebut juga sebagai nilai RCF (gaya sentrifugal relatif) tergantung dari kecepatan rotasi serta cara tabung sentrifugal dipegang oleh rotor.

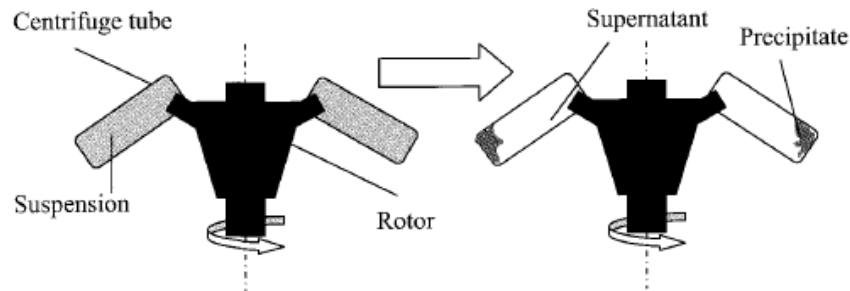


Gambar 9.17. Prinsip kerja sentrifuse

Sentrifus preparatif

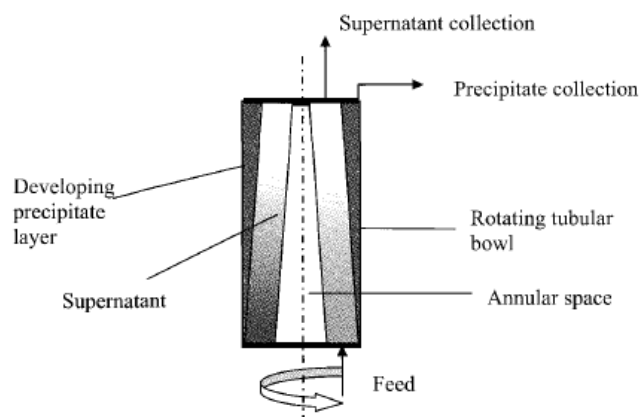
Sentrifugal preparatif dapat digunakan untuk pemisahan dengan volume cairan yang jauh lebih besar daripada sentrifugal laboratorium, biasanya berkisar dari 1 liter hingga beberapa ribu liter. Kecepatan putar

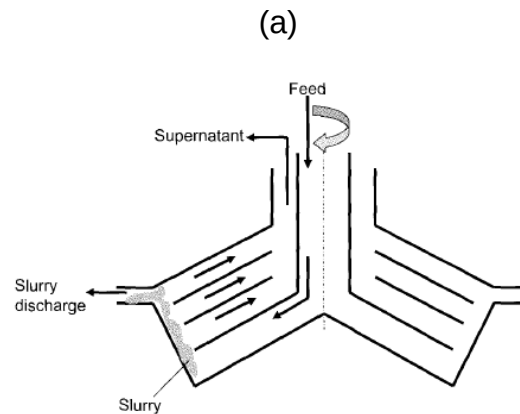
untuk preparative sentrifugal biasanya berkisar 500 - 2000 rpm. Terdapat beberapa desain untuk sentrifugal preparatif, yaitu sentrifus dengan tabung berputar (*tubular rotating chamber centrifuge*) dan sentrifuse dengan cakram bertumpuk (*disc stack centrifuge*) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 9.19.a.



Gambar 9.18. Sentrifus laboratorium

Prinsip kerja sentrifus jenis tabung berputar adalah suspensi yang akan disentrifugasi diumpankan dari satu ujung sementara supernatan dan endapan dikumpulkan di ujung lainnya secara kontinu atau semi kontinu. Sentrifus jenis cakram yang bertumpuk merupakan jenis sentrifus preparatif yang kompak dalam desain dan memberikan pemisahan padat-cair yang lebih baik daripada sentrifus jenis tabung berputar. Prinsip kerja seperti ditunjukkan pada Gambar 9.19.b. Umpa masuk dari atas dan didistribusikan ke bagian bawah mangkuk disk melalui lubang pada batang penggerak. Partikel terlempar keluar ke pinggiran cakram dan selanjutnya bergerak menuju ke sudut cakram yang terdapat pada ujung bagian atas untuk dikeluarkan dalam bentuk bubur, sedangkan cairan mengalir ke atas dan keluar dari sentrifus melalui saluran di poros.





Gambar 9.19. Sentrifus (a) tabung berputar dan (b) cakram bertumpuk

Ultrasentrifugasi

Ultrasentrifus adalah jenis sentrifus khusus yang di dalamnya terdapat rotor berputar dengan kecepatan yang jauh lebih tinggi daripada sentrifus biasa. Pada umumnya kecepatan putaran pada ultrasentrifus berkisar dari 30000 rpm - 50000 rpm. Ultrasentrifus biasanya digunakan untuk memisahkan makromolekul dari pelarut atau untuk fraksinasi campuran makromolekul. Ultrasentrifus dapat digunakan untuk tujuan analitik ataupun aplikasi preparatif. Ultrasentrifus analitik (AUC) terutama digunakan untuk mempelajari sifat-sifat makromolekul serta untuk menganalisis campuran kompleks makromolekul. Ultrasentrifugal preparatif digunakan untuk memurnikan makromolekul seperti protein dan asam nukleat berdasarkan sifat fisiknya seperti ukuran, berat molekul, massa jenis dan mobilitas. Kecepatan putar ultrasentrifugal yang tinggi akan menghasilkan panas yang besar, oleh karena itu diperlukan pendinginan untuk alat ini.

d. *Pemecahan Sel*

Produk biologis yang disintesis melalui fermentasi atau kultur sel dapat bersifat intraseluler atau ekstraseluler. Intraseluler jika produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme berada di dalam sel baik dalam bentuk terlarut dalam sitoplasma atau sebagai badan inklusi (partikel halus yang disimpan di dalam sel). Contoh produk intraseluler adalah insulin rekombinan dan faktor pertumbuhan rekombinan. Untuk melakukan rekoveri produk intraseluler maka pertama-tama sel harus dipecah terlebih dahulu (lisis) untuk mengeluarkannya dari dalam sel ke media cair sebelum pemisahan

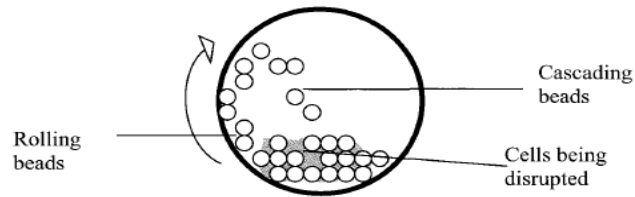
lebih lanjut dapat dilakukan. Teknik pemecahan sel dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok, yaitu:

- 1) Cara fisika-mekanika
 - a) Penggunaan bola manik
 - b) Penggunaan rotor-stator
 - c) Penggunaan *French-press*
 - d) Penggunaan getaran ultrasonik
- 2) Cara kimiawi
 - a) Penggunaan deterjen
 - b) Perlakuan dengan enzim
 - c) Perlakuan dengan pelarut
 - d) Tekanan osmotik

Metode fisika-mekanika lebih ditujukan untuk menghancurkan dinding sel sedangkan metode kimia ditujukan untuk destabilisasi membran sel.

Pemecahan sel menggunakan manik (*bead mill*)

Gambar 9.20 mengilustrasikan prinsip pemecahan sel menggunakan bead mill. Peralatan ini terdiri dari bejana tubular yang terbuat dari logam atau kaca tebal di mana suspensi sel ditempatkan bersama dengan logam kecil atau manik-manik kaca. Tabung kemudian diputar pada porosnya dan sebagai akibatnya manik-manik berguling menjauh dari arah rotasi bejana. Pada kecepatan rotasi yang lebih tinggi, beberapa manik ikut bergerak ke atas melalui dinding tabung kemudian jatuh ke bawah kembali. Penghancuran sel terjadi karena efek penggilingan oleh manik-manik yang bergulir secara kontinyu. Bead milling dapat menghasilkan panas yang sangat besar. Jika bahan termolabil, maka penggilingan dapat dilakukan pada suhu yang rendah dengan menambahkan nitrogen cair ke dalam tabung, yang dikenal sebagai penggilingan manik kriogenik. Sebagai alternatif dapat digunakan peralatan berpendingin glikol. Bead milling dapat dioperasikan dalam mode curah atau kontinu.



Gambar 9.20. Pemecahan sel dengan *bead mill*

Pemecahan sel menggunakan rotor-stator mill

Gambar 9.21 menunjukkan prinsip pemecahan sel menggunakan rotor-stator mill. Alat ini terdiri dari blok stasioner dengan rongga mengerucut yang disebut stator dan poros yang berputar berbentuk kerucut terpotong yang disebut rotor. Kecepatan putaran biasanya berkisar 10.000 hingga 50.000 rpm. Suspensi sel dimasukkan ke dalam celah kecil antara rotor yang berputar dan stator. Umpan akan tertarik ke dalam tabung karena adanya rotasi dan dikeluarkan melalui outlet karena gaya sentrifugal. Gaya geser dan turbulensi yang tinggi yang terjadi di dalam ruang antara rotor dan stator akan mengakibatkan sel pecah (Gambar 9.21).

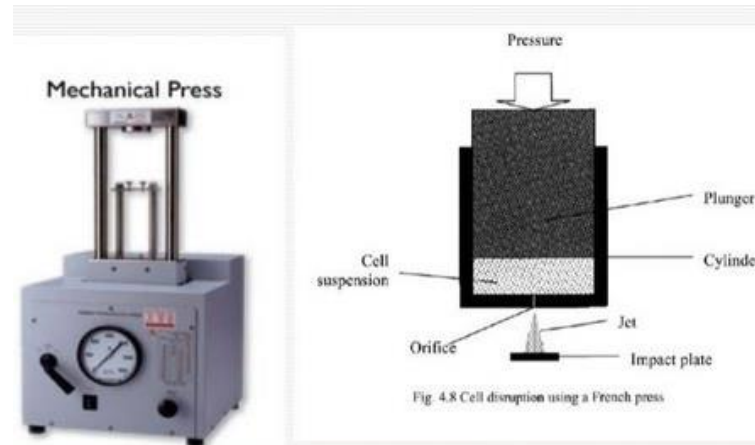


Gambar 9.21. Pemecahan sel menggunakan rotor-stator mill

Pemecahan sel menggunakan French press

Gambar 4.8 menunjukkan prinsip kerja French press yang biasanya digunakan untuk rekoveri protein intraseluler serta DNA dari sel bakteri dan tumbuhan untuk skala kecil. Alat terdiri dari silinder yang dilengkapi dengan plunger yang terhubung ke alat pengepres hidrolik. Suspensi sel dimasukkan ke dalam silinder dan diberi tekanan menggunakan plunger. Pada silinder terdapat lubang kecil tempat suspensi keluar dengan kecepatan sangat tinggi dalam bentuk jet halus. Pecahnya sel terjadi terutama disebabkan oleh gesekan yang tinggi antar sel di dalam lubang. Alat French press seringkali

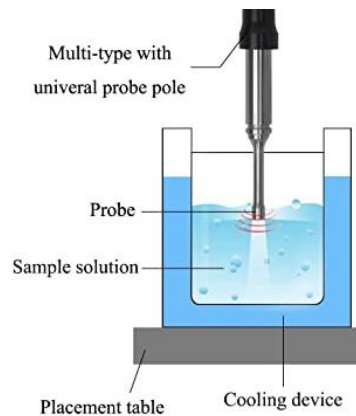
dilengkapi dengan sebuah pelat di mana jet menabrak pelat tersebut sehingga menyebabkan pecahnya sel lebih lanjut. Umumnya volume umpan hanya terbatas mulai dari beberapa mililiter hingga ratusan mililiter. Tekanan operasi biasanya berkisar antara 10.000 - 50.000 psig.



Gambar 9.22. Pemecahan sel menggunakan French press

Pemecahan sel dengan menggunakan getaran ultrasonik

Getaran ultrasonik (yaitu memiliki frekuensi lebih besar dari 18 kHz) dapat digunakan untuk memecah sel. Sel dipaparkan dalam getaran ultrasonik dari ujung pemancar getaran ultrasonik yang dicelupkan ke dalam suspensi sel (Gambar 4.22). Tersedia ujung pemancar ultrasonik dalam berbagai ukuran yang dapat dipilih berdasarkan volume sampel yang diproses. Getaran ultrasonik bisa dipancarkan terus menerus atau dalam getaran yang singkat. Untuk memecah sel biasanya digunakan frekuensi 25 kHz. Waktu yang dibutuhkan untuk memecah sel tergantung pada jenis sel, ukuran sampel dan konsentrasi sel. Getaran frekuensi tinggi akan menyebabkan kavitasi, yaitu pembentukan gelembung kecil di dalam media cair (lihat Gambar 4.10). Ketika gelembung-gelembung ini mencapai ukuran resonansi, maka akan pecah dan melepaskan energi mekanik dalam bentuk gelombang kejut yang setara dengan tekanan beberapa ribu atmosfer. Gelombang kejut tersebut mampu memecah sel yang ada dalam suspensi. Metode getaran ultrasonik penggunaannya seringkali dikombinasikan dengan pemecah sel kimiawi. Dalam hal ini dinding sel dilemahkan terlebih dahulu dengan menggunakan enzim atau deterjen sehingga energi yang dibutuhkan untuk memecah sel akan lebih kecil.



Gambar 9.23. Pemecahan sel menggunakan sonikator

Pemecahan sel menggunakan deterjen

Deterjen memecah struktur membran sel dengan cara melarutkan fosfolipid yang ada di membrane sel. Deterjen sering digunakan untuk pemecahan sel mamalia. Untuk memecah sel bakteri, deterjen harus digunakan bersama dengan lisozim dan untuk sel jamur (yaitu ragi dan jamur) maka dinding sel harus dilemahkan terlebih dahulu sebelum penggunaan deterjen. Deterjen diklasifikasikan menjadi tiga kategori: kationik, anionic dan non-ionik. Deterjen non-ionik lebih disukai dalam bioproses karena menyebabkan paling sedikit kerusakan pada molekul biologis yang sensitive seperti protein dan DNA. Deterjen non-ionik yang umum digunakan adalah seri Triton-X dan seri Tween. Namun, harus diperhatikan bahwa beberapa protein dapat berubah sifat atau mengendap oleh deterjen. Selain itu, deterjen perlu dibersihkan sebelum proses selanjutnya sehingga memerlukan proses pemurnian/pemolesan tambahan. Oleh karena itu penggunaan deterjen seringkali dihindari jika terdapat alternatif lain.

Pemecahan sel menggunakan enzim

Lisozim (enzim berbasis telur) dapat melisis dinding sel bakteri, terutama dinding sel dari jenis bakteri gram positif. Penggunaan lisozim saja tidak dapat memecah sel bakteri karena lisozim tidak dapat melisis membran sel. Oleh karena itu kombinasi lisozim dan deterjen sering digunakan untuk melisis sel. Lisozim juga dapat dikombinasi dengan syok osmotik atau metode pemecahan sel mekanis lainnya. Kelemahan penggunaan lisozim

adalah biayanya yang mahal. Masalah lain adalah perlunya menghilangkan lisozim dari produk serta adanya enzim lain seperti protease dalam sampel lisozim.

Pemecahan sel menggunakan pelarut organik

Pelarut organik seperti aseton dapat melarutkan fosfolipid pada membran sel dan mendenaturasi protein. Beberapa pelarut seperti toluena diketahui dapat memecah dinding sel jamur. Kelemahan dalam aplikasinya mirip dengan deterjen, yaitu kebutuhan untuk menghilangkan pelarut dari produk dan terjadinya denaturasi protein. Namun, karena pelarut organik bersifat volatil maka lebih mudah dihilangkan daripada deterjen.

Pemecahan sel karena syok osmotik

Tekanan osmotik dihasilkan dari adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut yang melintasi membran semi permeabel. Membran sel bersifat semi permeabel dan jika sel dipindahkan secara tiba-tiba dari media isotonik ke air suling (yang bersifat hipotonik) maka air akan masuk dengan cepat ke dalam sel. Hal ini kemudian akan menyebabkan volume sel membesar dengan cepat sehingga pecah. Sebagai contoh jika sel darah merah dimasukkan ke dalam air dengan maka akan terjadi hemolisis.

C. Latihan Soal

1. Jelaskan empat langkah dalam proses bioseparasi.
2. Jelaskan prinsip kerja dari filtrasi kedalaman (depth filtration) dan filtrasi saringan (screen filtration)?
3. Jelaskan prinsip kerja filtrasi dengan aliran dead-end dan crossflow
4. Apa yang dimaksud dengan lisis sel? Teknik-teknik apa saja yang dapat dipakai untuk melisis sel? Jelaskan dengan lengkap Teknik pemecahan sel dengan cara fisika-mekanika.
5. Jelaskan prinsip pemecahan sel dengan teknik sonikasi dan jelaskan kerja enzim lisozim pada sel bakteri.

D. Daftar Pustaka

Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.

Gottschalk U (2011) Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry, Elsevier, p 670-681

Raja Ghos, (2006) Principles Of Bioseparations Engineering, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore

Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

Stanbury P, Whitaker A and Hall SJ (2016) Principles of Fermentation Technology, 3rd edition, Pergamon Press

PERTEMUAN 10

PROSES HILIR: ISOLASI DAN PEMURNIAN

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami teknik-teknik untuk isolasi produk
2. Memahami teknik-teknik untuk pemurnian produk
3. Memahami teknik-teknik perlakuan akhir produk

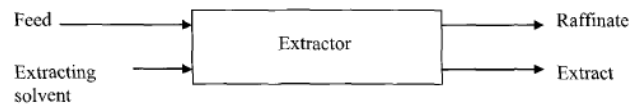
B. Uraian Materi

1. Teknik Isolasi Produk Fermentasi

Pada Bab sebelumnya telah dibahas tentang teknik-teknik klarifikasi kaldu fermentasi, yaitu pemisahan kaldu fermentasi dari partikel berupa sel, pecahan sel atau yang lainnya. Pada tahap selanjutnya perlu dilakukan isolasi produk yang masih dalam bentuk terlarut di dalam filtrat hasil klarifikasi. Tujuan pada tahap ini adalah memisahkan produk yang diinginkan dari pengotor yang terlarut. Isolasi produk dapat dilakukan dengan beberapa teknik yang meliputi ekstraksi pelarut, ekstraksi sistem dua fase berair (*aqueous two-phase system*; *ATPS*), adsorpsi, ultrafiltrasi, reverse osmosis atau pengendapan.

a. Ekstraksi Pelarut

Ekstraksi merupakan pemisahan zat terlarut dari suatu larutan dilakukan dengan menambahkan pelarut yang tidak saling bercampur dimana komponen yang diinginkan akan bersifat lebih larut ke dalam pelarut yang ditambahkan. Jika ekstraksi berlangsung dari satu media cair ke media cair lainnya, maka proses disebut sebagai ekstraksi cair-cair, dan jika cairan digunakan untuk mengekstrak zat yang terdapat dalam bahan padat, maka proses disebut dengan ekstraksi padat-cair. Pada Bab ini akan dibahas proses ekstraksi pelarut yang merupakan salah satu bentuk ekstraksi cair-cair yang sering digunakan dalam proses bioseparasi.



Gambar 10.1. Prinsip ekstraksi dengan pelarut

Proses ekstraksi dapat diilustrasikan seperti pada Gambar 10.1. Umpan yang mengandung beberapa komponen zat terlarut diekstraksi menggunakan suatu pelarut. Pemisahan dari zat terlarut didasarkan pada perbedaan kelarutan dari masing-masing komponen dalam pelarut yang digunakan. Misal penisilin dalam filtrat hasil fermentasi diekstraksi dengan pelarut organik (misalnya butyl asetat). Penisilin yang awalnya terlarut dalam filtrat fermentasi akan berpindah ke pelarut organik, sedangkan pengotor terlarut lainnya akan tetap berada dalam filtrat. Fasa yang mengandung banyak penisilin disebut ekstrak yang diperkaya, sedangkan fasa yang mengandung sedikit penisilin disebut rafinat.

Jenis pelarut merupakan faktor yang penting dalam ekstraksi. Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan faktor-faktor sebagai berikut: a). Selektifitas: pelarut hanya boleh melarutkan zat terlarut yang diinginkan, bukan komponen-komponen lain dari bahan ekstraksi, b). Kelarutan: pelarut sebaiknya memiliki kemampuan melarutkan zat terlarut diinginkan yang tinggi c). Kemampuan untuk tidak saling bercampur: pelarut harus bersifat tidak saling bercampur atau bercampur secara terbatas, d). Densitas: sedapat mungkin terdapat perbedaan densitas yang besar antara pelarut dan bahan ekstraksi, e). Reaktifitas: pada umumnya pelarut tidak boleh menyebabkan perubahan kimiawi pada komponen bahan ekstraksi, f). Titik didih: karena ekstrak dan pelarut biasanya harus dipisahkan dengan cara penguapan, destilasi atau rektifikasi, maka titik didih kedua bahan itu tidak boleh terlalu dekat. Kriteria lain yang perlu dipertimbangkan adalah: pelarut sedapat mungkin harus murah, tersedia dalam jumlah besar, tidak beracun, tidak mudah terbakar, tidak eksplosif bila bercampur dengan udara, tidak korosif, tidak menyebabkan terbentuknya emulsi, memiliki viskositas yang rendah dan stabil secara termal.

Kemampuan pelarut dalam melarutkan zat yang diinginkan dinyatakan dalam nilai koefisien distribusi atau koefisien partisi, K :

$$K = \frac{C_E}{C_R} = \frac{\text{konsentrasi zat terlarut dalam ekstrak}}{\text{konsentrasi zat terlarut dalam rafinat}} \quad (10.1)$$

Nilai K tidak tergantung pada konsentrasi zat terlarut, terutama pada konsentrasi zat terlarut yang rendah. Namun, pada konsentrasi zat terlarut yang tinggi, penyimpangan dari linieritas antara C_R dan C_E dapat terjadi. Koefisien partisi zat terlarut antara dua fase biasanya ditentukan melalui percobaan. Jika kesetimbangan distribusi tercapai, maka potensial kimia zat terlarut yang ada dalam kedua fase harus sama.

$$\mu_E = \mu_R \quad (10.2)$$

dimana μ_E : potensial kimia zat terlarut dalam ekstrak
 μ_R : potensial kimia zat terlarut dalam rafinat

oleh karena itu

$$\mu_R^0 + RT \ln x = \mu_E^0 + RT \ln y \quad (10.3)$$

dimana x : konsentrasi zat terlarut dalam rafinat (fraksi mol)
 y : konsentrasi zat terlarut dalam ekstrak (fraksi mol)
 μ_E^0 : potensial kimia pada keadaan standar dalam ekstrak
 μ_R^0 : potensial kimia pada keadaan standar dalam rafinat

Persamaan di atas disusun ulang diperoleh:

$$K_{xy} = \frac{y}{x} = \exp\left(\frac{\mu_R^0 - \mu_E^0}{RT}\right) \quad (10.4)$$

dimana K_{xy} : koefisien partisi fraksi mol

Dari persamaan (10.4) terlihat bahwa jika selisih potensial kimia pada keadaan standar semakin besar maka ekstraksi semakin baik. Persamaan tersebut juga menunjukkan bahwa perpindahan zat terlarut lebih baik dilakukan pada suhu yang rendah.

Kelarutan produk dalam pelarut merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Prinsip penting dalam pemilihan jenis pelarut "*like dissolves like*" yang dapat diartikan pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan sebaliknya. Polaritas suatu pelarut dapat dinyatakan dalam suatu konstanta dielektrik (K_D). Jika zat terlarut yang diinginkan bersifat polar maka pelarut

yang digunakan juga harus bersifat polar. Konstanta dielektrik dari beberapa pelarut ditampilkan pada Tabel 10.1.

Tabel 10.1. Konstanta dielektrik beberapa pelarut pada 25°C (disusun berdasarkan kenaikan polaritas)

Solvent	Dielectric constant
Hexane	1.90 (least polar)
Cyclohexane	2.02
Carbon tetrachloride	2.24
Benzene	2.28
Di-ethyl ether	4.34
Chloroform	4.87
Ethyl acetate	6.02
Butan-2-ol	15.8
Butan-1-ol	17.8
Propan-1-ol	20.1
Acetone	20.7
Ethanol	24.3
Methanol	32.6
Water	78.5 (most polar)

Pada umumnya proses ekstraksi cair-cair terdiri dari tiga tahap, yaitu:

Pengadukan atau pengkontakan. Perpindahan zat terlarut dalam dua pelarut yang dapat bercampur sebagian atau tidak bercampur sama sekali membutuhkan kontak yang baik dari kedua pelarut tersebut. Hal ini biasanya dicapai dengan mendispersikan salah satu cairan (fase terdispersi) sebagai tetesan kecil ke dalam cairan lainnya (fase kontinu). Laju perpindahan zat terlarut tergantung dari koefisien perpindahan massa antar muka yang bergantung pada kondisi hidrodinamika sistem dan area kontak yang tersedia. Pengadukan yang kuat dapat dilakukan untuk mencapai kedua kondisi tersebut dengan baik.

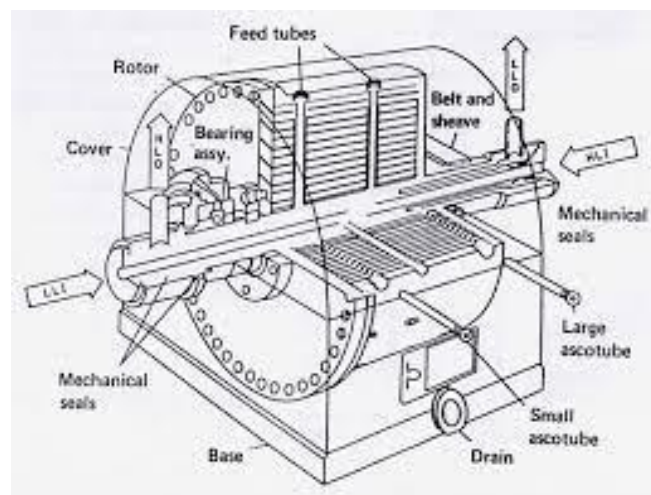
Pemisahan fase atau pengendapan. Jika laju perpindahan zat terlarut yang diinginkan telah tercapai (mis. kesetimbangan telah tercapai), maka langkah selanjutnya adalah membiarkan tetesan fase terdispersi untuk bergabung sehingga terjadi pemisahan kedua pelarut tersebut karena perbedaan densitas. Dalam proses ekstraksi cair-cair, yang penting diperhatikan bahwa kedua cairan (yaitu rafinat dan ekstrak) harus memiliki

perbedaan densitas yang cukup tinggi untuk memfasilitasi terjadinya pemisahan fase.

Pengumpulan fase. Setelah terjadi pemisahan fase selanjutnya fasa ekstrak dan fasa rafinat ditampung sebagai aliran terpisah dengan cara yang sesuai.

Peralatan ekstraksi cair-cair

Peralatan ekstraksi cair-cair yang sangat penting untuk produk fermentasi adalah ekstraktor sentrifugal Podbielniak (lihat Gambar 10.2). Banyak produk fermentasi bersifat tidak stabil (misal penisilin). Penggunaan sistem ekstraksi curah (dengan sistem pengadukan dan pemisahan) bisa menjadi masalah karena produk akan terdegradasi karena waktu tinggal produk dalam kaldu dengan pH yang rendah terlalu lama. Guna mengatasi hal tersebut maka digunakan ekstraktor sentrifugal Podbielniak. Ekstraktor berputar dengan cepat menghasilkan gaya sentrifugal yang menggerakkan kedua fluida dengan arah berlawanan satu sama lainnya, seperti yang digambarkan pada Gambar 10.2. Produk diekstraksi pada kondisi yang sesuai secara cepat sehingga produk berpindah ke fase cair lainnya dimana produk menjadi lebih stabil.



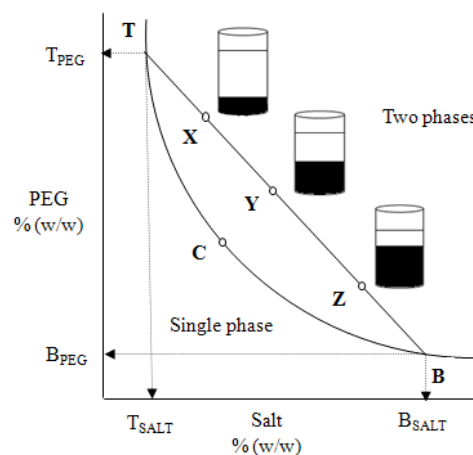
Gambar 10.2. Ekstraktor sentrifugal Podbielniak

b. Ekstraksi dua fase berair (*aqueous two-phase system extraction*; ATPS)

Ekstraksi dua fase berair merupakan salah satu bentuk ekstraksi cair-cair melibatkan transfer zat terlarut dari satu fase air ke fase air lainnya. Kedua fasa air bersifat tidak saling melarutkan. Dua sistem ekstraksi dua fase berair yang biasa digunakan adalah:

- 1) Sistem dua fase polimer-polimer
- 2) Sistem dua fase garam-polimer

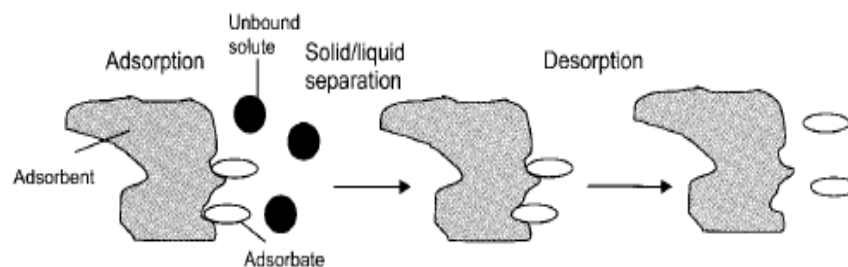
Sebagai contoh, sistem dua fase polimer-polimer dapat diperoleh dengan mencampur dekstran dan PEG (*polyethylene glycol*) dengan komposisi tertentu. Selanjutnya penambahan campuran kedua polimer tersebut ke fasa umpan berair (yang mengandung zat terlarut) akan diperoleh dua fase air, yang satu kaya akan PEG dan yang lainnya kaya dekstran. Sistem dua fase berair dapat juga dihasilkan dari penggunaan polimer (misalnya PEG atau dekstran) dan garam seperti natrium atau kalium fosfat. Pemisahan dua fase berair dapat terjadi pada komposisi tertentu saja. Gambar 10.3 menunjukkan diagram fase PEG-garam dimana kurva kelarutan memisahkan daerah dua fase (di atas kurva) dari wilayah fase tunggal (di bawah kurva). Diagram fase "biner", yang menunjukkan hubungan konsentrasi polimer dan garam diperlukan untuk menentukan komposisi zat terlarut yang diinginkan dalam fase atas an fase bawah.



Gambar 10.3. Kurva kesetimbangan biner PEG-garam. TCB = kurva kesetimbangan biner, C = titik kritis, TB = *Tie line*, T = komposisi fase atas, B = komposisi fase bawah, serta X, Y dan Z = komposisi total dari ATPS.

c. Adsorpsi

Adsorpsi mengacu pada pengikatan molekul pada permukaan material padat. Proses adsorpsi melibatkan transfer zat terlarut dari fase cair ke permukaan fase padat. Adsorpsi merupakan fenomena permukaan dan berbeda dengan absorpsi, yang mengacu pada penetrasi zat ke dalam struktur pori-pori dalam bahan padat. Adsorpsi dapat digunakan untuk memisahkan molekul dari campuran molekul yang kompleks, atau untuk memisahkan zat terlarut dari pelarutnya (lihat Gambar 10.4).



Gambar 10.4. Pemisahan secara adsorpsi

Hal ini dapat dilakukan dengan mengkontakkan larutan dengan bahan padat yang juga disebut adsorben. Molekul yang terikat di adsorben disebut dengan adsorbat. Pengikatan zat terlarut biasanya terjadi di titik tertentu di permukaan adsorben yang disebut sebagai situs pengikatan (*binding sites*) atau ligan. Kata ligan mengacu pada entitas molekul tertentu yang ditempelkan di permukaan bahan padatan ketika pada tahap penyiapan adsorben. Afinitas pengikatan adalah bentuk adsorpsi selektif dimana interaksi yang spesifik terjadi antara molekul dan ligannya. Setelah proses adsorpsi selesai, selanjutnya bahan terikat perlu dilepaskan, atau molekul perlu dilepas dari ligannya, oleh karena itu proses adsorpsi harus dapat dibalik. Pelepasan bahan yang teradsorpsi dari adsorben disebut desorpsi dimana pada umumnya dilakukan pada kondisi yang berlawanan dengan proses adsorpsi.

Adsorpsi adalah proses pengikatan yang bersifat selektif dipengaruhi oleh:

- 1) Berat molekul, ukuran dan sifat zat terlarut
- 2) Karakteristik situs pengikat atau ligan
- 3) Polaritas molekul dan adsorben

4) Muatan elektrostatis pada molekul dan pada adsorben

Beberapa keunggulan adsorpsi adalah:

- 1) Selektivitas pemisahan yang tinggi (misalnya dalam adsorpsi afinitas)
- 2) Kemampuan untuk memperoleh kembali zat terlarut dari larutan encer

Kerugian dari adsorpsi adalah:

- 1) Karena merupakan fenomena permukaan maka pengikatan zat terlarut terbatas pada permukaan saja
- 2) Adsorpsi bersifat siklik oleh karena itu proses pemisahan hanya dapat dilakukan dalam mode curah
- 3) Adsorpsi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas biologis zat terlarut
- 4) Adsorben dapat dikotori oleh molekul biologi dan bersifat irreversible.

Beberapa aplikasi umum adsorpsi adalah sebagai berikut:

- 1) Pemurnian protein
- 2) Pemurnian asam nukleat
- 3) Pemurnian antibiotik
- 4) Analisis biomedis
- 5) Kromatografi elusi

Adsorben

Partikulat adsorben yang digunakan dalam proses adsorpsi dapat berasal dari bahan alami atau sintesis. Pada umumnya adsorben memiliki struktur amorf atau mikrokristalin. Bentuk fisik ini dapat menghasilkan luas permukaan spesifik yang sangat tinggi (luas permukaan per satuan jumlah adsorben). Adsorben yang sering digunakan dalam proses bioseparation antara lain: adsorben berbasis selulosa, adsorben berbasis silika gel, resin sintesis, adsorben berbasis agarosa dan adsorben berbasis ikatan silang dekstran. Partikulat adsorben dapat digunakan baik dalam bentuk suspensi, unggun tetap atau unggun terfluidisasi. Dengan perkembangan teknologi memungkinkan adsorben dalam bentuk membran dan monolit.

Mekanisme pemisahan

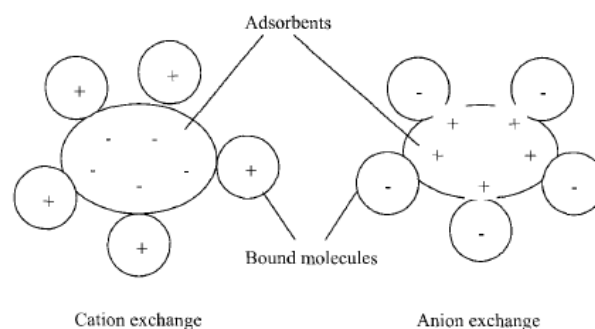
Pengikatan fisik molekul ke adsorben terjadi karena satu atau lebih interaksi non-kovalen seperti di bawah ini:

- 1) Gaya van der Waals
- 2) Interaksi elektrostatis

- 3) Interaksi hidrofobik
- 4) Ikatan hidrogen
- 5) Partisi

Berdasarkan jenis interaksinya, mekanisme pemisahan dapat diklasifikasikan menjadi:

Pertukaran ion. Pertukaran ion didasarkan pada interaksi elektrostatik antara molekul dan adsorben (lihat Gambar 10.5). Adsorben penukar kation muatan negatif oleh karena itu dapat mengikat molekul yang bermuatan positif. Sebaliknya, adsorben penukar anion bermuatan positif sehingga dapat mengikat molekul yang bermuatan negatif.



Gambar 10.5. Adsorpsi penukar ion

Adsorben penukar ion dibuat dengan menempelkan gugus bermuatan ke bahan pendukung yang bersifat tidak larut. Contoh bahan pendukung adalah selulosa, turunan selulosa, agarosa, resin akrilik dan ikatan silang dekstran. Beberapa bahan pendukung seperti selulosa memiliki gugus yang bermuatan (misalnya selulosa memiliki gugus asam karboksilat bermuatan negatif). Namun, kerapatan intrinsik muatan negatif selulosa tidak mencukupi untuk menyerap zat terlarut dalam jumlah yang besar. Oleh karena itu untuk membuat adsorben penukar kation, gugus atau ligan yang bermuatan perlu ditambahkan seperti gugus asam karboksilat (atau C), gugus karboksimetil (atau CM) dan gugus sulphopropyl (atau S). Gugus C dan CM merupakan gugus penukar kation yang lemah karena besarnya muatan tergantung dari pH. Gugus S merupakan contoh gugus penukar kation yang kuat. Muatan negatif pada kelompok ini tidak bergantung pada pH. Gugus lain yang sering digunakan untuk membuat adsorben penukar anion adalah gugus dietilaminoetil (DEAE), gugus aminoetil kuaterner (QAE) dan gugus

amonium kuaterner (Q). Kelompok DEAE dan QAE merupakan penukar anion lemah sedangkan kelompok Q adalah anion kuat.

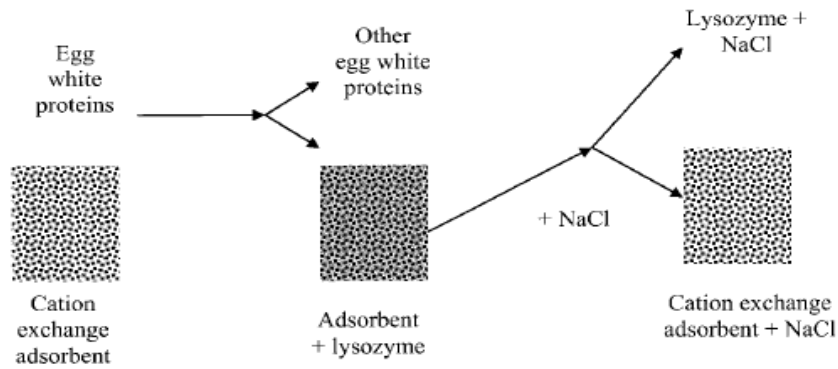
Pengikatan molekul pada adsorben penukar ion dipengaruhi oleh parameter seperti pH, kekuatan ion dan jenis buffer. Muatan elektrostatis pada sebagian besar molekul biologis dipengaruhi oleh pH larutan. Protein merupakan molekul amfoter, dimana besar dan jenis muatan elektrostatisnya dapat dimanipulasi dengan mengubah pH. Untuk mengikat protein pada adsorben penukar anion, pH larutan harus dipertahankan di atas titik isoelektrik-nya sehingga protein akan bermuatan negatif. Sebaliknya berlaku untuk mengikat protein pada adsorben penukar kation. Kekuatan ionik dari larutan umpan juga mempengaruhi jumlah molekul yang dapat terikat pada adsorben. Secara umum berlaku aturan semakin meningkat kekuatan ionik maka akan semakin kecil jumlah terikat. Oleh karena itu, dalam pemisahan berdasar pada pertukaran ion, khususnya dari larutan umpan yang diperoleh dari proses pengendapan melalui proses penggaraman, kekuatan ionik larutan umpan perlu dikurangi dengan cara yang sesuai (misalnya ultrafiltrasi dan dialisis). Jenis buffer juga memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pengikatan oleh karena itu perlu dipilih dengan benar. Sebelum dilakukan proses adsorpsi, muatan ligan yang ada pada adsorben mengikat ion yang ada dalam buffer dan bersifat dapat dipertukarkan. Saat larutan umpan diumpankan ke adsorben, ion ini digantikan oleh molekul target yang mempunyai muatan yang sesuai. Pertukaran ion terjadi karena kekuatan untuk mengikat molekul target lebih tinggi dari pada ion awal yang terikat di adsorben.

Molekul yang terikat pada adsorben penukar ion dapat didesorbsi atau diperoleh kembali dengan cara yang berbeda. Tahap ini disebut dengan elusi. Metode elusi yang paling umum adalah menggunakan larutan yang mengandung garam netral, seperti natrium klorida, dengan konsentrasi tinggi. Pada konsentrasi yang tinggi garam dapat menurunkan interaksi elektrostatis antara molekul target dan ligan, sehingga molekul target dapat didesorbsi dari adsorben. Muatan larutan elektrolit yang dihasilkan dari garam yang terdisosiasi akan bersaing dengan molekul target untuk berikatan dengan situs pengikatan pada adsorben. Misal, ion natrium pada konsentrasi tinggi dapat melepaskan molekul yang bermuatan positif dalam adsorben penukar kation. Molekul yang terikat pada adsorben juga dapat

dielusi dengan cara mengubah pH larutan. Contoh pada pemisahan protein. Muatan elektrostatis bersih pada protein dapat dikurangi hingga menjadi nol atau bahkan bermuatan sebaliknya dengan cara mengubah pH. Oleh karena itu, protein yang bermuatan positif dapat dielusi dari adsorben penukar kation dengan meningkatkan pH larutan menjadi di atas titik isoelektrik protein. Dengan membuat perubahan pH maka protein menjadi bermuatan negatif sehingga akan terlepas dari adsorben melalui pertukaran ion. Contoh pemisahan berbasis adsorpsi pertukaran kation adalah pemurnian protein lisozim menggunakan adsorben S. Lisozim merupakan protein enzim yang dimurnikan dari putih telur. Tabel 10.2 ditampilkan beberapa beberapa protein yang ada dalam putih telur bersama dengan titik isoelektriknya. Terlihat bahwa titik isoelektrik lisozim secara signifikan lebih tinggi dibandingkan ovalbumin dan konalbumin. Pada pH 7.0, lisozim bermuatan positif sedangkan protein lainnya bermuatan negatif. Jika larutan putih telur pada pH 7.0 dikontakkan dengan adsorben penukar kation, maka lisozim akan berikatan dengan ligan yang bermuatan negatif sedangkan protein lainnya tidak. Lisozim yang terikat selanjutnya dapat dielusi dari adsorben dengan menggunakan larutan natrium klorida konsentrasi tinggi. Secara teoritis, lisozim yang terikat juga dapat dielusi dengan cara meningkatkan pH larutan di atas 11,0. Namun, penggunaan konsentrasi garam tinggi lebih mudah dan praktis, oleh karena itu lebih banyak digunakan. Pemisahan lisozim dari putih telur menggunakan metode adsorpsi pertukaran kation ditunjukkan pada Gambar 10.6.

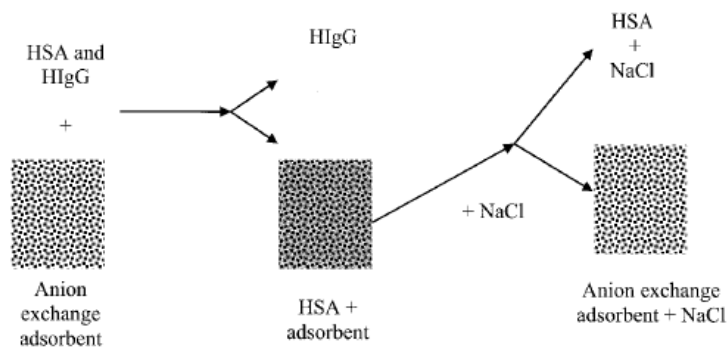
Tabel 10.2. Protein putih telur

Protein	pH titik isoelektrik
Lysozyme	11,0
Ovalbumin	4,6
Conalbumin	6,1



Gambar 10.6. Pemisahan lysozyme dengan metode pertukaran kation

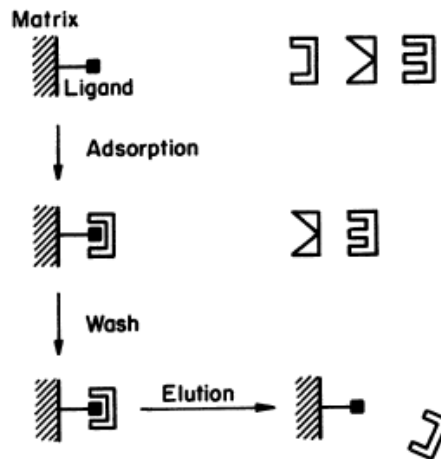
Pemisahan human immunoglobulin G (HlgG) dan serum albumin manusia (HSA) menggunakan Q-adsorbent adalah contoh pemisahan berbasis pertukaran anion. pI dari HSA adalah 4,9 sedangkan HlgG adalah sekitar 7.0. Pada pH 5.5, protein ini akan bermuatan berlawanan, HSA akan bermuatan negatif sedangkan HlgG akan bermuatan positif. Jika campuran ini dikontakkan dengan adsorben penukar anion, HSA akan mengikat ligan bermuatan positif sedangkan HlgG tidak terikat. HSA yang terikat selanjutnya dapat dielusi dengan natrium klorida. Gambar 10.7 menggambarkan proses pemisahan kedua protein tersebut.



Gambar 10.7. Pemisahan albumin dengan metode pertukaran anion

Pengikatan afinitas. Pengikatan afinitas didasarkan pada interaksi stereo-spesifik antara molekul target dan ligan, sebagai contoh bentuk ligan yang merupakan komplementari dari seluruh atau sebagian bentuk molekul target (lihat Gambar 8.5). Ligan dan molekul target berinteraksi melalui kombinasi ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan gaya van der Waals. Pengikatan afinitas sangat spesifik sehingga dapat digunakan untuk

memisahkan zat terlarut tertentu dari campuran zat terlarut. Jika ligan hanya berikatan dengan satu jenis molekul, maka proses pengikatan disebut sebagai adsorpsi afinitas spesifik, contohnya pengikatan antigen-antibodi. Ketika ligan mengikat berbagai molekul yang memiliki kesamaan bentuk tertentu, maka proses disebut dengan adsorpsi afinitas umum.



Gambar 10.8. Prinsip pemisahan kromatografi afinitas. Ligan terikat secara kovalen ke matriks penyangga. Pada tahap adsorpsi, hanya molekul yang mempunyai situs pengikatan spesifik yang sesuai dengan ligan yang akan teradsorpsi. Molekul yang tidak mempunyai kesesuaian geometri dengan ligan tidak teradsorpsi. Pada tahap elusi molekul yang terikat pada ligan akan terlepas dan ditampung sebagai fraksi aktif

Adsorben afinitas dibuat dengan mengikatkan ligan afinitas ke bahan penyangga yang tidak larut (disebut juga matriks penyangga). Contoh bahan penyangga yang sering digunakan untuk menyiapkan adsorben afinitas adalah: ikatan silang dekstran, ikatan silang agarosa, ikatan silang selulosa dan resin sintesis. Matriks penyangga berbasis agarosa paling banyak digunakan dalam adsorpsi afinitas. Terdapat banyak variasi ligan afinitas, beberapa diantaranya adalah sebagai berikut:

- | | |
|----------------------------|------------------------|
| 1. Ligan pewarna | 8. Reseptor |
| 2. Antibodi | 9. Asam amino |
| 3. Antigen | 10. poli- (asam amino) |
| 4. Protein A dan protein G | 11. Lektin |

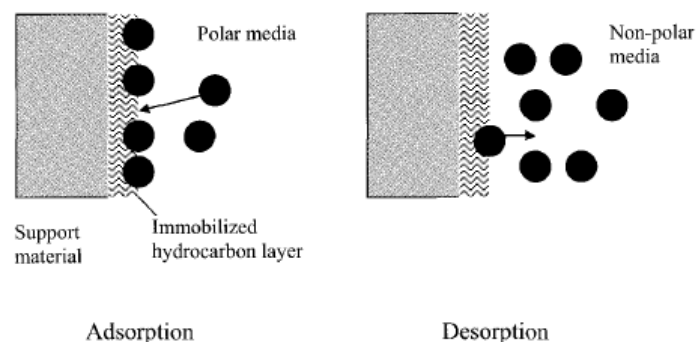
5. Analog substrat
6. Penghambat enzim
7. Pasangan urutan basa nukleotida
12. Concanavalin A
13. Ion logam amobil

Pewarna tertentu memiliki kemampuan untuk mengikat berbagai protein yang berbeda secara adsorpsi afinitas umum. Contoh: Reaktif-Merah, Reaktif-Biru, Cibacron-Biru dan Proksi-Biru. Pewarna ini diikatkan pada dekstran yang telah berikatan silang atau penyangga agarosa yang berikatan silang. Kelemahan utama penggunaan adsorpsi afinitas berbasis pewarna adalah jika molekul pewarna telah terbebas dari penyangganya maka akan dapat mencemari produk. Karena pewarna bersifat berbahaya maka adsorben tidak digunakan dalam pengolahan produk biofarmasi dan makanan.

Antibodi adalah molekul protein berbentuk Y yang memiliki kemampuan untuk mengenali molekul spesifik yang disebut antigen. Jika antigen perlu dimurnikan seperti dalam produksi vaksin maka antibodi dari antigen dapat digunakan untuk pemurnian. Antibodi monoklonal lebih sering digunakan dari pada antibodi poliklonal untuk adsorpsi afinitas. Antibodi ditambatkan ke bahan pendukung yang sesuai (misal agarose atau dekstran) melalui metode kimia yang sesuai, yang selanjutnya berfungsi sebagai ligan afinitas yang dapat digunakan untuk memisahkan antigen yang sesuai yang ada dalam campuran kompleks. Antigen juga dapat digunakan sebagai ligan afinitas untuk memurnikan antibodi yang sesuai. Protein A dan Protein G adalah ligan spesifik yang saling mengenali dan berikatan membentuk antibodi tipe IgG. Kelemahan utama penggunaan antibodi atau antigen atau Protein A dan G sebagai ligan afinitas adalah kerentanannya terhadap degradasi.

Fase terbalik. Adsorpsi fase terbalik adalah contoh pemisahan secara partisi (adsorpsi berdasarkan kelarutan) yang digunakan untuk adsorpsi molekul non-polar. Partisi molekul hanya terjadi pada lapisan tipis hidrokarbon yang tertambat pada fase diam dan tidak terjadi di dalam seluruh badan pelarut seperti pada proses ekstraksi. Adsorpsi fase terbalik menggunakan senyawa hidrofobik atau senyawa dengan polaritas yang rendah seperti rantai hidrokarbon alifatik C4 hingga C18 untuk mengikat zat

terlarut. Senyawa ini terikat secara kimiawi pada bahan penyangga padat seperti silika. Rantai hidrokarbon tidak dapat disebut ligan karena interaksinya berbeda dengan interaksi pertukaran ion dan afinitas. Senyawa hidrokarbon memberikan lingkungan suasana non-polar sehingga molekul non-polar yang ada dalam fase bergerak dapat dipisahkan dengan baik. Prinsip adsorpsi fase terbalik ditunjukkan pada Gambar 10.9. Sebagai larutan umpan biasanya merupakan pelarut polar seperti air atau campuran air-metanol. Ketika larutan umpan berkontak dengan adsorben fase terbalik, molekul non-polar terpartisi dan terikat pada lapisan hidrokarbon dan selanjutnya dapat dielusi menggunakan pelarut non-polar, seperti asetonitril dan isopropanol.

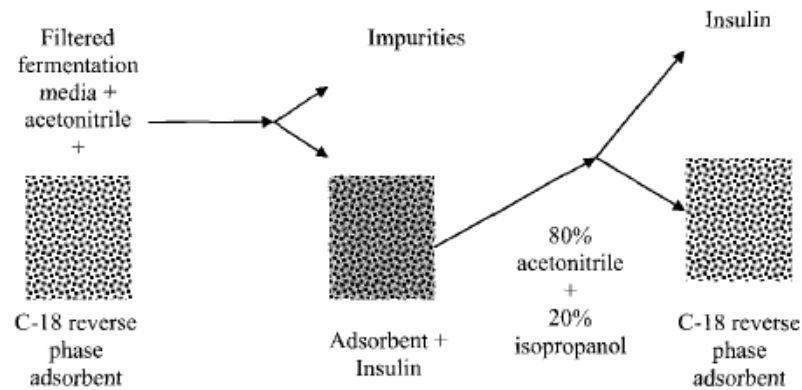


Gambar 10.9. Adsorpsi fase terbalik

Adsorpsi fase balik tidak cocok untuk pemisahan makromolekul seperti protein dan asam nukleat karena senyawa tersebut tidak terpartisi dengan baik ke dalam lapisan hidrokarbon. Selain itu pelarut organik yang digunakan untuk elusi dalam proses fase balik juga dapat mengubah sifat senyawa ini. Adsorpsi fase balik lebih banyak digunakan untuk mengikat senyawa dengan berat molekul rendah dan menengah seperti antibiotik, hormon, lipid, peptida dan protein kecil seperti insulin.

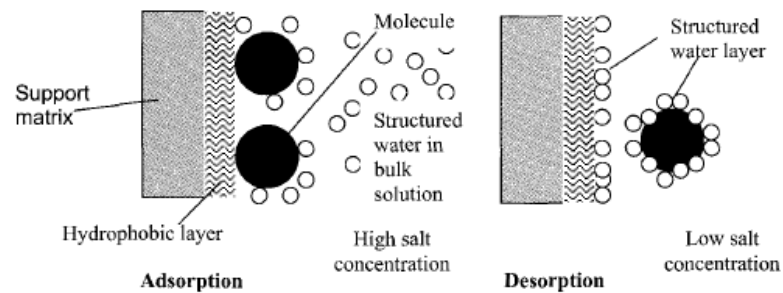
Pemurnian insulin rekombinan menggunakan adsorpsi fase terbalik ditunjukkan pada Gambar 10.10. Bahan yang mengandung insulin awalnya dilarutkan dalam pelarut polar yang sebagian besar terdiri dari air dan garam penyangga dan sedikit asetonitril. Ketika larutan dikontakkan dengan adsorben fase balik silika-C8, insulin dipartisi ke dalam lapisan hidrokarbon. Protein dan asam nukleat pengotor yang ada dalam sampel tidak terpartisi dalam lapisan non-polar sehingga dapat dengan mudah dipisahkan. Insulin

yang terikat oleh adsorben selanjutnya dapat diperoleh kembali dengan mengelusi menggunakan pelarut non-polar yang terdiri dari campuran asetronitril (80%) dan isopropanol (20%). Dengan adanya pelarut non-polar, insulin yang terpartisi dapat dikembalikan ke fase terikat ke fase cair sehingga dapat diperoleh insulin yang lebih murni.



Gambar 10.10. Pemisahan insulin menggunakan fase balik

Interaksi hidrofobik. Adsorpsi berbasis interaksi hidrofobik bergantung pada interaksi antara sifat hidrofobik molekul dan adsorben. Jenis adsorpsi ini banyak digunakan untuk pemisahan protein. Protein terdiri dari asam amino hidrofilik dan hidrofobik. Dalam larutan protein encer, asam amino hidrofobik terlindung oleh lapisan struktur molekul air. Permukaan adsorben yang bersifat hidrofobik juga dilapisi oleh lapisan struktur air. Pada kondisi seperti itu, residu hidrofobik pada molekul protein tidak mungkin berinteraksi dengan molekul hidrofobik pada permukaan adsorben. Jika garam anti-chaotropic seperti amonium sulfat atau natrium sulfat ditambahkan ke larutan protein, maka molekul air membentuk lapisan terstruktur di sekitar lapisan hidrofobik akan hilang. Demikian pula pada konsentrasi garam anti-chaotropic yang tinggi, lapisan hidrofobik pada permukaan adsorben menjadi terbuka. Pada kondisi tersebut, interaksi protein dengan adsorben disukai. Prinsip adsorpsi berbasis interaksi hidrofobik ditunjukkan pada Gambar 8.9.

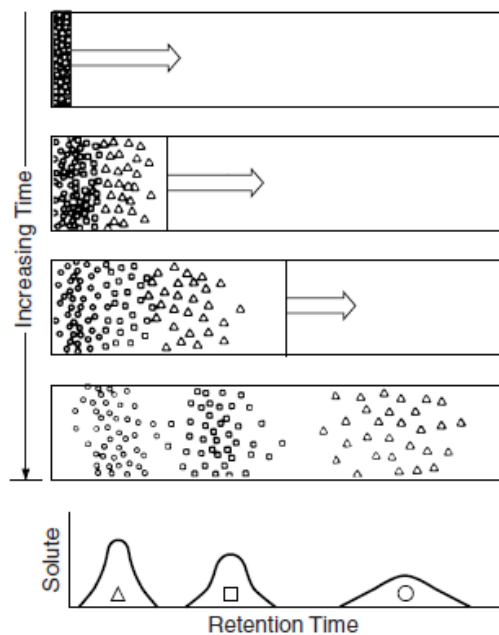


Gambar 10.11. Adsorpsi berdasarkan interaksi hidrofobik

d. Kromatografi

Kromatografi adalah teknik fraksinasi zat terlarut dengan cara mendistribusikan molekul yang akan dipisahkan ke dalam dua fase, yaitu fase diam (atau pengikat) dan fase gerak (atau pembawa). Fase diam merupakan partikel adsorben yang dapat berupa partikel padat, partikel berpori, gel, cairan yang dimobilisasi dalam padatan yang dikemas dalam kolom dalam bentuk unggun tetap. Fase gerak yang membawa campuran zat terlarut yang akan dipisahkan diinjeksikan ke dalam kolom. Kecepatan molekul zat terlarut bergerak melalui kolom bergantung pada interaksi masing-masing molekul dengan fase diam. Jika molekul tidak berinteraksi dengan fase diam maka kecepatan alirnya akan sama dengan fase geraknya. Sebaliknya jika molekul berinteraksi dengan fase diam, semakin tinggi tingkat interaksinya maka akan semakin lambat kecepatannya.

Kromatografi elusi mirip dengan adsorpsi unggun tetap. Namun, dalam adsorpsi unggun tetap zat terlarut ditangkap oleh adsorben dan kemudian dielusi sebagai konsentrat. Dalam kromatografi elusi produk dapat dimurnikan meskipun konsentrasinya kecil.



Gambar 10.12. Konsentrasi pada tahap elusi proses kromatografi. Tiga zat terlarut digambarkan sebagai bulatan, persegi dan segitiga diinjeksikan ke dalam kolom unggun tetap. Ketika pelarut dialirkan dari kiri ke kanan, ketiga zat terlarut bergerak dengan kecepatan yang berbeda karena adanya perbedaan tingkat adsorpsi. Zat terlarut akan keluar dari kolom dengan waktu yang berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan.

Sistem kromatografi

Sistem pemisahan kromatografi terdiri dari kolom, reservoir fase gerak, pompa, injektor sampel, detektor, dan terkadang pengumpul fraksi. Gambar 9.1 menunjukkan pengaturan pemisahan kromatografi sederhana. Berbagai jenis kolom digunakan untuk pemisahan kromatografi (Gambar 10...), yaitu:

- 1) Kolom unggun tetap yang dikemas
- 2) Kolom kapiler yang dikemas
- 3) Kolom terbuka
- 4) Membran
- 5) Monolit

Sedangkan berdasarkan mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi:

- 1) Pertukaran ion
- 2) Fase terbalik
- 3) Interaksi hidrofobik
- 4) Afinitas
- 5) Size exclusion

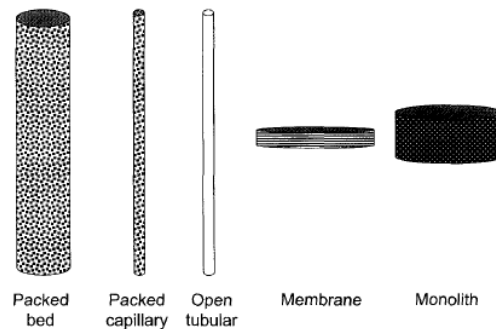
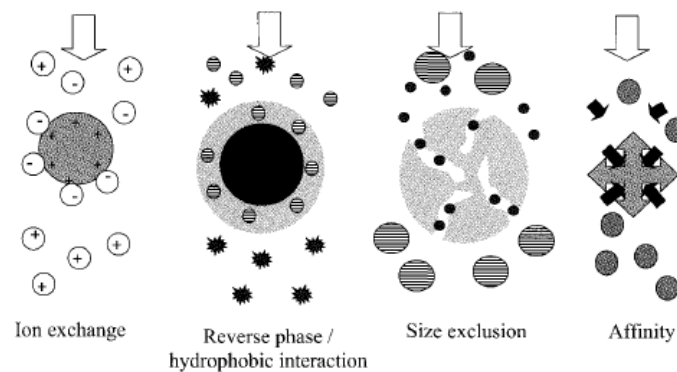


Fig. 9.2 Chromatographic columns

Gambar 10.13. Kolom kromatografi

Empat mekanisme pertama, yaitu pertukaran ion, fase balik, interaksi dan afinitas hidrofobik telah dibahas pada sub bab adsorpsi di atas. Kromatografi pertukaran ion bekerja berdasarkan pada perbedaan interaksi elektrostatik antara zat terlarut dan fase diam sebagai. Kromatografi fase terbalik didasarkan perbedaan kemampuan zat terlarut berpartisi ke dalam fase dian non-polar. Kromatografi interaksi hidrofobik memisahkan molekul berdasarkan perbedaan hidrofobiknya. Kromatografi afinitas bergantung pada pengenalan dan pengikatan molekul target yang sangat spesifik pada ligan yang melekat pada fase diam. Kromatografi eksklusi yang juga sering disebut dengan kromatografi filtrasi gel didasarkan pada penggunaan partikel berpori sebagai fase diam dan zat terlarut dipisahkan berdasarkan ukuran molekulnya. Ketika molekul melintasi kolom kromatografi, molekul dengan ukuran yang kecil akan masuk ke dalam pori-pori media kromatografi (fase diam) sedangkan molekul yang lebih besar tidak dapat masuk ke dalam pori-pori media kromatografi. Akibatnya, molekul yang kecil memerlukan waktu lebih lama dalam melintasi media kromatografi daripada molekul yang besar sehingga terjadi proses pemisahan.



Gambar 10.14. Mekanisme pemisahan pada kromatografi

Fase gerak dipompa ke kolom kromatografi secara kontinyu selama proses pemisahan. Jenis pompa yang digunakan tergantung dari penurunan tekanan di sepanjang kolom. Berdasarkan tekanan operasinya, proses kromatografi dapat dibedakan menjadi:

- 1) Kromatografi tekanan tinggi, biasanya lebih besar dari 1 MPa
- 2) Kromatografi tekanan sedang, biasanya dalam kisaran 0,1 - 1 MPa
- 3) Kromatografi tekanan rendah, biasanya kurang dari 0,1 MPa

Beberapa jenis metode kromatografi yang penting adalah:

- 1) Kromatografi adsorpsi (ADC) didasarkan pada adsorpsi molekul zat terlarut ke partikel padat (fase diam), seperti alumina dan silika gel, dengan gaya van der Waals yang lemah dan interaksi sterik.
- 2) Kromatografi partisi cair-cair (LLC) didasarkan pada koefisien partisi (kelarutan) yang berbeda dari molekul zat terlarut ke dalam fase cair teradsorpsi (fase diam) dan fase gerak. Pada umumnya cairan yang teradsorpsi bersifat nonpolar.
- 3) Kromatografi penukar ion (IEC) didasarkan pada adsorpsi ion (muatan senyawanya) ke dalam partikel resin penukar ion dengan gaya elektrostatis.
- 4) Kromatografi filtrasi gel (pemisahan molekuler) didasarkan pada penetrasi molekul zat terlarut ke dalam pori-pori gel yang berukuran kecil. Pemisahan partikel berdasarkan ukuran molekul dan bentuk molekul zat terlarut. Dikenal juga dengan kromatografi eksklusi ukuran (*size exclusion chromatography*).
- 5) Kromatografi afinitas (AFC) didasarkan pada interaksi spesifik kimiawi antara molekul terlarut dan ligan (molekul fungsional yang terikat secara

kovalen dengan partikel penyangga). Interaksi ligan-zat terlarut sangat spesifik, seperti interaksi enzim-substrat, yang dapat bergantung pada terjadinya ikatan kovalen, ikatan ionik atau ikatan hydrogen. Pengikatan afinitas terjadi secara spesifik berdasarkan bentuk dan ukuran molekul.

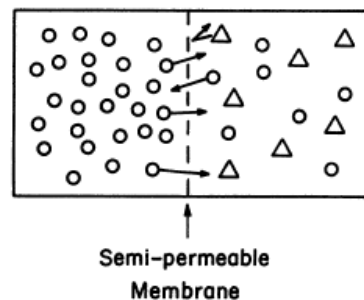
- 6) Kromatografi hidrofobik (HC) didasarkan pada interaksi hidrofobik antara molekul terlarut (misalnya, protein) dan gugus fungsi (misalnya, residu alkil) pada penyangga partikel. Metode ini merupakan jenis kromatografi fase balik yang berdasarkan pada polaritas, dimana fase diam bersifat kurang polar daripada fase geraknya.
- 7) Kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC) didasarkan pada prinsip umum kromatografi. Sebagai pembeda adalah kromatografi berkerja dengan tekanan cairan yang tinggi menggunakan pada kolom yang dimampatkan. Karena cairan bertekanan tinggi (laju aliran cairan tinggi) dan kolom dimampatkan dengan padat, maka HPLC mempunyai resolusi yang tinggi dan cepat.

Kromatografi banyak digunakan untuk pemisahan produk-produk seperti: protein, asam nukleat, lipid, antibiotik, hormon, gula, dll. Pemilihan jenis kromatografi tergantung dari sifat zat terlarut dan tujuan proses pemisahan.

e. Dialisis

Dialisis adalah operasi pemisahan membran yang digunakan untuk menghilangkan zat terlarut dengan MW rendah seperti asam organik ($100 < MW < 500$) dan ion anorganik ($10 < MW < 100$) dari larutan. Contohnya adalah penggunaan membran dialisis untuk menghilangkan urea ($MW = 60$) dalam urin pada alat ginjal buatan (dialisis). Dalam bioteknologi, dialisis dapat digunakan untuk menghilangkan garam dari larutan protein, yang sering digunakan pada proses pelarutan protein yang awalnya berada dalam badan inklusi. Skema membran dialisis digambarkan pada Gambar 10.15. Membran bersifat selektif. Membran dialisis memisahkan dua fase, yaitu fase yang mengandung larutan MW rendah dan MW tinggi. Karena *cut-off* MW membran dialisis sangat kecil maka zat terlarut dengan MW rendah bergerak dari daerah konsentrasi tinggi ke rendah. Pada saat kesetimbangan, potensial kimia zat yang berdifusi pada kedua sisi membran akan sama. Kesetimbangan dialisis didasarkan pada asumsi molekul zat terlarut tidak bermuatan. Jika makromolekul adalah polielektrolit, seperti protein dan asam

nukleat maka keseimbangan muatan makromolekul perlu dipertimbangkan. Kesetimbangan ini dikenal sebagai kesetimbangan Donnan.

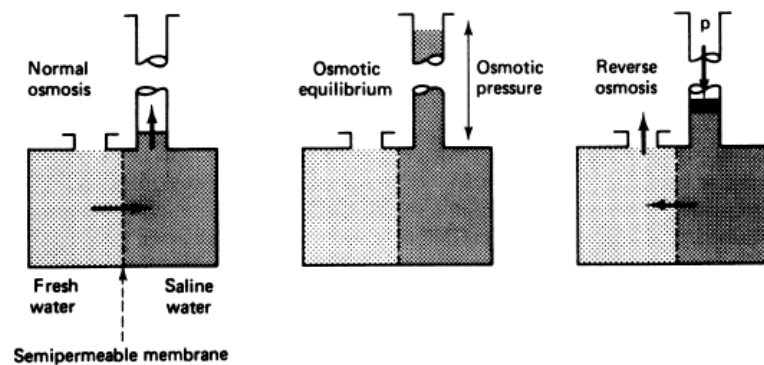


Gambar 10.15. Pemisahan dengan membran dialysis. Molekul dengan MW rendah (komponen O) berdifusi melalui membran dari daerah dengan konsentrasi tinggi ke rendah. Molekul dengan MW besar (Δ) tidak dapat melewati membran.

f. Reverse Osmosis

Osmosis adalah proses perpindahan molekul air dari daerah dengan konsentrasi tinggi ke rendah (contoh: fase air murni berpindah ke fase air yang mengandung garam) ketika kedua fase ini dipisahkan oleh membran selektif. Air melewati membran dengan mudah, sedangkan garam tidak bias melewati membran. Pada kesetimbangan, potensial kimia air harus sama pada kedua sisi membran. Saat air masuk ke dalam larutan garam, tekanannya meningkat.

Dalam *reverse osmosis* (RO), tekanan diterapkan ke fase yang mengandung garam. Akibatnya molekul air (pelarut) terdorong dari daerah konsentrasi rendah ke tinggi sehingga menghasilkan konsentrasi molekul zat terlarut (garam) yang tinggi di satu sisi membran. Tekanan yang dibutuhkan untuk memindahkan pelarut dari fase konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi sama dengan atau sedikit lebih besar dari tekanan osmotik. Ketika tekanan lebih besar daripada tekanan osmotik, aliran pelarut terjadi dalam arah melawan gradien konsentrasi (lihat Gambar 10.16). Pada beberapa aplikasi, membran reverse osmosis dapat dilewati oleh zat terlarut bersama dengan pelarutnya. Perpindahan zat terlarut dapat terjadi secara difusi atau konveksi.



Gambar 10.16. Aliran osmotik menembus membrane yang memisahkan air murni dan larutan garam

Langkah perlakuan akhir produk yang utama dalam pemurnian produk fermentasi adalah kristalisasi dan pengeringan.

g. Kristalisasi

Kristalisasi biasanya merupakan langkah terakhir dalam menghasilkan produk yang sangat murni seperti antibiotik. Kristalisasi beroperasi pada suhu rendah untuk meminimalkan terjadinya degradasi termal produk yang bersifat tidak tahan terhadap panas. Operasi dilakukan pada konsentrasi tinggi oleh karena itu biaya unit rendah dan faktor pemisahan tinggi. Penentuan kondisi optimal kristalisasi ditentukan melalui percobaan, karena diagram fase dan kinetika untuk sistem terkait biasanya tidak tersedia. Kristal dengan kemurnian tinggi diperoleh setelah dilakukan proses penyaringan. Karakteristik dan ukuran kristal dapat mempengaruhi proses filtrasi dan laju pencucian, oleh karena itu proses kristalisasi dan rekoveri merupakan proses yang saling terkait dan harus dipertimbangkan secara bersama-sama dalam optimalisasi proses kristalisasi. Pada proses filtrasi biasanya terdapat tahap pencucian kristal untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel di kristal dan tahap berikutnya adalah proses pengeringan.

h. Pengeringan

Penghilangan pelarut dari produk murni basah (kristal atau zat terlarut) biasanya dilakukan dengan cara pengeringan. Dalam memilih jenis pengeringan, sifat fisik produk, sensitivitas panas dan kadar air akhir yang diinginkan harus dipertimbangkan. Parameter yang mempengaruhi

pengeringan dapat diklasifikasikan dalam empat kategori: sifat fisik sistem padat-cair, sifat intrinsik zat terlarut, kondisi lingkungan pengeringan, dan parameter perpindahan panas.

Jenis pengering yang banyak digunakan untuk mengeringkan produk fermentasi adalah sebagai berikut:

- 1) Pengering rak vakum terdiri dari ruangan dengan pemanas dimana terdapat rak-rak untuk meletakkan nampan yang berisi produk. Sistem pengeringan ini banyak digunakan untuk produk farmasi. Sistem ini sesuai untuk jumlah produk yang sedikit dan berharga mahal, sehingga kehilangan produk dan kerusakan panas harus diminimalkan.
- 2) Pengeringan beku (liofilisasi) adalah metode di mana air dihilangkan dengan cara sublimasi (dari es padat menjadi uap) dari larutan beku. Pembekuan dapat dilakukan baik di luar atau di dalam ruang vakum sebelum pengeringan. Metode ini banyak untuk antibiotik, larutan enzim, dan suspensi bakteri.
- 3) 3. Pengering drum putar kurang baik untuk larutan kristal. Air dihilangkan melalui konduksi dari uap panas ke lapisan tipis dari larutan pada permukaan drum yang berputar. Produk kering selanjutnya dikerok dari drum dengan bantuan pisau pada bagian pembuangan.
- 4) Pengering semprot (spray dryer) melibatkan proses atomisasi dan penyemprotan larutan produk ke dalam ruang yang dialiri udara panas. Adanya udara panas dapat menguapkan cairan sehingga menghasilkan partikel produk padat yang kering. Partikel kering dipisahkan dari gas panas menggunakan siklon. Kelemahan metode ini alat pengering semprot harganya mahal tetapi sangat sesuai untuk pengeringan produk yang tidak tahan terhadap panas.
- 5) Pengering konveyor pneumatik menggunakan aliran udara panas untuk menahan dan mengangkut partikel. Waktu retensi partikel dalam aliran udara biasanya pendek, hanya beberapa detik saja, sehingga sistem ini lebih sesuai untuk penghilangan air yang ada pada permukaan partikel saja, tetapi tidak cocok untuk mengeringkan partikel dimana kandungan air terserap dalam pori-pori partikel sehingga penghilangan air dikendalikan difusi. Sistem konveyor pneumatik sangat cocok untuk material yang peka terhadap panas dan mudah teroksidasi.

C. Latihan Soal

1. Sebutkan tujuan utama dari proses isolasi, pemurnian dan polishing produk dalam bioseparasi
2. Jelaskan pertimbangan-pertimbangan penting dalam pemilihan proses isolasi produk hasil fermentasi
3. Jelaskan prinsip dasar dari ekstraksi pelarut dan ekstraksi dua fase berair
4. Jelaskan jenis-jenis adsorpsi berdasarkan pada interaksi antara adsorben dan molekul target
5. Jelaskan mekanisme pemisahan pada kromatografi size eksklusi

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Gottschalk U (2011) Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry, Elsevier, p 670-681
- Raja Ghos, (2006) Principles Of Bioseparations Engineering, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore
- Selvaraj Raja, Vytla Ramachandra Murty, Varadavenkatesan Thivaharan, Vinayagam Rajasekar, Vinayagam Ramesh (2011) Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review, Science and Technology, 1(1): 7-16
- Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.
- Stanbury P, Whitaker A and Hall SJ (2016) Principles of Fermentation Technology, 3rd edition, Pergamon Press

PERTEMUAN 11

ENZIM

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami klasifikasi dan tata nama enzim
2. Memahami kerja enzim
3. Memahami struktur dan bagian enzim
4. Memahami karakteristik penting enzim
5. Memahami faktor-faktor yang berpengaruh

B. Uraian Materi

1. Klasifikasi dan Tata Nama Enzim

Enzim adalah protein yang dapat bertindak sebagai katalis yang ada dalam semua organisme hidup - mikroorganisme, tumbuhan, hewan, dan manusia. Sebagai katalis, enzim berfungsi sebagai senyawa yang mampu meningkatkan reaksi kimia dalam sistem biologis. Enzim biasanya protein dengan berat molekul tinggi ($15.000 < MW < \text{beberapa juta dalton}$) yang bertindak sebagai katalis. Enzim diklasifikasikan berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis dan substrat yang menjadi tempat kerjanya. Lebih dari 2000 enzim telah diketahui. Enzim diberi nama dengan menambahkan akhiran -ase di akhir nama substrat tempat enzim bekerja, contoh: lipase (mengkatalisis hidrolisis lemak), atau reaksi yang dikatalisis, contoh: alkohol dehidrogenase (mengkatalisis reaksi pelepasan hidrogen). Dengan semakin banyaknya enzim yang ditemukan maka tatanama tersebut menjadi kurang jelas.

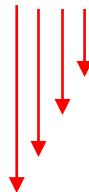
Penamaan enzim menurut *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) dilakukan dengan memberikan awalan EC, berasal dari singkatan *Enzyme Committee*, lalu diikuti oleh 4 digit angka yang berturut-turut menunjukkan kelas, subkelas, sub-subkelas, dan nomor individual pengenalan masing-masing enzim. Enzim diklasifikasikan menjadi enam jenis utama, sesuai dengan reaksi yang dikatalisisnya. Digit pertama menunjukkan kelas enzim. Digit kedua dan ketiga menggambarkan jenis reaksi

yang dikatalisis, dan digit keempat menunjukkan jenis substrat sebenarnya dari reaksi yang dikatalisis. Skema ini sangat berguna untuk menggambarkan dengan jelas berbagai enzim yang memiliki kesamaan fungsi. Sebagai contoh penamaan enzim adalah sebagai berikut:

Nama: heksokinase

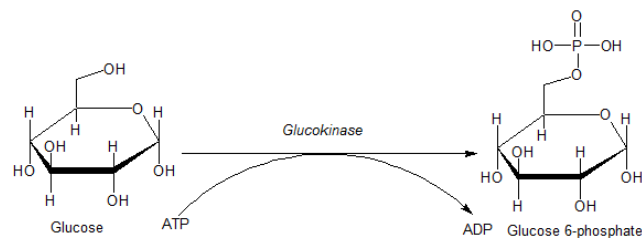
Nama sistematis: ATP:D-hexose 6-phosphotransferase

Kode enzim: EC.2.7.1.1



Enzim yang dimaksud heksokinase
Transfer fosfat
Transferase

Reaksi yang dikatalisis:



Gambar 11.1. Hidrolisis glukosa oleh enzim transferase

Kelas utama enzim dan fungsinya selengkapnya tercantum dalam Tabel 11.1.

Tabel 11.1. Klasifikasi internasional enzim: nomer kode, nama kelas dan reaksi yang dikatalisis (Liu et al., 2013)

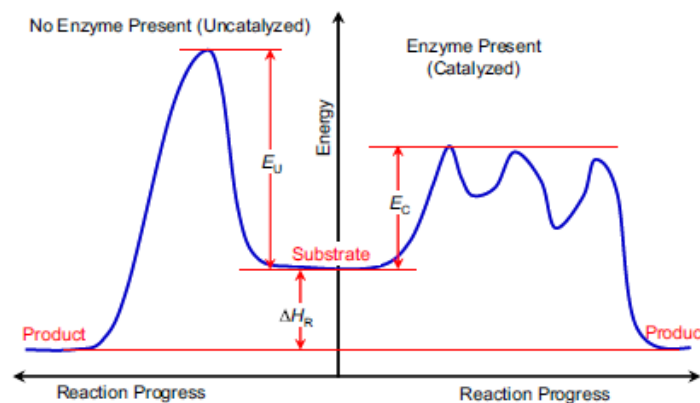
1st Digit (Class)	2nd Digit	3rd Digit	4th
1. Oxidoreductases Transfer of hydrogen or oxygen atoms or electrons from one substrate to another: oxidases or dehydrogenases	Donor of hydrogen or electron 1 Alcohol 2 Aldehyde or ketone 3 Alkene, $-\text{CH}=\text{CH}-$ 4 Primary amine: $\text{CH}-\text{NH}_2$ 5 Secondary amine: $\text{CH}-\text{NH}-$ 6 NADH or NADPH 7 Nitrogenous compound 8 Sulfur group 9 Heme group 10 Diphenols or related 11 Peroxide 12 Hydrogen 13 Single donor with O_2 14 Paired donors, with O_2 15 Acting on superoxide 16 Oxidizing metal ion 17 Acting on CH or CH_2 groups 18 Iron-sulfur-protein 19 Reduced flavodoxin 20 Phosphorous or arsenic 21 on XH and YH to form XY 97 Oxidoreductases 98 Other, using H_2 as reductant 99 Other, using O_2 as oxidant	Acceptor of hydrogen or electron 1 NAD^+ or NADP^+ or peroxidase 2 Cytochrome or heme protein 3 O_2 4 $\text{S}-\text{S}$ 5 Quinone or similar 6 Nitrogenous group 7 Iron-sulfur-protein 8 Flavin 11 Incorporating two O 12 Incorporating one O 98 Other, known 99 Other	
2. Transferases Group transfer excluding hydrogen or oxygen: $\text{AX} + \text{B} \rightarrow \text{BX} + \text{A}$	General type of group 11-Carbon group 2 Aldehyde or ketone 3 Acyl group-COR 4 Glycosyl group 5 Alkyl or aryl, other than methyl 6 Nitrogenous groups 7 Phosphate group 8 Sulfur-containing groups 9 Selenium-containing groups	Nature of group transferred	
3. Hydrolases Catalyzes hydrolysis: $\text{A}-\text{X} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{X}-\text{OH} + \text{HA}$	Type of bond hydrolyzed 1 Ester 2 Glycosylases 3 Ether 4 Peptide 5 C-N bonds other than peptides 6 Acid anhydrides 7 C-C 8 Halide 9 Phosphorus-nitrogen 10 S-N 11 C-phosphorus 12 S-S 13 S-S		

1st Digit (Class)	2nd Digit	3rd Digit	4th
4. Lyases Nonhydrolytic removal of groups with product usually contains double bond	Type of bond broken 1 C-C 2 C-O 3 C-N 4 C-S 5 C-halide 6 P-O 99 Other	Group removed 1 Carboxyl 2 Aldehyde 3 Ketoacid	
5. Isomerases	Type of reaction 1 Racemization or epimerization 2 <i>cis-trans</i> isomerizations 3 Intramolecular oxidoreductases 4 Intramolecular transfer reactions 5 Intramolecular lyases 99 Other	Type of molecule 1 Amino acids 2 Hydroxyacids 3 Carbohydrates	
6. Ligases Synthesis of bonds with breaking down of ATP or nucleoside triphosphates	Type of bond formed 1 C-O 2 C-S 3 C-N 4 C-C 5 Phosphoric ester 6 N-metal		

2. Bagaimana Enzim Bekerja?

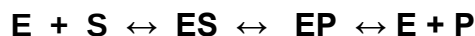
Enzim bekerja dengan menurunkan energi aktivasi reaksi yang dikatalisis dengan mengikat substrat dan membentuk kompleks enzim-substrat. Enzim tidak mempengaruhi perubahan energi bebas atau konstanta kesetimbangan. Gambar 11.2 mengilustrasikan kerja enzim yaitu dengan menurunkan energi aktivasi. Contoh, energi aktivasi untuk penguraian hidrogen peroksida bervariasi tergantung dari jenis katalisnya. Energi aktivasi E dari reaksi tanpa katalis pada 20°C adalah 75 kJ/mol, sedangkan nilai E yang dikatalisis dengan katalis kimia (dengan koloid platinum) adalah 54 kJ/mol dan yang dikatalisis secara enzimatik (katalase) adalah 29 kJ/mol. Artinya, katalase mempercepat laju reaksi dengan faktor sekitar 10^8 kali jika dibanding dengan reaksi yang dikatalisis dengan katalis kimia. Perlu diingat bahwa perubahan energi aktivasi yang relatif kecil dapat menghasilkan perubahan laju reaksi yang besar karena hubungan antara laju reaksi dengan energi aktivasi adalah eksponensial. Pada kasus ini perbandingan laju reaksi yang dikatalisis enzimatik dengan kimiawi adalah:

$$Rasio = \frac{e^{\frac{29000}{-8,314 \times 293}}}{e^{\frac{75000}{-8,314 \times 293}}} = 1,59 \times 10^8$$



Gambar 11.2. Energi aktivasi dari reaksi yang dikatalisis enzim dan reaksi yang tanpa katalis

Penurunan energi aktivasi pada reaksi enzimatik dapat terjadi karena reaksi diawali dengan pembentukan fase transisi kompleks enzim-substrat yang memerlukan energi aktivasi lebih rendah dibandingkan reaksi tanpa enzim. Mekanisme reaksi enzimatik dapat digambarkan sebagai berikut:



Enzim berinteraksi dengan substrat membentuk suatu kompleks enzim-substrat sehingga terjadi suatu reaksi. Kompleks enzim-substrat selanjutnya bereaksi membentuk kompleks enzim-produk. Pada tahap akhir enzim melepaskan produk dan kembali ke bentuk semula.

Substrat terikat ke bagian tertentu dari enzim yang dikenal sebagai situs aktif. Cara interaksi enzim-substrat (ES) berbeda untuk enzim yang berbeda. Interaksi antara enzim dan substrat biasanya terjadi melalui gaya yang lemah. Ketika substrat memasuki situs aktif enzim, maka awalnya substrat akan berinteraksi dengan enzim melalui suatu gaya nonkovalen. Gaya nonkovalen ini bertanggung jawab terhadap pengikatan substrat pada awal interaksi sehingga dapat menurunkan energi aktivasi reaksi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 11.2. Jenis gaya nonkovalen yang dapat terlibat antara lain:

- Interaksi elektrostatik
- Gaya van der Waals
- Ikatan hidrogen
- Gaya hidrofobik

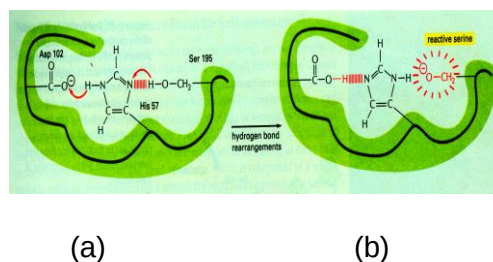
Dalam kebanyakan kasus, gaya *van der Waals* dan ikatan hidrogen yang banyak bertanggung jawab atas pembentukan kompleks ES.

a. Karakteristik Sisi Aktif Enzim

Enzim merupakan protein yang berukuran besar. Sisi aktif enzim hanya merupakan bagian kecil dari protein enzim tersebut. Sisi aktif enzim merupakan suatu cekungan yang bersifat 3 dimensi yang dapat memberikan lingkungan mikro yg sesuai untuk terjadinya suatu reaksi kimia. Substrat terikat pada sisi aktif dengan interaksi / ikatan yang lemah. Spesifitas enzim dipengaruhi oleh asam amino yang menyusun sisi aktif suatu enzim. Sisi aktif mempunyai 2 bagian yang penting, yaitu:

- 1) Bagian yang mengenal substrat dan kemudian mengikatnya
- 2) Bagian yang mengkatalisis reaksi, setelah substrat diikat oleh enzim

Asam amino yang membentuk kedua bagian tersebut tidak harus berdekatan dalam urutan secara linear, tetapi dalam konformasi 3D mereka berdekatan.



Gambar 11.3. Sisi aktif enzim yang menunjukkan (a) bagian yang mengikat substrat dan (b) bagian yang mengkatalisis reaksi serta asam amino yang terlibat

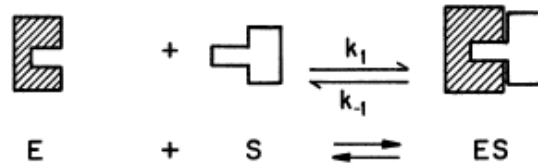
b. Teori yang Menjelaskan Kerja Enzim

Substrat adalah molekul yang relatif kecil dan cocok dengan bagian tertentu dari molekul enzim, yang merupakan molekul protein dengan ukuran yang jauh lebih besar. Interaksi antara enzim dan substrat dapat dijelaskan dengan dua teori, yaitu: teori gembok dan kunci (*lock and key theory*) dan teori kecocokan terinduksi (*induced fit theory*).

Teori Gembok dan Kunci

Model paling sederhana untuk menggambarkan interaksi ini adalah model gembok-dan-kunci, di mana enzim mewakili gembok dan substrat mewakili kunci, seperti yang ditampilkan pada Gambar. 11.4. Model ini

mampu menerangkan spesifitas enzim tetapi tidak dapat menjelaskan stabilitas fase transisi enzim, karena enzim digambarkan sebagai gembok dengan karakteristik yang rigid/kaku.



Gambar 11.4. Skema model gembok-kunci untuk reaksi enzimatik

Teori *Induced fit model*

Model kecocokan terinduksi diusulkan oleh Daniel Koshland pada tahun 1958. Model kecocokan terinduksi merupakan model interaksi enzim-substrat yang menjelaskan bahwa hanya substrat yang tepat yang mampu mendorong penyesuaian (penyesuaian) yang tepat dari situs aktif sehingga akan memungkinkan enzim untuk melakukan fungsi katalitiknya. Hal ini menunjukkan enzim bersifat fleksibel dimana situs aktif terus berubah sampai substrat benar-benar terikat, sehingga bentuk akhir dan muatan enzim sesuai dengan yang diinginkan. Model ini dapat menjelaskan dengan lebih baik terhadap bentuk transisi kompleks enzim-substrat dari pada model gembok dan kunci.



Gambar 11.5. Model hipotetik *induced fit*

3. Karakteristik Penting Enzim

Enzim memiliki karakteristik yang penting, yaitu:

a. Sifat Katalitik

Enzim memiliki kemampuan katalitik yang tinggi sehingga dapat mempercepat laju reaksi hingga ribuan kali dibanding dengan reaksi tanpa

katalis. Enzim aktif dalam jumlah yang sangat kecil sehingga hanya memerlukan sedikit enzim untuk mengubah substrat yang banyak. Jumlah *turnover* enzim berkisar antara 0,5 sampai 600.000. *Turn over number* adalah jumlah molekul substrat yang dapat diubah oleh satu molekul enzim per detik ketika situs aktifnya jenuh dengan substrat. Enzim tidak berubah setelah reaksi selesai. Enzim meningkatkan laju reaksi tanpa merubah letak kesetimbangan kimianya.

b. Spesifisitas

Kerja enzim sangat spesifik. Enzim tertentu hanya dapat bekerja pada substrat tertentu saja. Spesifitas enzim dapat terjadi didasarkan pada hal-hal sebagai berikut: (a) *Spesifisitas ikatan*: disebut juga sebagai spesifisitas relatif. Kerja enzim spesifik terhadap suatu ikatan. Contoh: peptidase spesifik atau ikatan peptide dan lipase spesifik untuk ikatan ester dalam lipid. (b) *Spesifisitas gugus*: disebut juga kekhususan struktural. Kerja enzim spesifik untuk suatu gugus tertentu. Contoh: pepsin menghidrolisis ikatan peptida dengan gugus amino dari asam amino aromatik. (c) *Spesifisitas substrat*: disebut spesifisitas absolut. Enzim hanya bekerja pada substrat tertentu. Contoh: arginase hanya bekerja pada arginin; karbonat anhidrase hanya bekerja pada asam karbonat. (d) *Spesifitas optik*: disebut juga spesifisitas stereo. Ini adalah spesifisitas tertinggi yang ditunjukkan oleh suatu enzim. Enzim tidak hanya spesifik terhadap substrat tetapi juga terhadap konfigurasi optiknya. Contoh: L-asam amino oksidase hanya bekerja pada asam L-amino, bukan pada asam D-amino. Demikian pula, alfa-amilase hanya bekerja pada ikatan glikosidik alfa-1,4 dari pati dan glikogen dan tidak mampu menghidrolisis ikatan glikosidik beta-1,4 dari selulosa. (e) *Spesifisitas ko-faktor*: Ini menunjukkan bahwa enzim tidak hanya spesifik untuk substrat tetapi juga spesifik untuk ko-faktornya. (f) *Kekhususan geometris*: Dalam hal ini kerja enzim tidak terlalu spesifik. Beberapa enzim dapat bekerja terhadap beberapa jenis substrat serupa yang memiliki struktur geometri yang mirip. Contoh: alkohol dehidrogenase dapat mengoksidasi metanol dan n-propanol menjadi aldehida.

c. Reversibilitas

Sebagian besar reaksi yang dikatalisis enzim bersifat reversibel. Reversibilitas reaksi tergantung pada kebutuhan sel. Dalam beberapa kasus terdapat enzim yang bekerja secara terpisah untuk reaksi maju dan mundur.

Terdapat juga beberapa reaksi yang dikatalisis enzim bersifat tidak reversibel.

d. Sensitivitas Terhadap Panas, Suhu Dan pH:

Enzim sangat sensitif terhadap panas dan suhu atau bersifat termolabil. Enzim tidak aktif pada suhu yang sangat rendah. Aktivitas enzim meningkat dengan kenaikan suhu hingga tingkat tertentu. Umumnya pada suhu yang tinggi ($> 60^{\circ}\text{C}$), enzim akan rusak atau terdenaturasi. Stabilitas enzim juga dipengaruhi oleh pH. Denaturasi enzim juga dapat terjadi karena tinggi atau rendahnya pH. Pada pH yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan ionisasi pada sisi aktif enzim sehingga dapat menyebabkan enzim menjadi tidak aktif. Enzim akan bekerja dengan baik pada suhu dan pH yang optimum.

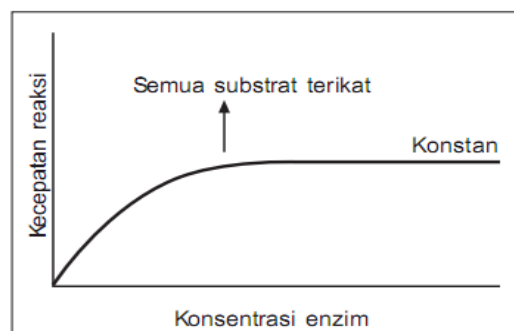
e. Kemampuan mengatur

Di dalam sel, aktifitas enzim dapat dikontrol sesuai dengan kebutuhan organisme itu sendiri. Pengaturan aktifitas enzim dapat terjadi dengan adanya activator atau inhibitor yang terdapat pada enzim alosterik. Contoh: enzim yg mengkatalisis reaksi pertama pada suatu siklus biosintesis biasanya dihambat oleh produk akhirnya (*feedback inhibition*).

4. Faktor-Faktor Berpengaruh Terhadap Aktivitas Enzim

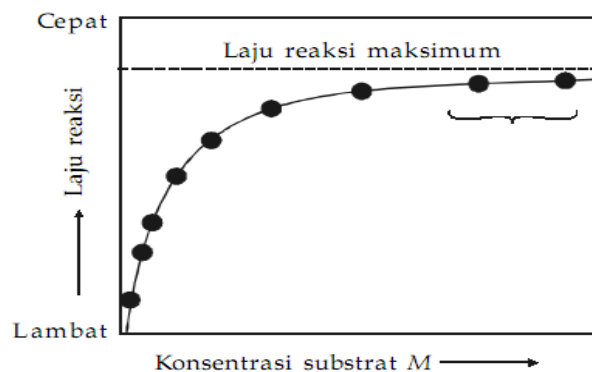
Beberapa faktor yang mempengaruhi aktifitas enzim adalah: konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, adanya inhibitor atau aktivator, suhu, dan pH.

- a. Konsentrasi enzim. Secara umum penambahan jumlah enzim akan meningkatkan laju reaksi. Jika jumlah enzim telah melebihi jumlah maksimum yang dibutuhkan untuk bereaksi dengan substrat maka penambahan enzim tidak lagi akan meningkatkan laju reaksi (Gambar 11.6).



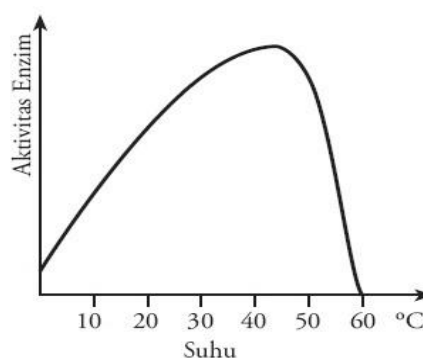
Gambar 11.6. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi

- b. Konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang rendah, sisi aktif enzim belum terisi sepenuhnya oleh substrat, oleh karena itu peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi. Laju reaksi maksimum tercapai jika sisi aktif enzim sudah terisi semuanya oleh substrat. Pada keadaan ini peningkatan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju reaksi (Gambar 11.7).



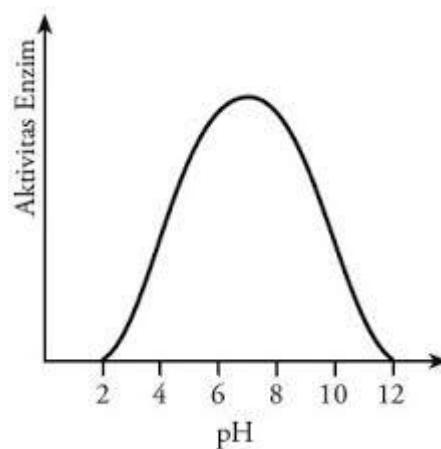
Gambar 11.7. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi

- c. Pengaruh suhu. Seperti kebanyakan reaksi kimia, laju reaksi yang dikatalisis enzim meningkat seiring dengan kenaikan suhu. Kenaikan suhu 10°C akan meningkatkan aktivitas sebagian besar enzim sebesar 50 hingga 100%. Perubahan suhu reaksi sebesar 1°C atau 2°C dapat menyebabkan perubahan 10 hingga 20% aktivitas enzim. Enzim bekerja baik pada suhu optimum. Pada umumnya suhu optimum untuk kerja enzim antara $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$, dengan pengecualian beberapa enzim. Namun perlu diingat pada suhu yang tinggi enzim dapat rusak terdenaturasi. Sebagian enzim dengan cepat terdenaturasi pada suhu di atas 40°C .



Gambar 11.8. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

- d. Pengaruh pH. Sebagian besar laju reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi H^+ . Seperti halnya suhu, enzim akan bekerja optimum pada kondisi pH tertentu. pH optimal kebanyakan enzim berada pada rentang 6-8. Namun terdapat beberapa pengecualian, sebagai contoh, enzim pepsin bekerja optimum pada pH 2 di lambung untuk memecah protein menjadi pepton. Setiap fluktuasi skala pH dari kerja optimum enzim dapat menyebabkan ionisasi gugus-R asam amino sehingga menurunkan aktivitas protein. Adakalanya perubahan pH menyebabkan reaksi sebaliknya, misal pada pH 7,0 fosforilase memecah pati menjadi glukosa 1-fosfat sedangkan pada pH 5 terjadi reaksi sebaliknya.



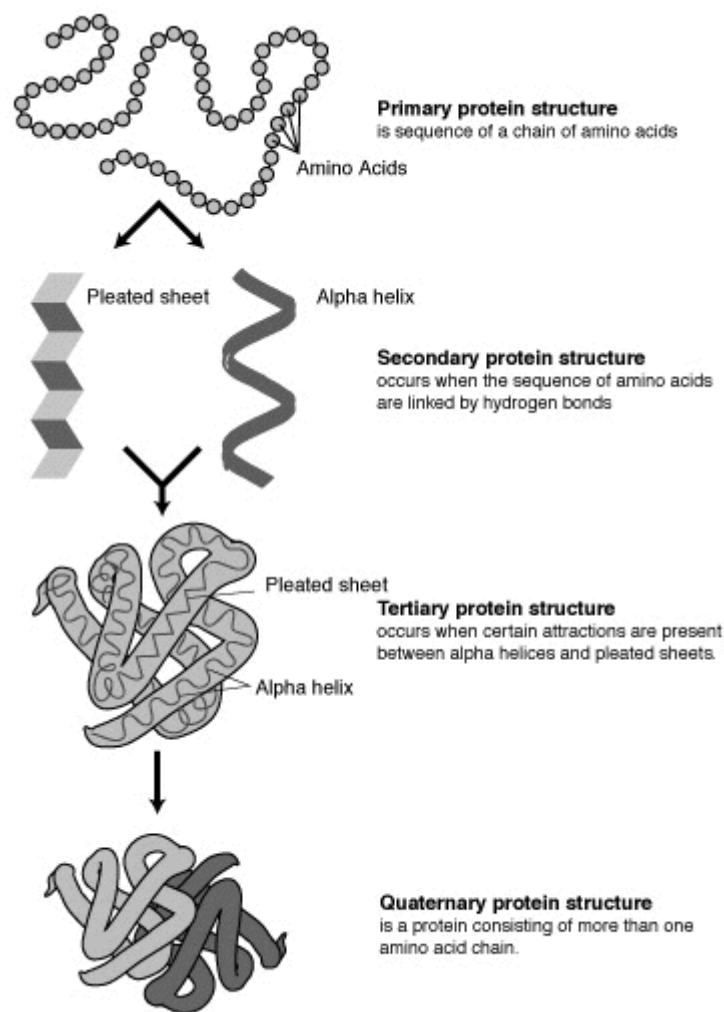
Gambar 11.9. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

- e. Adanya inhibitor atau aktifator. Kerja enzim dapat dihambat oleh senyawa inhibitor. Inhibitor enzim dapat mengubah kerja katalitik enzim yang dapat memperlambat, ataupun menghentikan katalisis. Secara umum penghambatan enzim terdiri dari kompetitif, non-kompetitif dan un-kompetitif. Pada beberapa reaksi enzimatik akumulasi produk dapat menurunkan laju reaksi enzim. Jika reaksi dihambat oleh produk maka penghilangan produk dari sistem reaksi dapat meningkatkan laju reaksi. Sebaliknya laju reaksi dapat ditingkatkan oleh senyawa aktifator. Beberapa jenis ion logam dan vitamin dapat bertindak sebagai aktivator.

5. Struktur dan Bagian Enzim

Struktur protein dapat dijelaskan dalam empat tingkat yang berbeda, yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuaterner. Struktur primer merupakan

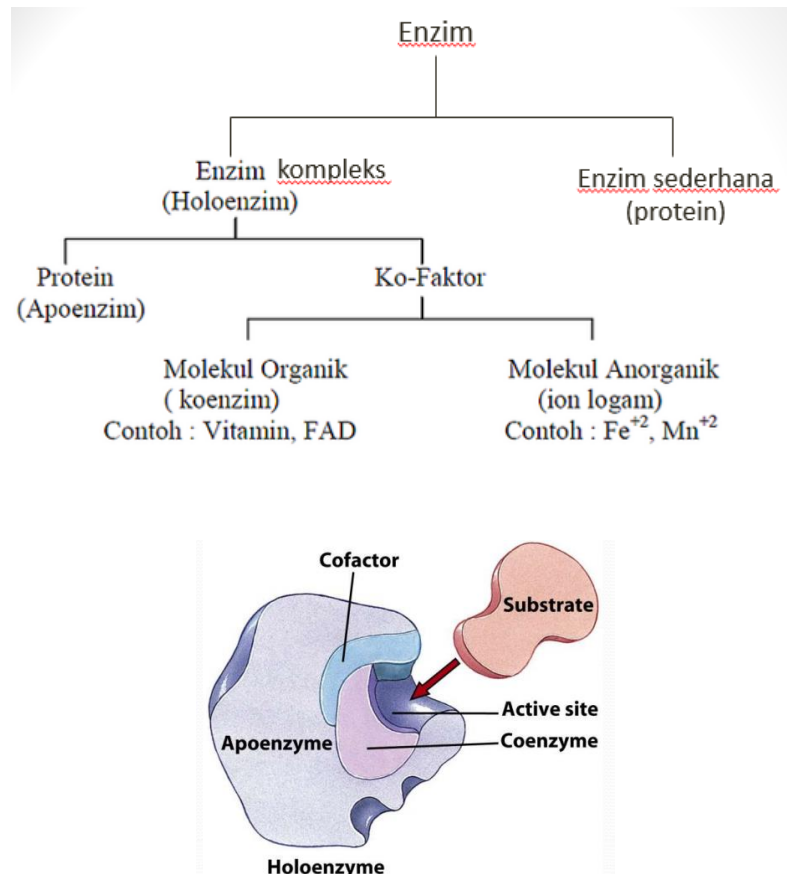
struktur utama enzim yang terdiri dari α -asam amino yang dihubungkan bersama melalui ikatan amida (peptida) membentuk rantai polipeptida. Struktur sekunder protein menggambarkan struktur rantai polipeptida lokal teratur dalam rantai utama, contohnya adalah struktur heliks alfa atau lembaran beta. Struktur tersier protein adalah struktur tiga dimensi yang dibentuk dari struktur-struktur sekunder yang melipat bersama. Struktur kuartener protein merupakan gabungan dari satu atau lebih rantai polipeptida yang beroperasi sebagai satu satuan. Gambar struktur enzim ditampilkan pada Gambar 11.10.



Gambar 11.10. Struktur (a) primer, (b) sekunder, (c) tersier dan (d) kuartener dari protein (Sumber: <https://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Protein-structure.png>)

Struktur enzim terdiri dari beberapa bagian, yaitu: holoenzim, apoenzim dan kofaktor. Beberapa enzim protein memerlukan gugus nonprotein yang

sangat terkait dengan aktivitas enzim. Gugus nonprotein dapat berupa kofaktor yang terikat kuat oleh enzim, dikenal dengan gugus prostetik, berupa ion-ion anorganik seperti ion logam Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} dll atau kofaktor yang tidak terikat dengan kuat, disebut dengan koenzim, seperti molekul organik kompleks, NAD, FAD, CoA, atau vitamin. Enzim yang mengandung gugus nonprotein disebut holoenzim. Bagian-bagian enzim digambarkan seperti pada Gambar 11.11.



Gambar 11.11. Bagian-bagian dari struktur enzim.

C. Latihan Soal

1. Jelaskan mekanisme kerja enzim dalam mempercepat jalannya suatu reaksi.
2. Jelaskan karakteristik-karakteristik penting dari enzim.
3. Jelaskan teori yang menjelaskan interaksi antara enzim dan substrat.

4. Jelaskan empat tingkatan struktur dari enzim serta bagian-bagian penting dari enzim.
5. Jelaskan faktor-faktor yang berpengaruh terhadap aktifitas enzim.

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) *Biochemical Engineering*, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Shuler ML dan Kargi F (2001) *Bioprocess Engineering*, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.
- Shijie Liu and Suny Esf, (2013), *Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*, First Edition 2013, Elsevier
- Luna, C.; Luna, D.; Calero, C; Bautista, F. M.; Romero, A.A.; Posadillo, A.; Verdugo, C. 2016. Chapter 7. Biochemical catalytic production of biodiesel. *Handbook of Biofuels Production* (R. Luque, C. Sze Ki Lin, K. Wilson, J. Clark. Woodhead Publishing (Elsevier). Pages 165-199. DOI: 10.1016/B978-0-08-100455-5.00007-2

PERTEMUAN 12

KINETIKA ENZIM

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami kinetika reaksi enzimatis
2. Memahami jenis-jenis inhibisi enzim dan mekanismenya

B. Uraian Materi

1. Kinetika Reaksi Enzimatis

Enzim adalah katalis biologis yang berperan dalam meningkatkan laju reaksi. Enzim merupakan komponen penting dari sel karena tanpa enzim banyak reaksi biologis yang berjalan sangat lambat untuk mendukung kehidupan sel. Enzim bersifat spesifik, hanya dapat bereaksi dengan jenis reaktan tertentu, yang dikenal sebagai substrat. Pada bab ini akan dipelajari kinetika enzim yaitu studi tentang laju reaksi enzimatis dan kondisi yang mempengaruhinya. Kinetika enzim berkaitan dengan deskripsi matematis dari laju reaksi enzimatis dan pengukuran nilai konstanta-konstanta yang terkait.

Seperti dijelaskan pada bab sebelumnya, enzim merupakan protein dan biasanya memiliki struktur tersier globular. Strukturnya sangat spesifik dan mempunyai bagian sisi aktif yang merupakan tempat terjadinya reaksi. Pada sisi aktif ini akan terjadi pengikatan substrat oleh enzim sehingga membentuk kompleks enzim-substrat (ES) melalui suatu ikatan yang lemah. Oleh karena pada akhir reaksi kompleks ES akan terdisosiasi dan enzim akan diperoleh kembali seperti keadaan semula.

a. Langkah Pembatas Laju Reaksi

Langkah pembatas laju dari setiap reaksi adalah langkah yang berjalan paling lambat, dan langkah ini yang menentukan laju reaksi secara keseluruhan. Dalam reaksi enzimatis, konversi kompleks ES menjadi produk pada umumnya merupakan langkah pembatas, oleh karena itu laju reaksi enzimatis secara keseluruhan tergantung pada langkah ini. Disosiasi kompleks menjadi produk berbanding lurus dengan konsentrasi kompleks ES,

dimana konsentrasinya akan selalu berubah selama reaksi berlangsung, sehingga laju pembentukan produk juga berubah. Ketika reaksi mencapai kesetimbangan (steady state phase/fase keadaan tunak) konsentrasi ES (dan juga laju reaksi) akan relatif konstan.

b. Kinetika Reaksi

Ketika enzim ditambahkan ke substrat, reaksi terjadi dalam tiga tahap dengan kinetika yang berbeda:

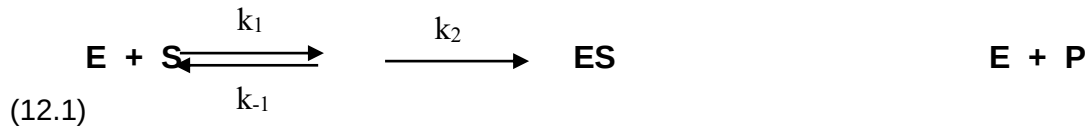
Fase	Konsentrasi ES	Laju pembentukan produk
Sebelum keadaan tunak	Pembentukan kompleks ES terjadi sangat cepat	Pada awalnya laju lambat, namun setelah kompleks ES terbentuk laju meningkat dengan cepat
Keadaan tunak (kesetimbangan)	Konsentrasi ES konstan dimana laju pembentukan kompleks sama dengan laju peruraiannya	Laju konstan dan lebih tinggi dari fase sebelum tunak
Setelah keadaan tunak	Substrat mulai habis sehingga laju pembentukan kompleks melambat	Laju lambat karena pembentukan kompleks ES menurun disebabkan oleh substrat mulai habis

Fase sebelum keadaan tunak sangat singkat sehingga sulit diukur dan selanjutnya terjadi keadaan tunak. Keadaan ini yang banyak digunakan untuk menyatakan kinetika enzim.

c. Kinetika Michaelis-Menten

Kinetika Michaelis-Menten disebut juga dengan kinetika saturasi adalah model kinetika enzim yang menjelaskan bagaimana laju reaksi bergantung pada konsentrasi enzim dan substrat. Sebagian besar reaksi enzimatik mengikuti kinetika Michaelis-Menten. Mari kita pertimbangkan

reaksi di mana enzim (E) mengikat substrat (S) secara reversibel membentuk kompleks enzim-substrat (ES), yang kemudian bereaksi secara ireversibel untuk membentuk produk (P) dan melepaskan enzim lagi.



Asumsi yang berlaku adalah:

- Reaksi pembentukan kompleks berjalan dengan cepat;
- Reaksi balik pada reaksi 2 diabaikan (irreversibel);
- Akumulasi produk tidak berpengaruh terhadap reaksi 1

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (12.2)$$

k_1 = konstanta laju pembentukan kompleks ES

k_{-1} = konstanta laju reaksi pemecahan kompleks ES ke E bebas

$k_2 = k_{\text{cat}}$ = konstanta laju pembentukan P dari kompleks ES

Laju pembentukan produk dapat dinyatakan dengan

$$v_P = v_2 = k_2[ES] \quad (12.3)$$

$$v_{ES} = v_1 - v_2 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (12.4)$$

Selama reaksi enzim tidak habis dan keadaan awal = akhir

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (12.5)$$

Dimana:

v = laju reaksi

E_0 = konsentrasi enzim awal

E = konsentrasi enzim

Untuk menurunkan persamaan kinetiknya, dua pendekatan model dapat digunakan, yaitu:

1. Keseimbangan reaksi yang cepat tercapai
2. *Pseudo-steady state*

Keseimbangan reaksi yang cepat tercapai



$$0 = r_1 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad (12.7)$$

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (12.8)$$

Substitusi pers (12.7) ke (12.8):

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (12.9)$$

Substitusi pers (12.9) ke (12.3):

$$v_P = k_2[ES] = \frac{k_2[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (12.10)$$

$v_{\max}$ terjadi jika seluruh sisi aktif enzim berikatan dengan substrat membentuk kompleks.

$$[E_0] = [ES] + [E]$$

$$[E_0] = [ES] \quad (12.11)$$

$$v_{\max} = k_2[E_0] \quad (12.12)$$

Substitusi Pers (12.12) ke Pers (12.10) menjadi:

$$v_P = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (12.13)$$

Pers (12.13) dikenal dengan kinetika Michaelis-Menten, dimana:

v_p = laju pembentukan produk

v_{max} = laju maksimum

$[S]$ = konsentrasi substrat

K_M = konstanta Michaelis-Menten

Asumsi Pseudo-Steady State



Pada keadaan tunak laju pembentukan $[ES]$ = laju penguraian $[ES]$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (12.15)$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_M \quad (12.16)$$

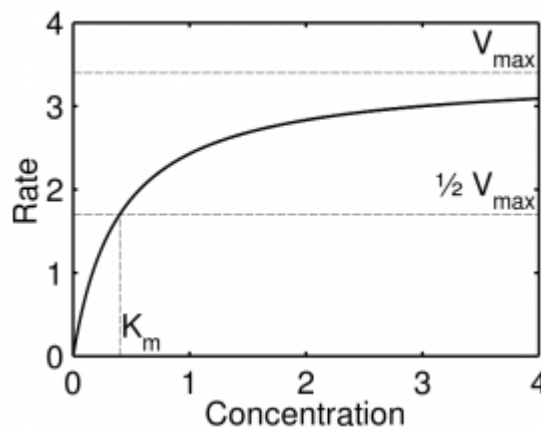
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{K_M} = \frac{[E_0][S] - [ES][S]}{K_M} \quad (12.17)$$

$$K_M[ES] = [E_0][S] - [ES][S] \quad (12.18)$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (12.19)$$

$$v_p = k_2[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (12.13)$$

Persamaan kinetika Michaelis-Menten menjelaskan bagaimana laju awal reaksi, v , dipengaruhi oleh konsentrasi substrat awal, $[S]$. Jika konsentrasi substrat diplotkan terhadap laju reaksi dalam suatu grafik, maka laju reaksi pada awalnya meningkat dengan cepat secara linier dengan meningkatnya konsentrasi substrat (kinetika orde pertama). Selanjutnya laju reaksi mendatar dan peningkatan konsentrasi substrat tidak mempengaruhi laju reaksi karena semua situs aktif enzim sudah jenuh dengan substrat (kinetika orde 0).



Gambar 12.1. Grafik plot antara laju reaksi dengan konsentrasi substrat yang dapat dinyatakan dengan kinetika Michaelis–Menten

Plot laju reaksi terhadap konsentrasi substrat ini berbentuk hiperbola persegi panjang. Oleh karena itu sulit untuk menentukan nilai $v_{\max}$ dan K_M menggunakan grafik ini.

Parameter-Parameter Penting dalam Kinetika Michaelis-Menten

Parameter-parameter penting dalam kinetika Michaelis-Menten adalah:

- 1) $V_{\max}$ – kecepatan maksimum reaksi yang dapat terjadi ketika semua sisi aktif enzim jenuh dengan substrat.
- 2) K_M (mol.L^{-1}). Dikenal sebagai konstanta Michaelis-Menten – konsentrasi substrat di mana laju reaksi adalah 50% dari $v_{\max}$. Dengan asumsi pH, suhu, dan keadaan redoks yang stabil, K_M untuk enzim tertentu adalah konstan. Parameter ini memberikan indikasi kekuatan pengikatan (afinitas) enzim ke substratnya. Kinetika Michaelis–Menten mengasumsikan bahwa k_{cat} sangat rendah jika dibandingkan dengan k_1 dan k_{-1} . Oleh karena itu jika K_M tinggi maka tingkat redisosiasi (k_{-1}) lebih besar dari pada tingkat asosiasi dan menunjukkan bahwa enzim mengikat substrat dengan lemah. Sebaliknya, jika K_M rendah menunjukkan afinitas yang lebih tinggi untuk substrat. Semakin rendah nilai K_M menunjukkan semakin efisien enzim tersebut bekerja menjalankan fungsinya, yaitu hanya membutuhkan konsentrasi substrat yang rendah.
- 3) k_{cat} (s^{-1}). k_{cat} (k katalitik), disebut juga dengan *turnover enzymes number*, merupakan nilai katalitik maksimum dalam menghasilkan pada kondisi substrat jenuh per unit waktu per unit enzim. Semakin besar nilai

k_{cat} , semakin cepat peristiwa katalitik terjadi. Nilai untuk k_{cat} untuk setiap reaksi dapat sangat berbeda, misal $2,5 \text{ s}^{-1}$ untuk rubisco (EC 4.1.1.39) dengan CO_2 sebagai substrat dan 1.150 s^{-1} untuk fumarase (EC 4.2.1.2) dengan fumarat sebagai substrat.

- 4) Efisiensi Enzim ($\text{s}^{-1} (\text{mol.l}^{-1})^{-1}$). Rasio k_{cat}/K_M didefinisikan sebagai efisiensi katalitik dan dapat digunakan sebagai pengukuran untuk spesifisitas substrat. Jika k_{cat} jauh lebih besar dari k_{-1} , proses katalitik berlangsung sangat cepat dan efisiensi enzim bergantung pada kemampuannya untuk mengikat substrat. Berdasarkan hukum difusi, batas atas untuk tingkat tersebut ditentukan oleh frekuensi tumbukan antara substrat dan enzim, yaitu antara 10^8 dan 10^9 . Beberapa enzim sebenarnya memiliki efisiensi yang mendekati kisaran ini, menunjukkan bahwa mereka memiliki efisiensi yang hampir sempurna, misalnya fumarase, $2,3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}(\text{mol.l}^{-1})^{-1}$.

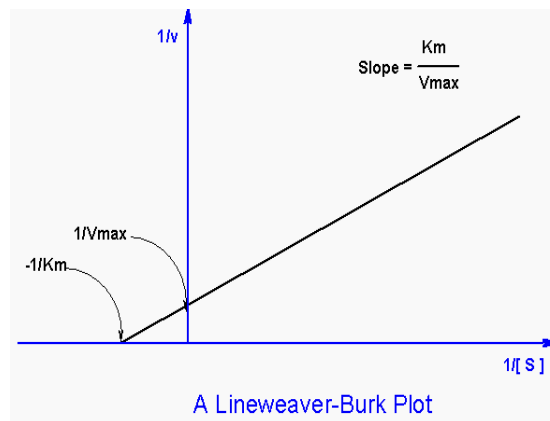
Plot Lineweaver-Burk

Guna memudahkan mencari parameter v_{max} dan K_M maka digunakan plot Lineweaver-Burk, yang memplot nilai kebalikan dari laju reaksi ($1/v$) terhadap kebalikan dari konsentrasi substrat ($1/[S]$). Plot ini menghasilkan garis lurus dan memberikan interpretasi yang lebih mudah, dimana perpotongan garis dengan sumbu y merupakan nilai $1/v_{max}$ dan perpotongan dengan sumbu x merupakan nilai $1/K_M$. Plot Lineweaver-Burk juga berguna ketika menentukan jenis penghambatan enzim yang ada dengan membandingkan pengaruhnya terhadap K_M dan v_{max} . Persamaan plot Lineweaver-Burk yang diberikan oleh persamaan (20). Dari pers (12.13):

$$v_p = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v_p} = \frac{K_M}{v_{max}[S]} + \frac{[S]}{v_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{v_p} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (12.20)$$



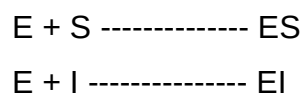
Gambar 12.2. Plot *lineweaver-Burk*

2. Inhibisi Enzim

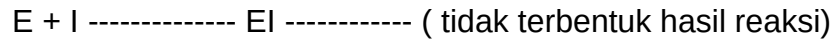
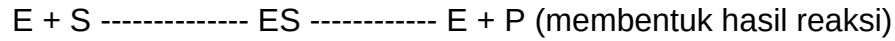
Molekul yang mampu memperlambat atau mengurangi aktivitas enzim disebut inhibitor. Inhibisi atau penghambatan kerja enzim didefinisikan sebagai penghambatan yang menurunkan aktivitas atau laju reaksi enzim yang terjadi karena adanya pengikatan inhibitor ke situs katalitik atau regulasi pada enzim, atau dalam kasus inhibisi tidak kompetitif, ke kompleks enzim-substrat. Berdasarkan sifatnya inhibisi enzim dibagi menjadi 2 yaitu inhibisi reversibel dan irreversibel. Penghambatan ireversibel hampir selalu melibatkan ikatan kovalen zat beracun yang secara permanen menonaktifkan enzim. Sebaliknya, penghambatan reversibel melibatkan pengikatan inhibitor nonkovalen ke enzim yang mengakibatkan penurunan sementara aktivitas enzim. Terdapat tiga mekanisme penting dalam penghambatan enzim secara reversible, yaitu: penghambatan kompetitif, nonkompetitif, dan tidak kompetitif. Mekanisme ini akan dibahas di bawah ini menggunakan contoh sederhana.

a. Penghambatan Kompetitif

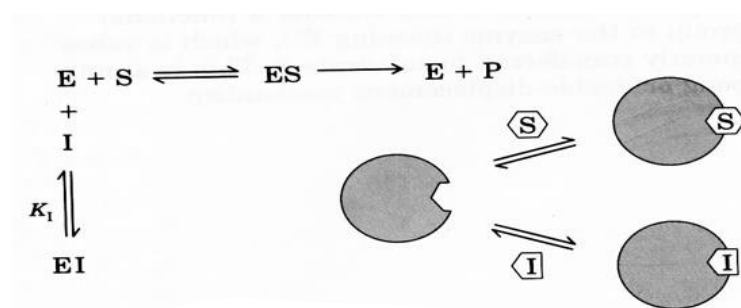
Inhibitor kompetitif biasanya merupakan molekul analog yang mirip dengan substrat. Molekul inhibitor dapat membentuk kompleks, yaitu kompleks enzim-inhibitor (EI) melalui pengikatan inhibitor dengan bagian sisi aktif enzim. Dengan demikian terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap sisi aktif enzim melalui reaksi sebagai berikut :



Inhibitor ini menghalangi terbentuknya kompleks ES dengan cara membentuk kompleks EI sehingga produk (P) tidak terbentuk.



Dengan demikian adanya inhibitor menyebabkan terjadinya persaingan dalam berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks ES dan hal ini menyebabkan berkurangnya kecepatan reaksi. Mekanisme penghambatan kompetitif diilustrasikan pada Gambar 12.3.



Gambar 12.3. Inhibisi kompetitif

Dimana k_1 dan k_{-1} adalah konstanta laju reaksi asosiasi dan redisosiasi untuk kompleks enzim-substrat dan k_2 dan k_{-2} adalah konstanta asosiasi dan reaksi redisosiasi antara enzim dan inhibitor (I). Konstanta laju asosiasi dan redisosiasi untuk kompleks enzim- inhibitor dapat digabungkan dalam satu suku K_I , konstanta disosiasi untuk inhibitor dapat dinyatakan sebagai berikut:

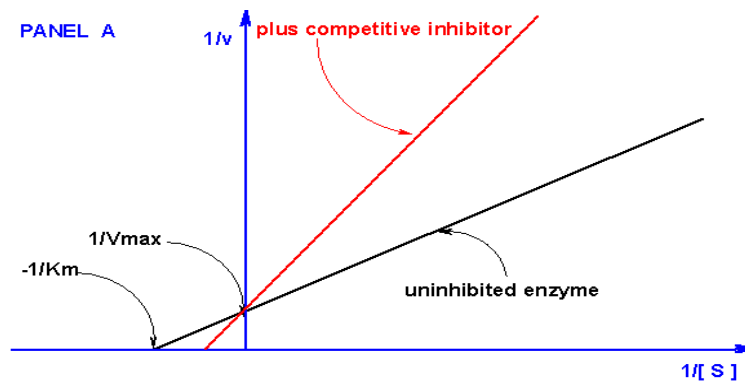
$$K_I = \frac{[E][I]}{EI} \quad (12.21)$$

Karena beberapa enzim mengikat inhibitor, maka persamaan yang menggambarkan total jumlah enzim adalah:

$$[E] = [E_0] - [ES] - [EI] \quad (12.22)$$

$$v_p = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (12.23)$$

$$v_p = \frac{v_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (12.24)$$

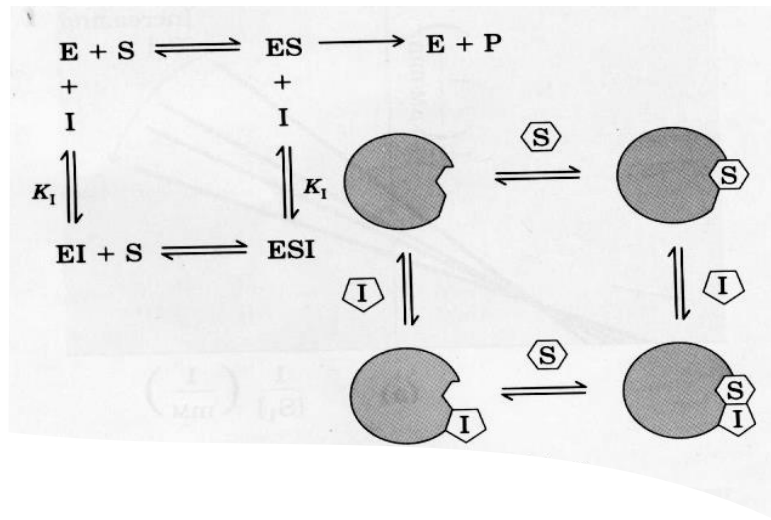


Gambar 12.4. Plot *Lineweaver-Burk* untuk inhibisi kompetitif.

Pada penghambatan kompetitif laju reaksi tidak tergantung pada konsentrasi inhibitor semata, tetapi juga pada konsentrasi substrat. Seperti terlihat pada Pers (24) peningkatan konsentrasi inhibitor akan meningkatkan nilai K_M enzim. Namun pada konsentrasi substrat yang tidak terhitung maka pengaruh inhibitor dapat diabaikan. Oleh karena itu penambahan substrat dalam konsentrasi tinggi dapat menghilangkan pengaruh inhibitor. Efek penghambatan kompetitif dapat dengan mudah dilihat pada plot *Lineweaver-Burk* (Gambar 12.4).

b. Penghambatan Non-kompetitif

Inhibisi non-kompetitif tidak terjadi persaingan antara substrat dan inhibitor. Substrat dan inhibitor masing-masing berikatan dengan enzim pada tempat yang berbeda. Inhibitor dapat berikatan baik dengan molekul enzim bebas maupun dengan kompleks ES yang selanjutnya membentuk kompleks enzim-inhibitor-substrat (EIS). Terbentuknya kompleks EIS menjadikan enzim tidak aktif. Mekanisme inhibitor nonkompetitif diilustrasikan pada Gambar 12.5. Jenis inhibisi ini sangat jarang, namun dapat terjadi pada enzim-enzim multimerik. Inhibitor nonkompetitif dapat menurunkan nilai laju reaksi maksimum (v_{max}) tetapi biasanya tidak mempengaruhi nilai K_M , karena I dan S berikatan pada tempat yang berlainan.



Gambar 12.5. Inhibisi nonkompetitif

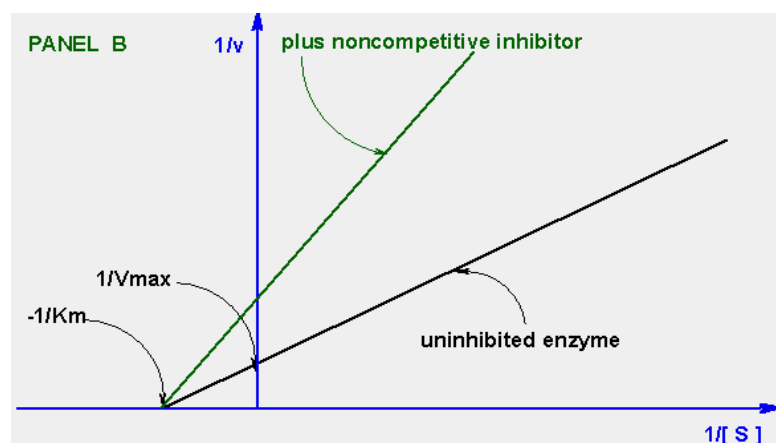
K_{cat} app untuk contoh sederhana ini dapat dinyatakan sebagai:

$$k_{cat}^{app} = \frac{[E]_t A}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (12.25)$$

dan persamaan laju yang dihasilkan adalah

$$v = \frac{k_{cat}^{app} [E]_t A}{(K_m + [A])} \quad (12.26)$$

Seperti dapat dilihat dari persamaan laju, inhibitor nonkompetitif sederhana tidak akan mengubah K_m tetapi akan mengurangi k_{cat} yang terlihat saat konsentrasi inhibitor meningkat (Gbr. 12.6).

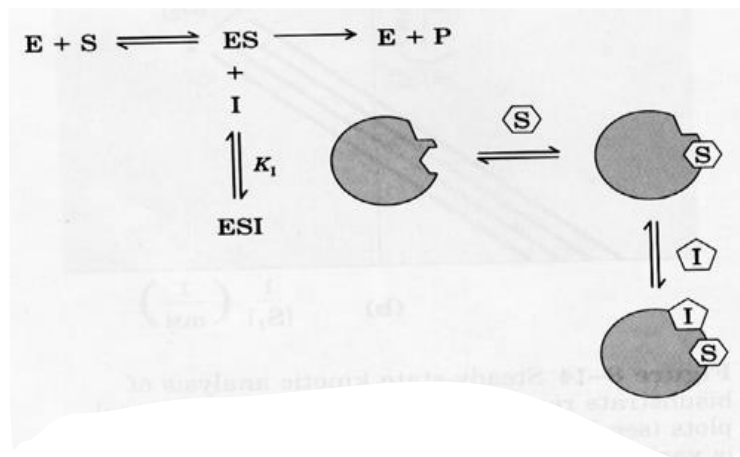


Gambar 12.6. Plot *Lineweaver-Burk* untuk inhibisi nonkompetitif.

c. Inhibisi Unkompetitif

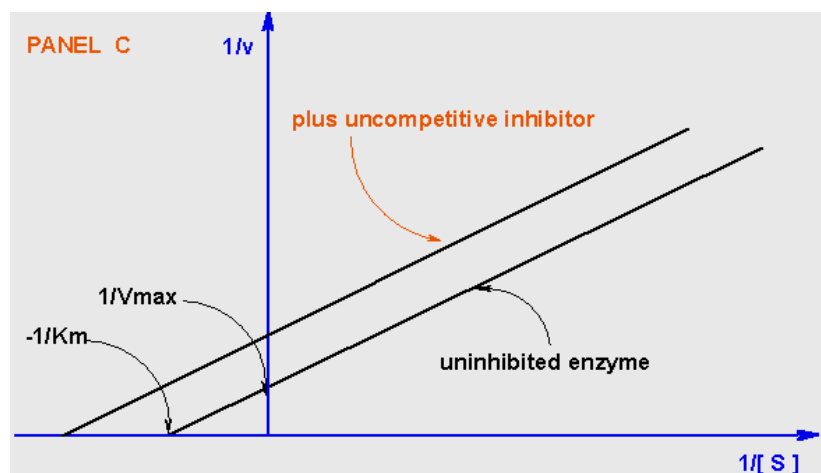
Inhibitor unkompetitif tidak berikatan dengan enzim bebas tetapi hanya dengan kompleks enzim-substrat. Persamaan yang menunjukkan terjadinya pengikatan inhibitor unkompetitif membentuk kompleks EIS mencegah katalisis dinyatakan oleh Persamaan (12.27):

$$v_p = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (12.27)$$



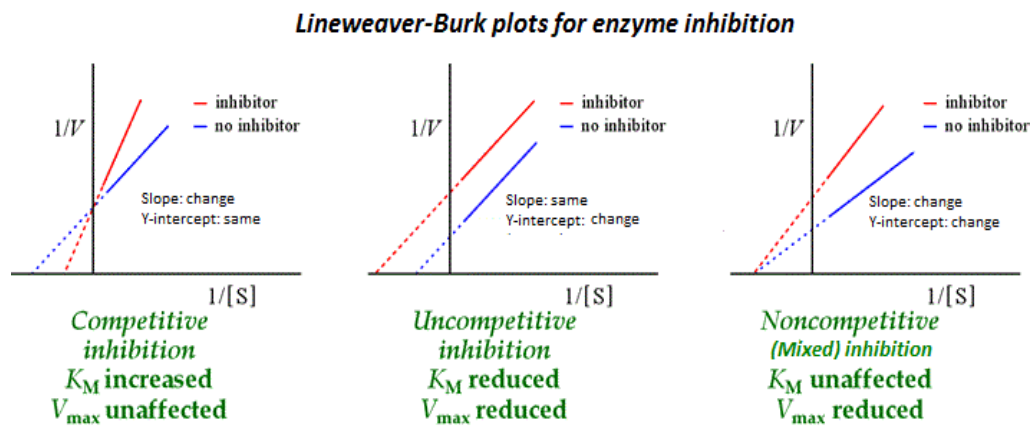
Gambar 12.7. Inhibisi unkompetitif

Sekuestrasi kompleks enzim-substrat oleh inhibitor akan mengurangi k_{cat} app karena enzim yang dihambat kurang efektif secara katalitik. v_{max} berkurang (dan K_M meningkat) karena pengikatan inhibitor tidak dapat dicegah dengan meningkatkan konsentrasi substrat (Gambar 12.7).



Gambar 12.7. Plot *Lineweaver-Burk* untuk inhibisi unkompetitif.

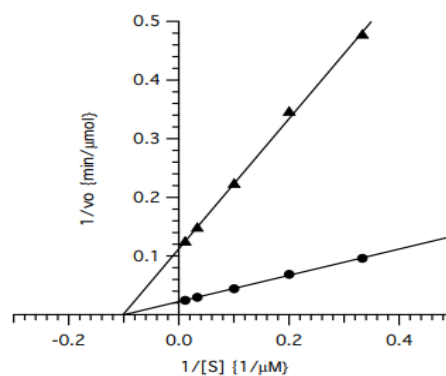
Perbandingan plot *Lineweaver-Burk* dari ketiga jenis inhibisi *reversible* ditampilkan pada Gambar 12.8.



Gambar 12.8. Berbagai jenis penghambatan enzim seperti yang ditunjukkan dengan plot *Lineweaver-Burk*

C. Latihan Soal

1. Bagaimana persamaan Michaelis-Menten menjelaskan mengapa laju reaksi yang dikatalisis enzim sebanding dengan jumlah enzim?
2. Bagaimana persamaan Michaelis-Menten menjelaskan mengapa laju reaksi yang dikatalisis enzim mencapai nilai maksimum pada substrat tinggi?
3. Jelaskan secara matematis bagaimana nilai K_M dapat diperoleh dari plot V_p vs $[S]$ pada saat $V_p = 1/2 V_{max}$.
4. Berikut ini adalah plot Lineweaver-Burke yang menampilkan kinetika untuk reaksi yang dikatalisis enzim.



- a. Jenis penghambatan apa yang ditunjukkan oleh gambar di atas?
 - b. Berapa nilai $V_{\max}$ dan K_M tanpa adanya inhibitor dan dengan adanya inhibitor? (Tunjukkan perhitungan Anda dan pastikan untuk menyertakan unit.)
 - c. Berapa banyak reaksi yang dikatalisis oleh masing-masing situs aktif enzim per detik ketika jenuh dengan substrat tanpa adanya inhibitor? (Tunjukkan perhitungan Anda dan pastikan untuk menyertakan unit.)
 - d. Apakah laju maksimum untuk reaksi difusi tanpa hambatan terbatas? Jelaskan.
 - e. Di mana pada molekul enzim, relatif terhadap situs aktif, inhibitor kemungkinan besar mengikat? Jelaskan.
 - f. Berapakah nilai konstanta disosiasi, K_i , dari kompleks inhibitor-enzim?
5. Data kinetik berikut diperoleh untuk enzim tanpa adanya inhibitor (1), dan dengan adanya dua inhibitor yang berbeda, (2) dan (3), masing-masing pada konsentrasi 7,0 mM. Asumsikan konsentrasi enzim total, $[E]_T$, adalah sama untuk setiap percobaan.

[S] {mM}	(1) v_o { $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$ }	(2) v_o { $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$ }	(3) v_o { $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$ }
1	3.8	2.2	3.3
2	7.3	4.3	5.7
4	13.3	8.2	8.9
8	22.9	14.9	12.3
12	30.0	20.4	14.1

- a. Tentukan $V_{\max}$ dan K_M untuk enzim yang tidak dihambat.
- b. Tentukan jenis inhibisi dan konstanta disosiasi, K_i , untuk inhibitor yang berikatan dengan enzim, untuk percobaan (2) dan (3).

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Alistair Rogers and Yves Gibon, Chapter 4 Enzyme Kinetics: Theory and Practice, https://www.researchgate.net/publication/281220476_Enzyme_kinetics_Theory_and_practice, diunduh 25 November 2021
- Biszwanger H (2002) Enzyme Kinetics, Principals and Methods. Wiley-VCH Weinheim, Germany
- Cornish, A. and Bowden, (2012). Fundamentals of enzyme kinetics, fourth edition, Wiley-Blackwell, chapter 2. <https://www.facebook.com/pages/Ebooks-Chemical-Engineering/238197077030>
- Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

PERTEMUAN 13

IMOBILISASI ENZIM

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini, mahasiswa mampu:

1. Memahami teknik-teknik imobilisasi enzim
2. Memahami aplikasi enzim amobil

B. Uraian Materi

1. Teknik Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah pembatasan mobilitas enzim secara fisik pada suatu tempat tertentu sehingga stabilitasnya meningkat dan masih dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya. Proses ini dapat dilakukan dengan cara mengikat molekul enzim pada suatu bahan pendukung (matriks) tertentu melalui pengikatan kimia atau menahan secara fisik dalam suatu rongga bahan pendukung. Aplikasi enzim di industri banyak menggunakan enzim dalam bentuk terimobilisasi karena memberikan berbagai keuntungan dibandingkan dengan penggunaan enzim terlarut, seperti:

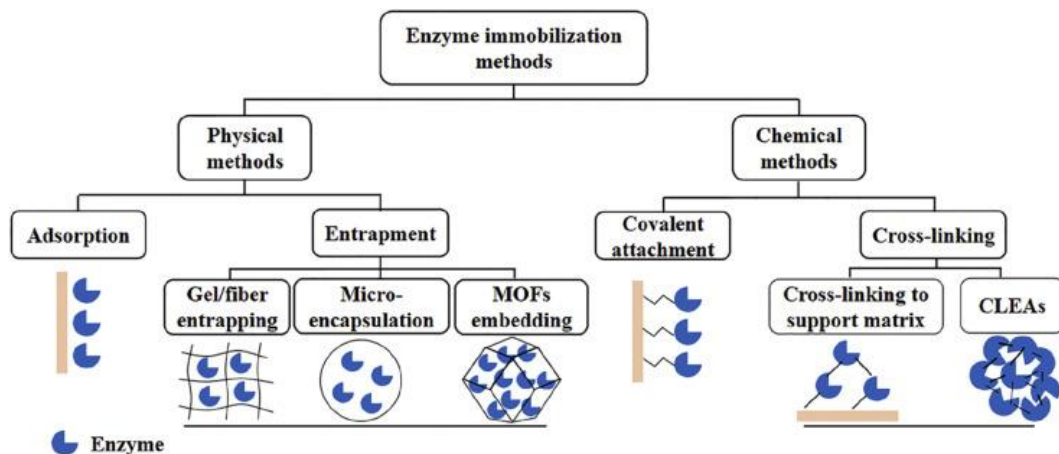
- a. Stabilitas enzim meningkat
- b. Dapat digunakan secara berulang sehingga menurunkan biaya produksi
- c. Pemisahan produk lebih mudah
- d. Penghentian proses reaksi cepat, dapat dilakukan dengan cara pemisahan enzim amobil dari larutan (filtrasi)
- e. Produk tidak terkontaminasi oleh enzim
- f. Dapat digunakan untuk proses sinambung dan pengontrolan proses dapat dilakukan lebih baik

Namun demikian penggunaan enzim terimobilisasi juga mempunyai kelemahan, yaitu:

- a. Biaya carrier/penyangga dan proses imobilisasi cukup mahal
- b. Terjadi perubahan karakteristik enzim
- c. Terjadi hambatan perpindahan massa
- d. Terjadinya penurunan aktivitas enzim selama proses imobilisasi

Secara umum teknik imobilisasi enzim dikategorikan menjadi empat, yaitu:

- Adsorpsi fisik ke dalam matrik pembawa,
- Penjebakan atau enkapsulasi enzim dalam kisi polimer gel,
- Pengikatan kovalen pada matrik yang tidak larut.
- Tautan silang protein dengan reagen bifungsional.



Gambar 13.1. Teknik imobilisasi enzim (Sumber: Dong-MeiLiu et al., 2018)

a. Metode Adsorpsi Fisik

Adsorpsi fisik enzim ke dalam matriks padat merupakan teknik imobilisasi enzim yang paling sederhana. Imobilisasi terjadi karena adanya interaksi fisik non-spesifik antara protein enzim dan permukaan matriks. Teknik ini biasanya tidak memerlukan reagen tertentu dan hanya memerlukan langkah aktivasi matrik pembawanya saja. Beberapa interaksi non-kovalen yang dapat terlibat dalam imobilisasi ini antara lain adsorpsi fisik nonspesifik, adsorpsi biospesifik, adsorpsi afinitas, interaksi elektrostatis (juga pengikatan ionik), dan interaksi hidrofobik. Interaksi antara protein enzim dengan permukaan matrik pembawa terjadi melalui ikatan lemah yang melibatkan ikatan hidrogen, gaya Van der Waals atau ikatan ionik. Metode imobilisasi dapat dilakukan dengan cara:

- 1) Proses statis: imobilisasi dengan enzim dilakukan dengan mengontakkan larutan enzim dengan matriks pendukung tanpa pengadukan.
- 2) Proses dinamis: Matriks pendukung dimasukkan ke dalam larutan enzim dan dilakukan pengadukan

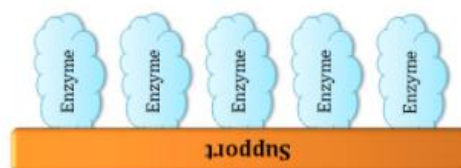
- 3) Proses pengumpanan ke dalam reactor: Matriks pendukung dimasukkan ke dalam reactor dan selanjutnya larutan enzim diumpungkan ke dalam reactor dengan pengadukan
- 4) Proses menggunakan elektroda: matriks pembawa diletakkan dekat dengan elektroda dalam wadah enzim dan selanjutnya dialiri arus listrik sehingga enzim berpindah ke matriks pembawa dan menempel di permukaan.

Dibandingkan dengan teknik imobilisasi lainnya, imobilisasi adsorpsi menguntungkan dalam aspek-aspek berikut:

- 1) Kondisi ringan dan pengoperasian yang mudah;
- 2) Biaya bahan pembawa dan prosedur imobilisasi yang relatif murah;
- 3) Tidak ada persyaratan aditif kimia selama adsorpsi;
- 4) Regenerasi pembawa yang mudah untuk didaur ulang; dan
- 5) Perolehan kembali aktivitas enzim yang tinggi.

Kelemahan metode ini adalah:

- 1) Karena hanya melibatkan ikatan yang lemah, oleh karena itu desorpsi enzim atau lepasnya enzim dari permukaan matriks akibat perubahan suhu, pH, kekuatan ionik atau bahkan keberadaan substrat, sering terjadi.
- 2) Jika adsorpsi terjadi secara non-spesifik maka protein atau senyawa lain juga dapat teradsorpsi. Hal ini dapat mengubah sifat-sifat enzim yang diimobilisasi atau jika zat yang teradsorpsi adalah substrat untuk enzim, maka laju reaksinya dapat menurun.
- 3) Efisiensi rendah



Gambar 13.2. Imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi (Sumber: <https://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/>)

b. Metode Penjebakan atau Enkapsulasi

Imobilisasi dilakukan dengan cara penjebakan/penjeratan enzim dalam suatu jaringan/kisi polimer gel atau mikrokapsul polimer yang memungkinkan substrat dan produk masih dapat lewat tetapi enzim tertahan di dalam polimer tersebut. Tidak ada pembentukan ikatan antara enzim dan polimer, namun difusi enzim dibatasi. Metode yang biasa digunakan adalah mempolimerisasi matriks hidrofilik dalam larutan encer enzim dan memecah massa polimer menjadi ukuran partikel yang diinginkan. Teknik penjeraban dapat digunakan untuk berbagai jenis enzim selama tidak menyebabkan gangguan terhadap kerja molekul enzim. Namun, perlu diperhatikan adanya radikal bebas yang dihasilkan selama polimerisasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang terperangkap. Kelemahan lainnya adalah bahwa hanya substrat dengan berat molekul rendah yang dapat berdifusi dengan cepat ke enzim, sehingga metode ini tidak cocok untuk enzim yang bekerja pada substrat makromolekul, seperti ribonuklease, tripsin, dekstranase, dll. Distribusi ukuran pori yang luas, jika menggunakan gel sintetik poliakrilamida, dapat menyebabkan terjadinya kebocoran enzim yang terperangkap pada saat pencucian enzim. Namun hal ini dapat diatasi dengan menautkan silang protein yang terperangkap dengan glutaraldehid. Sebagai alternatif, membran ultrafiltrasi dengan ukuran pori tertentu dapat digunakan untuk menghalangi pergerakan enzim. Matriks yang sering digunakan pada proses imobilisasi penjeraban adalah:

- 1) Gel poliakrilamida
- 2) Triasetat selulosa
- 3) Agar
- 4) Gelatin
- 5) Karagenan
- 6) Alginat

Teknik yang dapat digunakan adalah:

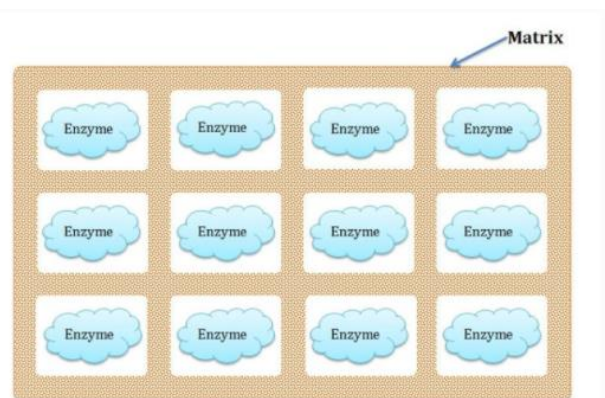
- 1) Menahan enzim di dalam gel (enzim dijerab dalam gel)
- 2) Menahan enzim dalam serat (enzim dijerab dalam serat penyangga)
- 3) Menahan enzim dalam mikrokapsul (enzim dijerab dalam mikrokapsul yang terbuat dari campuran monomer seperti poliamina dan kalsium alginat)

Dibandingkan dengan imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi secara fisik, maka pada umumnya imobilisasi dengan teknik penjerapan lebih stabil. Imobilisasi jebakan juga relatif sederhana dibanding dengan teknik ikatan kovalen. Secara umum keunggulan metode ini adalah:

- 1) Metode imobilisasi mudah dan cepat
- 2) Murah dan banyak alternative bahan polimer yang dapat digunakan
- 3) Mudah diaplikasikan untuk skala yang kecil
- 4) Kondisi operasi ringan
- 5) Tidak terjadi perubahan konformasi enzim sehingga aktifitas enzim dapat dipertahankan
- 6) Dapat digunakan untuk aplikasi pembuatan sensor

Kelemahan metode ini adalah:

- 1) Kebocoran enzim
- 2) Terjadinya hambatan difusifitas pori
- 3) Tidak banyak diaplikasikan di industri



Gambar 13.3. Imobilisasi enzim dengan teknik penjerapan

(Sumber: <https://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/>)

c. Imobilisasi dengan ikatan kovalen

Teknik imobilisasi enzim ini melibatkan pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan matriks pendukung. Metode ini paling banyak digunakan untuk imobilisasi enzim. Kondisi yang diinginkan adalah enzim dapat terikat dengan kuat pada matriks pembawa namun tidak boleh menyebabkan hilangnya aktifitas enzim serta sisi aktif enzim harus tidak terpengaruh oleh reagen yang digunakan. Gugus fungsional penting dalam

enzim yang dapat digunakan untuk pembentukan ikatan kovalen dengan matriks pendukung, adalah:

- 1) gugus alfa karboksil pada terminal C enzim,
- 2) gugus alfa amino pada terminal N enzim,
- 3) gugus amino epsilon dari lisin dan arginin,
- 4) gugus beta dan gamma karboksil dari asam aspartat dan asam glutamat,
- 5) cincin fenol tirosin,
- 6) gugus tiol sistein,
- 7) gugus hidroksil serin dan treonin,
- 8) gugus imidazol dari histidin, dan
- 9) gugus kelompok indol triptofan.

Matriks pembawa yang sering digunakan adalah:

- 1) karbohidrat: selulosa, DEAE selulosa, agarose;
- 2) bahan sintetik: poliaklamida;
- 3) protein pembawa: kolagen, gelatin;
- 4) bantalan pembawa kelompok amino: amino bensil selulosa;
- 5) pembawa anorganik: gelas berpori, silika; dan
- 6) sianogen bromide (CNBr)-agarosa, CNBr-sepharosa.

Metode pembentukan ikatan kovalen dapat dilakukan dengan cara:

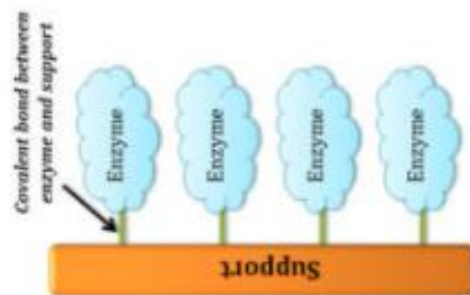
- 1) Diazonasi: pembentukan ikatan antara gugus amino dari matriks pembawa dengan gugus tirosil atau histidine dari enzim
- 2) Ikatan peptide: pembentukan ikatan antara gugus amino atau karboksil yang terdapat pada matriks pembawa dan enzim
- 3) Bahan polifungsional: menggunakan bahan bifungsional atau polifungsional (glutaraldehid) untuk membentuk ikatan kovalen antara gugus amino matriks pendukung dengan gugus amino enzim.

Imobilisasi dengan Teknik pengikatan kovalen mempunyai berbagai keunggulan, yaitu:

- 1) Pembentukan ikatan yang kuat antara matriks pendukung dengan enzim
- 2) Masalah kebocoran atau desorpsi enzim dapat dihindari
- 3) Dapat dilakukan dengan metode yang sederhana
- 4) Berbagai jenis matriks pendukung dengan gugus fungsional yang berbeda tersedia di pasaran
- 5) Penggunaannya luas

Kelemahan atau permasalahan utama yang sering terjadi pada teknik imobilisasi pengikatan kovalen adalah:

- 1) Modifikasi kimiawi enzim dapat mengakibatkan perubahan konformasi enzim sehingga kehilangan aktifitasnya
- 2) Enzim dapat kehilangan aktifitasnya jika reaksi terjadi dengan sisi aktif enzim.

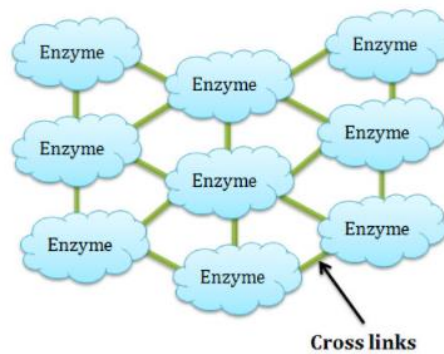


Gambar 13.4. Imobilisasi enzim dengan Teknik ikatan kovalen

(Sumber: <https://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/>)

d. Imobilisasi dengan Metode Taut Silang

Metode ini disebut juga dengan kopolimerisasi. Metode ini dilakukan dengan cara pengikatan melalui ikatan kovalen antar berbagai gugus dalam enzim menggunakan bahan polifungsional. Teknik imobilisasi ini tidak menggunakan matriks penyangga. Bahan multifungsional yang sering dipakai adalah glutaraldehida dan garam diazonium. Imobilisasi enzim dapat dilakukan menggunakan enzim murni (crosslinked enzyme crystal; CLEC) maupun enzim kasar (crosslink enzyme aggregate; CLEA). Kelemahan metode ini adalah penggunaan bahan multifungsional dapat merubah konformasi enzim sehingga menjadi tidak aktif.



Gambar 13.5. Imobilisasi enzim dengan Teknik penjeraban
(Sumber: <https://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/>)

2. Aplikasi Enzim Amobil

Proses reaksi berbasis enzimatik meningkat dengan cepat menggantikan proses reaksi kimiawi di berbagai aplikasinya. Proses enzimatik memberikan berbagai keuntungan seperti reaksi yang cepat dan spesifik, proses dan biaya yang efisien, serta aman terhadap lingkungan. Berbagai aplikasi enzim amobil dapat ditemukan di berbagai bidang, antara lain: industri, medis, analisa dan lingkungan. Beberapa aplikasi enzim amobil diuraikan sebagai berikut:

a. Industri Pangan

Dalam industri makanan banyak menggunakan enzim yang telah dimurnikan oleh karena itu biaya enzim menjadi mahal. Guna menghemat biaya maka digunakan enzim amobil sehingga dapat dipakai secara berulang. Berbagai jenis enzim amobil telah diaplikasikan di industri seperti ditampilkan pada Tabel 13.1.

Tabel 13.1. Beberapa aplikasi penting dari enzim amobil di industri

Enzyme	EC number	Substrate	Product
β -Galactosidase	3.2.1.23	Lactose	Lactose-free milk
Lipase	3.1.1.3	Triglycerides	Cocoa butter substitutes
Nitrile hydratase	4.2.1.84	Acrylonitrile	Nicotinamide
Aminoacylase	3.5.1.14	D, L-Amino acids	L-Amino acids
Raffinase	3.2.1.22	Raffinose	Galactose and sucrose
Invertase	3.2.1.26	Sucrose	Glucose and fructose mixture
Thermolysin	3.4.24.27	Peptides	Aspartam
Glucoamylase	3.2.1.3	Starch	D-Glucose
Papain	3.4.22.2	Proteins	Removal of "chill haze" in beers
Tyrosinase	4.1.99.2	Pyrocatechol	L-DOPA

b. Energi

Energi terbarukan merupakan salah satu kebutuhan utama guna menggantikan sumber energi konvensional yang berbasis minyak bumi. Salah satu sumber energi yang potensial adalah biodiesel. Biodiesel adalah ester monoalkil dari asam lemak rantai panjang. Biodiesel secara kimiawi dihasilkan dari trigliserida yang berasal dari minyak nabati maupun lemak hewani melalui proses esterifikasi dengan alkohol (metanol, etanol) menggunakan katalis. Produksi biodiesel secara kimiawi menghadapi tantangan dalam mensuplai katalis dalam jumlah yang besar, rekoveri gliserol dan adanya reaksi samping yang dapat menyebabkan polusi. Oleh karena itu produksi biodiesel secara enzimatik menggunakan enzim lipase mempunyai potensi aplikasi yang besar. Enzim lipase mengkatalisis reaksi dengan membutuhkan energi yang jauh lebih kecil dan hanya memerlukan kondisi reaksi yang ringan. Enzim lipase berharga mahal, oleh karena itu imobilisasi lipase sangat penting sehingga dapat digunakan secara berulang dan mempunyai stabilitas yang tinggi.

c. Biosensor

Aplikasi enzim amobil untuk biosensor untuk tujuan analisa dan tes diagnostik telah berkembang dengan pesat. Biosensor dibuat dengan

mengintegrasikan penginderaan sistem biologis, misalnya enzim dengan transduser. Enzim diimobilisasi pada ujung transduser baik secara langsung atau dilapisi menggunakan membran polimer. Prinsip kerja biosensor adalah dengan memanfaatkan spesifisitas dan sensitivitas enzim. Biosensor dapat disesuaikan untuk berbagai analit target yang dapat berupa substrat enzim maupun inhibitor enzim. Penggunaan biosensor dalam analisa sampel memberikan keuntungan karena cepat dan tanpa memerlukan persiapan khusus dari sampel. Berbagai aplikasi enzim amobil untuk biosensor ditampilkan pada Tabel 13.2.

Tabel 13.2. Beberapa potensi enzim amobil untuk aplikasi biosensor

Enzyme	EC No.	Substrate	Application
Acetylcholinesterase	3.1.1.7	Acetylcholine	Determination of carbamate pesticides
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	Ethanol	Food science, biotechnology
Alliinase	4.4.1.4	Cysteine sulfoxide	Food industry (garlic derivatives)
Cholesterol oxidase	1.1.3.6	Cholesterol	Medical applications
Choline oxidase	1.1.3.17	Choline	Used with acetylcholine esterase
Glucose oxidase	1.1.3.4	Glucose	Diabetes, food science, biotechnology
Glutamate oxidase	1.4.3.11	Glutamate	Food science, biotechnology
Horseradish peroxidase	1.11.1.7	H ₂ O ₂	Biological and industrial applications
Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Lactate	Sport sciences, food sciences
Lactate oxidase	1.13.12.4	Lactate	Sport sciences, food sciences
Penicillinase	3.5.2.6	Penicillins	Pharmaceutical applications
Tyrosinase	1.14.18.1	Phenols	Determination of phenolics in food
Urease	3.5.15	Urea	Medical diagnosis, artificial kidneys

d. Aplikasi Medis

Enzim amobil mempunyai potensi yang besar untuk diaplikasikan di bidang medis diantaranya adalah untuk diagnosis dan pengobatan penyakit. Beberapa potensi penggunaan enzim amobil di bidang medis ditampilkan pada Tabel 13.3.

Tabel 13.3. Potensi penggunaan enzim amobil di bidang medis

Enzyme (EC number)	Condition
Arginase (3.5.3.1)	Cancer
Asparaginase (3.5.1.1)	Leukemia
Carbonic dehydratase (4.2.1.1)	Artificial lungs
Catalase (1.11.1.6)	Acatalasemia
Glucoamylase (3.2.1.3)	Glycogen storage disease
Glucose oxidase (1.1.3.4)	Artificial pancreas
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.1.1.49)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
Heparinase (4.2.2.7)	Extracorporeal therapy procedures
Phenylalanine ammonia lyase (4.3.1.5)	Phenylketonurea
Urease (3.5.1.5)	Artificial kidney
Urate oxidase (1.7.3.3)	Hyperuricemia
Xanthine oxidase (1.1.3.22)	Lesch-Nyhan disease

e. Pengolahan Limbah

Meningkatnya konsumsi air bersih serta semakin tercemarnya lingkungan memerlukan system pengolahan air yang baik guna memenuhi kebutuhan terhadap air bersih. Sumber cemaran dari industry seperti limbah pewarna dari industri tekstil, kertas, kulit memberikan pencemaran bagi lingkungan dan bahkan dalam konsentrasi rendah bersifat karsinogenik. Saat ini enzim telah banyak digunakan untuk mendegradasi bahan pewarna, seperti enzim peroksidase, lakase, azo reduktase. Guna melindungi enzim dari kondisi yang tidak sesuai, suhu tinggi, pH rendah atau tinggi dan kekuatan ion tinggi yang dapat mengakibatkan kehilangan aktivitasnya, maka enzim diimobilisasi. Beberapa enzim amobil yang telah digunakan dalam pendegradasian limbah warna meliputi: enzim lakase amobil untuk

mendegradasi zat warna antrasinoid, lancet biru dan ponceau merah. Enzim lipase amobil digunakan untuk mendegradasi minyak dan lemak menjadi asam lemak rantai panjang dan gliserol dalam pengolahan air limbah dari industri makanan.

C. Latihan Soal

1. Sebutkan keuntungan dan kerugian aplikasi enzim amobil dibandingkan dengan penggunaan enzim terlarut.
2. Sebutkan teknik-teknik untuk imobilisasi enzim dan jelaskan prinsipnya.
3. Berikan contoh aplikasi enzim amobil di industry dan jelaskan prinsip reaksi yang terjadi.
4. Sebutkan karakteristik enzim amobil yang perlu diperhatikan dalam aplikasi enzim amobil di industri.
5. Sebutkan contoh aplikasi enzim dalam bidang biosensor dan jelaskan prinsip kerjanya.

D. Daftar Pustaka

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) *Biochemical Engineering*, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Dong-MeiLiu, Juan Chen, Yan-PingShi, (2018) Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 102, 332-342
- Homaiei, AA., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R., (2013) Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol* 6:185–205, DOI 10.1007/s12154-013-0102-9
- Luna, C.; Luna, D.; Calero, C; Bautista, F. M.; Romero, A.A.; Posadillo, A.; Verdugo, C. 2016. Chapter 7. Biochemical catalytic production of biodiesel. *Handbook of Biofuels Production* (R. Luque, C. Sze Ki Lin, K. Wilson, J. Clark. Woodhead Publishing (Elsevier). Pages 165-199. DOI: 10.1016/B978-0-08-100455-5.00007-2

- Luna, C.; Luna, D.; Calero, C; Bautista, F. M.; Romero, A.A.; Posadillo, A.; Verdugo, C. 2016. Part II. Biofuels from chemical and biochemical conversion processes and technologies, Handbook of Biofuels Production (R. Luque, C. Sze Ki Lin, K. Wilson, J. Clark. Woodhead Publishing (Elsevier). Pages 165-199. DOI: 10.1016/B978-0-08-100455-5.00007-2
- Nisha S, Arun Karthick S and Gobi N (2012), A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, Che Sci Rev Lett 2012, 1(3), 148-155
- Shijie Liu and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier
- Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

PERTEMUAN 14

APLIKASI DAN INDUSTRI BIOPROSES

A. Capaian Pembelajaran

Setelah menyelesaikan pertemuan ini mahasiswa mampu menguasai aplikasi ilmu bioproses di industri, khususnya dalam produksi *chemicals* dan pengolahan air limbah.

B. Uraian Materi

Seperti yang telah diketahui bersama bahwa saat ini enzim dan sel mikroba banyak digunakan untuk produksi senyawa kimia (*chemicals*), obat-obatan (*pharmaceuticals*), bahan makanan, *essence*, vitamin, serta untuk pengolahan limbah. Masing-masing dari proses tersebut memiliki karakteristik yang unik dalam hal teknologi pemrosesan serta pemisahannya. Proses yang paling umum digunakan dalam industri bioproses adalah fermentasi. Menurut Dutta (2008), produk fermentasi dapat berupa sel (biomassa), komponen dalam *broth* fermentasi (ekstraseluler), maupun produk yang terdapat di dalam sel (intraseluler) seperti yang disajikan pada Tabel 14.1.

Tabel 14.1. Beberapa contoh produk bioproses dan konsentrasinya

<i>Types</i>	<i>Products</i>	<i>Concentration</i>
<i>Cell itself</i>	baker's yeast, single cell protein	30 g/L
<i>Extracellular</i>	alcohols, organic acids, amino acids	100 g/L
<i>Extracellular</i>	enzymes, antibiotics	20 g/L
<i>Intracellular</i>	recombinant DNA proteins	10 g/L

Dalam pertemuan ini akan dijelaskan beberapa contoh industri bioproses dan teknologi yang digunakan untuk memproduksi berbagai *chemicals* dan obat-obatan, baik secara aerobik maupun anaerobik. Di samping itu, aplikasi bioproses untuk pengolahan limbah juga akan dipaparkan dalam bab ini.

1. Proses Anaerobik

a. Produksi Etanol

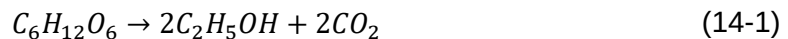
Etanol sering digunakan sebagai bahan baku (*raw material*) senyawa kimia tertentu, pelarut (*solvent*), serta bahan bakar. Dalam beberapa industri seperti industri kimia, farmasi, maupun industri makanan, etanol seringkali digunakan dalam jumlah yang besar. Sebanyak 4 juta ton etanol diproduksi di dunia setiap tahunnya, dimana 80%-nya dihasilkan melalui proses fermentasi (Shuler dan Kargi, 2001).

Yeast (ragi) merupakan mikroorganisme yang paling umum digunakan untuk produksi etanol dalam skala industri. Jenis (spesies) *yeast* yang dapat dimanfaatkan berbeda-beda tergantung pada komposisi bahan baku yang dipakai. *S. cerevisiae* secara khusus cocok untuk fermentasi heksosa, dimana selama ini paling banyak digunakan. *Kluyveromyces fragilis* atau *Candida* sp. dapat digunakan apabila substratnya mengandung laktosa atau pentosa. Mikroorganisme lainnya yang mampu memproduksi etanol seperti *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen* sp., tidak digunakan dalam skala industri. Meskipun demikian, spesies *Zymomonas* memiliki kelebihan yang signifikan dibandingkan *yeast* dan mungkin akan dapat digunakan pada skala industri di masa yang akan datang. Mikroorganisme yang memiliki kemampuan fermentasi pentosa dan heksosa seperti *Clostridium hermosaccharolyticum* dan *Thermoanaerobacter ethanolicus* merupakan mikroorganisme termofilik dan memberikan keuntungan dalam hal fermentasi etanol dan separasi produk. Meskipun demikian, kedua mikroorganisme tersebut juga dapat menghasilkan produk akhir yang tidak diinginkan serta menghasilkan larutan etanol yang konsentrasinya rendah.

Sebagian besar mikroorganisme membutuhkan komponen gula untuk fermentasi. Kandungan gula dapat ditemukan pada bahan-bahan seperti tebu, *sweet sorghum*, atau *sugar beet juices* dan molasses. Bahan yang mengandung pati dan selulosa seperti *grain*, buah-buahan, sayuran, kayu, biomassa, limbah industri kertas, dan limbah pertanian juga dapat digunakan sebagai substrat tetapi perlu dihidrolisis sebelum proses fermentasi. Umumnya pati disakarifikasi secara enzimatik sebelum masuk pada tahap fermentasi. Metode hidrolisis asam pada bahan yang mengandung pati tidak direkomendasikan karena dapat menghasilkan produk samping yang sifatnya *non-fermentable* dan inhibitor. Di samping itu, hidrolisis bahan yang

mengandung selulosa akan lebih sulit, mahal, dan tidak efisien. Meskipun demikian, pemanfaatan pati dan selulosa untuk proses biologi memiliki daya tarik tersendiri dalam hal usaha untuk *recycle* limbah.

Yeast mengkonversi heksosa menjadi etanol dan karbon dioksida melalui reaksi glikolisis seperti ditunjukkan pada reaksi berikut:



Secara teoritis, *yield* etanol terhadap glukosa sebesar 0,51 g/g. Biasanya, produk samping seperti gliserol, *succinic acid*, dan asam asetat juga dihasilkan, sehingga *yield* aktual yang diperoleh hanya sekitar 90-95% dari *yield* teoritisnya. Temperatur optimal untuk *yeast* adalah pada kisaran 30-35°C, sementara nilai pH optimalnya adalah 4-6. Untuk mikroorganisme termofilik, suhu optimalnya berada pada kisaran 50–60°C. Oksigen tidak diperlukan pada proses produksi etanol, atau dengan kata lain kondisinya adalah anaerob.

Fermentasi etanol konvensional dioperasikan secara *batch* pada kondisi aseptik. Reaktor yang digunakan adalah reaktor berpengaduk. Reaktor diisi dengan media nutrient hingga 70% volume. Larutan umpan yang masuk harus mengandung senyawa nitrogen, fosfor, mineral, dan beberapa *trace elements* dengan komposisi yang seimbang. Media glukosa biasanya dilengkapi dengan NH_4Cl , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, dan *yeast extract*. Konsentrasi glukosa pada larutan umpan memiliki pengaruh penting pada laju produksi etanol, dimana konsentrasi yang lebih dari 100 g/L dapat bersifat inhibitor bagi *yeast*.

Setelah pengaturan pH dan temperatur, isi reaktor disterilisasi dan didinginkan hingga suhu fermentasi. Temperatur dan pH harus dikendalikan selama proses berlangsung. Kultur *yeast* steril disiapkan untuk inokulasi ke dalam reaktor. Fermentasi *batch* ini berlangsung selama 30-40 jam. Pada akhir proses, produk fermentasi dikeluarkan dari dalam reaktor, kemudian *yeast* dipisahkan dengan metode filtrasi atau sentrifugasi. *Broth* fermentasi yang dihasilkan akan diproses lebih lanjut untuk separasi etanol melalui proses distilasi.

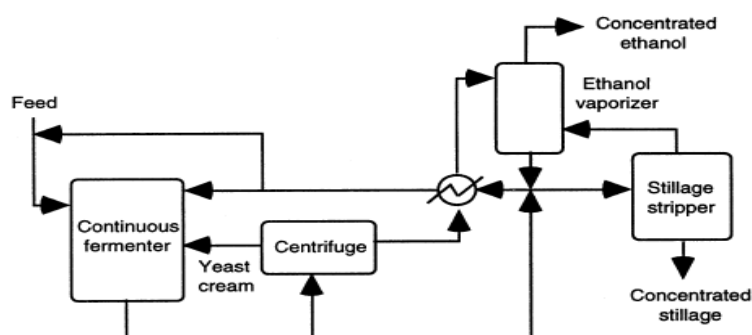
Operasi kontinyu pada fermentasi etanol memiliki kelebihan yang signifikan dibanding operasi *batch*. Dengan sterilisasi media secara kontinyu dan kondisi aseptik, masalah kontaminasi dapat dieliminasi. Di samping itu, sekitar 95% gula dapat dikonversi menjadi etanol dalam operasi kontinyu,

dengan *residence time* 10-21 jam. Hal ini lebih menguntungkan, mengingat operasi *batch* membutuhkan waktu yang lebih lama, yaitu 40 jam. Adanya *recycle* sel pada operasi kontinyu dapat meningkatkan konsentrasi sel di dalam reaktor hingga 5 kalinya, sehingga konversinya menjadi lebih cepat. Perbandingan proses industri untuk produksi etanol disajikan pada Tabel 14.2.

Tabel 14.2. Perbandingan proses fermentasi etanol di industri (Shuler dan Kargi, 2001)

	Total cycle time (h)	Ethanol concentration (g/l)	Productivity (g/l h)
Simple batch	36	80	2.2
Melle-Boinot	12	80	6.6
Continuous in series	8	86	11

Gambar 14.1 menunjukkan proses yang digunakan untuk memproduksi etanol. Proses ini menggunakan operasi kontinyu dengan *recycle* sel, dan kolom distilasi untuk pemisahan etanol. Fermentor yang digunakan adalah fermentor berpengaduk. Keluaran fermentor disentrifugasi untuk memisahkan yeast. Yeast yang sudah dipisahkan *direcycle* kembali ke dalam fermentor, sementara cairan produk diumpankan ke kolom distilasi untuk pemisahan etanol. Hasil bawah kolom distilasi yang tidak mengandung etanol *direcycle* kembali ke fermentor. Dalam hal ini, *recycle* sel yeast mampu menghasilkan laju konversi yang tinggi, sementara *recycle* cairan akan mengurangi jumlah limbah yang dihasilkan, serta digunakan untuk mengencerkan konsentrasi gula pada umpan hingga pada level yang tidak bersifat inhibitor.



Gambar 14.1. Skema proses untuk produksi etanol (Shuler dan Kargi, 2001)

Etanol dapat dipisahkan dari *broth* fermentasi menggunakan distilasi vakum pada suhu rendah, adsorpsi, atau pemisahan dengan membran. Proses-proses tersebut mengurangi inhibisi etanol tetapi jarang digunakan di industri karena sulit dioperasikan. Pemisahan etanol dari *broth* fermentasi biasanya dilakukan dengan metode distilasi. Dengan metode ini, kemurnian etanol yang dihasilkan umumnya bisa mencapai 95% untuk *chemicals* dan obat-obatan. Meskipun demikian, sulit untuk mendapatkan 100% etanol murni karena 95% etanol dalam air membentuk campuran azeotrop.

b. Produksi Asam Laktat

Asam laktat pertama kali diisolasi dari *sour milk* pada tahun 1780 dan memiliki dua bentuk konfigurasi, yaitu D- dan L-asam laktat. L-asam laktat umumnya digunakan sebagai *acidulant* dan pengawet pada makanan. Asam laktat juga digunakan sebagai *chemical intermediate* untuk memproduksi senyawa kimia lainnya, serta banyak digunakan pada industri farmasi. Secara umum asam laktat diproduksi melalui proses fermentasi.

Di industri, biasanya karbohidrat difermentasi oleh campuran bakteri asam laktat. Campuran *strain* ini mampu menghasilkan laju fermentasi yang lebih cepat dibandingkan dengan kultur murni. Bakteri penghasil asam laktat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok, yaitu bakteri *homolactic* (*Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp.) dan *heterolactic* (beberapa *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp.).

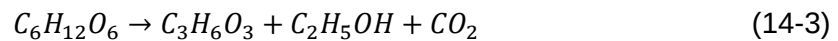
Spesies *homolactic Lactobacillus* dan *Streptococcus* merupakan mikroorganisme yang paling umum digunakan untuk produksi asam laktat di industri. Bakteri *homolactic* menggunakan jalur EMP untuk menghasilkan dua mol *pyruvate* dari satu mol glukosa, yang kemudian direduksi menjadi asam laktat.



Yield produk hasil fermentasi bervariasi, tergantung pada substrat dan mikroorganisme yang digunakan, namun secara umum *yield* asam laktat terhadap glukosa lebih dari 0,9 g/g. Mikroorganisme yang digunakan adalah anaerob fakultatif, namun hanya mampu menghasilkan ATP dengan fermentasi anaerob. Bakteri *homolactic* di industri tumbuh pada temperatur > 40°C dan pH antara 5-7. Dalam hal ini, temperatur yang tinggi dan pH rendah (pH < 6) dapat mengurangi risiko kontaminasi. Bakteri *homolactic*

dapat menghasilkan asam laktat dari pentosa dan heksosa. Umumnya asam laktat dan asam asetat diproduksi dari proses fermentasi pentosa.

Fermentasi dengan bakteri *heterolactic* tidak diinginkan karena dapat menghasilkan produk samping, dimana satu mol glukosa menghasilkan satu mol asam laktat, etanol, dan CO₂ (persamaan 14-3). Berdasarkan reaksi tersebut, *yield* teoritisnya adalah 0,5 g asam laktat/g glukosa.

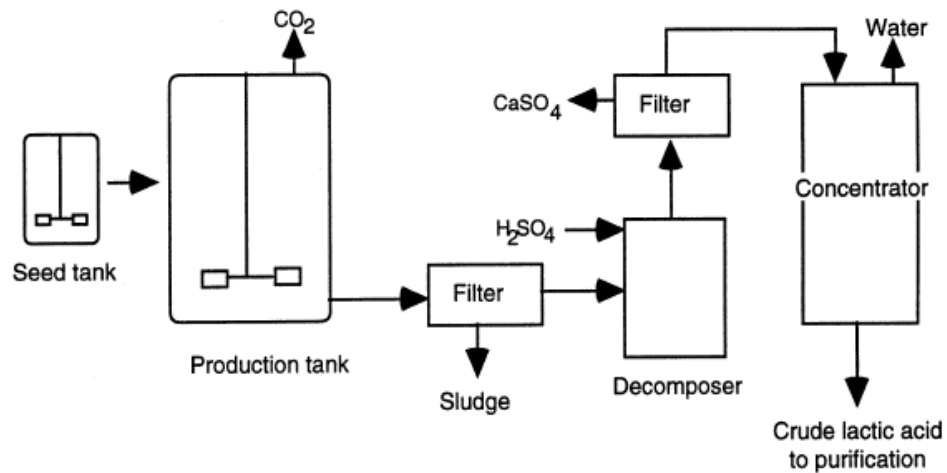


Dalam pemilihan bahan baku, terdapat beberapa hal yang penting untuk dipertimbangkan, misalnya harganya yang tidak mahal, mampu menghasilkan laju produksi yang tinggi dengan *yield* tinggi tanpa pembentukan produk samping, tidak membutuhkan *pretreatment*, serta ketersediaannya setiap waktu. Sukrosa yang berasal dari tebu, laktosa dari *cheese whey*, serta maltosa atau dekstrosa dari pati yang dihidrolisis banyak digunakan sebagai bahan baku di industri. Molasses juga dapat digunakan, namun lebih sulit dalam proses pemisahan asam laktat. Untuk meningkatkan laju pertumbuhan sel dan pembentukan asam laktat perlu ditambahkan sumber nitrogen (seperti *malt extract*, *corn steep liquor*, dan *yeast extract*) ke dalam media fermentasi.

Proses produksi asam laktat di industri dioperasikan secara *batchwise*. Fermentor dibuat dari *stainless steel* dan dilengkapi dengan koil transfer panas. Vessel disterilisasi menggunakan *steam* sebelum diisi dengan medium. Kondisi proses fermentasi berbeda-beda untuk tiap produsen di industri, namun umumnya berada pada kisaran temperatur 45-60°C dan pH 5-6,6 untuk *L. delbrückii*; T = 43°C, pH = 6-7 untuk *L. bulgaricus*; dan T = 30-50°C dan pH < 6 untuk *Rhizopus*. Pada kondisi optimal, waktu prosesnya berkisar antara 1 hingga 2 hari. Proses fermentasi ini juga dilengkapi dengan pengadukan untuk mencegah terjadinya endapan kalsium karbonat.

Selain temperatur dan pH, laju pembentukan asam laktat juga dipengaruhi oleh konsentrasi gula dan nitrogen. Asam laktat yang dihasilkan harus dinetralisasi, biasanya dengan penambahan kalsium karbonat atau kalsium hidroksida. Gas CO₂ dilepaskan secara kontinyu ketika fermentasi berlangsung, sehingga dihasilkan kondisi anaerob di dalam fermentor. *Yield* asam laktat pada akhir proses fermentasi adalah 90-95% dari konsentrasi gula mula-mula. Sementara *yield* massa sel umumnya < 15% dari

konsentrasi gula awal. Meskipun demikian, *yield* sel yang dihasilkan dapat mencapai 30% tergantung pada jenis mikroorganisme dan kondisi kultur.



Gambar 14.2. Diagram proses untuk produksi asam laktat (Shuler dan Kargi, 2001)

Gambar 14.2 menunjukkan diagram proses pembentukan asam laktat. Pada tahap pertama dilakukan peningkatan suhu fermentor hingga 80-100°C serta pH hingga 10-11. Prosedur ini bertujuan untuk membunuh mikroorganisme, koagulasi protein, melarutkan kalsium laktat, serta degradasi beberapa gula residu. Cairan kemudian difilter untuk menghilangkan biomassa, dan asam sulfat ditambahkan untuk mendapatkan asam laktat. Kalsium sulfat dihilangkan dengan filtrasi, sementara asam laktat dipekatkan di dalam *concentrator*.

Proses pemurnian asam laktat dapat dilakukan dengan metode presipitasi kalsium laktat. *Broth* fermentor difilter dan dievaporasi hingga diperoleh konsentrasi asam laktat 25%. Kalsium laktat kemudian dikristalisasi dan dipisahkan dari *mother liquor*-nya. Beberapa prosedur pemurnian dapat dilakukan untuk mendapatkan asam laktat dengan *grade* yang berbeda, misalnya dengan cara *bleaching* menggunakan *activated carbon*, *ion exchange*, elektrodialisis, ekstraksi solvent, atau esterifikasi. Asam laktat yang *edible* umumnya mengandung 50-65% asam laktat. Sementara untuk industri farmasi diperlukan asam laktat dengan kemurnian > 90%; dan untuk polimer, asam laktat yang digunakan harus semurni mungkin.

2. Proses Aerobik

Proses biologi secara aerobik banyak digunakan untuk produksi asam organik (misalnya asam sitrat, asam asetat, asam glukonik), vitamin, antibiotik, enzim, essence, dan asam amino. Beberapa dari proses tersebut akan dipaparkan pada bagian ini.

a. Produksi Asam Sitrat

Asam sitrat banyak digunakan diantaranya pada industri makanan dan industri farmasi. Senyawa ini sering digunakan diantaranya sebagai *acidulant* pada makanan, *confectionery*, dan minuman. Asam sitrat juga dapat digunakan sebagai *stabilizer* minyak dan lemak. Di industri farmasi, asam sitrat dapat digunakan pada *antacids* dan sebagai *stabilizer* asam askorbat. Garam logam yang terkandung dalam asam sitrat seperti trisodium sitrat diketahui dapat mencegah pembekuan darah.

Produksi asam sitrat dari larutan gula secara aerobik pertama kali diketahui menggunakan mikroorganisme *Penicillium*. Seiring berjalannya waktu, *Aspergillus niger* mulai dimanfaatkan karena penggunaan *Penicillium* menghasilkan *yield* yang rendah. *Aspergillus niger* merupakan organisme yang paling banyak digunakan untuk produksi asam sitrat dari molasses atau larutan gula. *Yeast Candida* juga dapat digunakan untuk produksi asam sitrat dari karbohidrat atau n-alkana dengan *yield* mencapai 225 g/L. *Beet* atau molasses tebu dapat digunakan sebagai sumber karbohidrat untuk produksi asam sitrat. Di samping itu, larutan glukosa atau sukrosa murni juga dapat digunakan sebagai bahan baku namun lebih mahal dan membutuhkan tambahan nitrogen (NH_4^+), fosfat, serta garam anorganik. Karena harganya yang murah dan kaya akan nutrisi alami, maka penggunaan molasses lebih dipilih dibandingkan larutan gula murni.

Secara tradisional, asam sitrat diproduksi melalui *surface fermentation* dari molasses, dimana proses ini masih digunakan oleh beberapa produsen. Metode *surface fermentation* dilakukan pada permukaan tray dengan kedalaman cairan 5-20 cm. Molasses cair (dengan konsentrasi gula 150 g/L) yang sudah disterilisasi diletakkan pada tray dengan suhu dijaga pada 30°C. Nutrien tambahan dan alkali *ferrocyanide* steril ditambahkan ke dalam medium. Spora dari *strain A. niger* disebarkan pada cairan di tray. *Chamber* diaerasi dengan udara steril untuk menyediakan oksigen bagi

mikroorganisme dan untuk menghilangkan panas yang dihasilkan dari proses fermentasi. Pada permukaan medium akan terbentuk lapisan *mycelium*. Setelah proses inkubasi selama 7-10 hari, tray dikosongkan, *mycelium* dihilangkan, kemudian medium ditransfer ke tahapan berikutnya untuk proses *recovery*.

Seiring berjalannya waktu, *submerged fermentation* yang memanfaatkan molasses atau larutan gula murni mulai dikembangkan. Jika dibandingkan dengan *surface fermentation*, *submerged fermentation* membutuhkan energi yang lebih tinggi. Proses *submerged* dilakukan pada vessel dengan volume 100 m³ atau lebih, secara *batch* maupun *fed-batch*. Fermentor diagitasi secara mekanik dan diaerasi menggunakan *air sparging*. Suhu dalam fermentor dikendalikan dengan menggunakan koil pendingin, dan pH diatur pada nilai 1,5-3. Spora *A. niger* dibiarkan tumbuh dalam media inokulum sebelum ditransfer ke fermentor utama. Pada beberapa kasus, spora langsung dimasukkan ke media fermentor. Operasi *batch* biasanya menghasilkan produktivitas 0,5-1 kg/(m³.jam). Operasi *fed-batch* dapat dilakukan untuk menghindari inhibisi substrat dan untuk memperpanjang fase produksi setelah pertumbuhan sel terhenti. *Yield* volumetrik dari proses *fed-batch* sekitar 130 kg/m³. Ketika fase produksi asam sitrat berhenti, biasanya setelah 4-5 hari fermentor dikosongkan dan biomassa dipisahkan dari *broth* dengan cara filtrasi. Cairan yang dihasilkan selanjutnya dialirkan ke tahap *recovery*.

Metode presipitasi sering dilakukan dengan menambahkan kalsium hidroksida (*lime*) ke dalam *broth* fermentasi yang sudah dipanaskan untuk mendapatkan kalsium sitrat tetrahidrat. Endapan kemudian dicuci dan dicampur dengan asam sulfat encer sehingga menghasilkan larutan asam sitrat dan endapan CaSO₄ (*gypsum*). Setelah proses *bleaching* dan kristalisasi, diperoleh asam sitrat anhidrat dan monohidrat. Metode lain yang dapat digunakan untuk *recovery* asam sitrat adalah ekstraksi *solvent*, namun metode ini tidak digunakan secara komersial. Dalam metode ekstraksi tidak terdapat proses pembentukan *gypsum*, namun dapat mengekstrak beberapa pengotor yang terdapat dalam molasses. Beberapa senyawa yang dapat digunakan sebagai ekstraktan diantaranya keton, hidrokarbon, eter, dan ester. Ekstraksi asam sitrat dilakukan pada suhu rendah, kemudian pelarutnya di *stripping* menggunakan air panas.

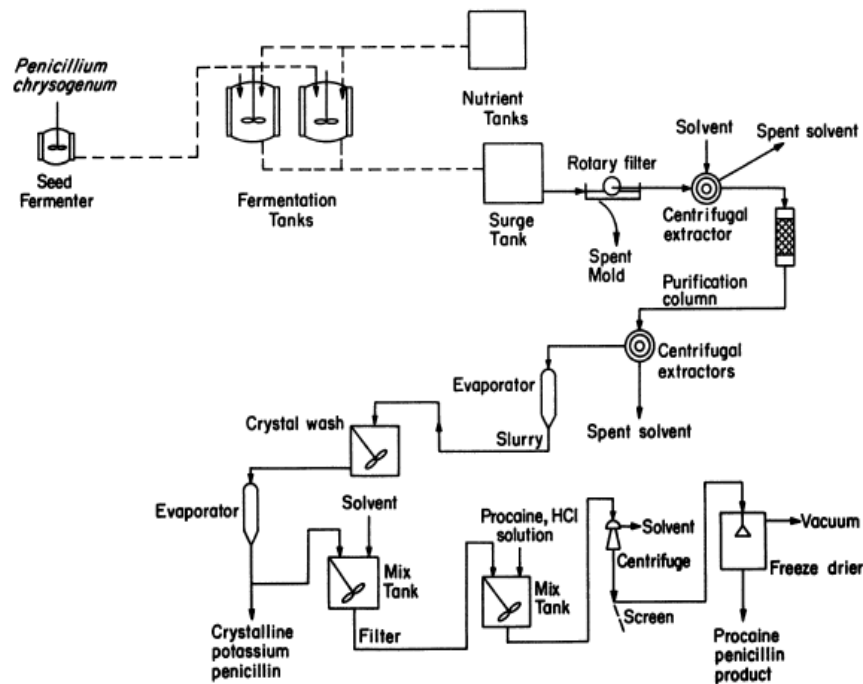
b. Produksi Penisilin

Penisilin pertama kali ditemukan oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 dari *Penicilium notatum*. Penggunaan *strain Penicillium* yang berbeda akan menghasilkan jenis penisilin yang berbeda pula. Di industri, yang paling banyak digunakan adalah *P. chrysogenum*.

P. chrysogenum dapat menggunakan beragam jenis karbohidrat dan minyak sebagai sumber karbon dan energi, misalnya glukosa, sukrosa, pati terhidrolisis, laktosa, dan molasses. Minyak jagung yang dilengkapi dengan laktosa mampu menghasilkan penisilin konsentrasi tinggi dengan laju produksi yang cepat. Pertama kali, diketahui media pertumbuhan sel yang sering digunakan mengandung laktosa 3-4%; *corn steep liquor* 4%; CaCO_3 1%; KH_2PO_4 0,4%; dan *antifoam* 0,25%. Seiring berjalannya waktu, mulai dikembangkan media yang menghasilkan *yield* penisilin lebih tinggi. Untuk beberapa media, komposisi spesifiknya mengandung glukosa atau molasses 10%; *corn steep liquor* 4-5%; *phenylacetic acid* 0,5-0,8%; *vegetable oil* dan *antifoam* dengan konsentrasi total 0,5%.

Corn steep liquor (CSL) digunakan sebagai sumber nitrogen, karena menghasilkan *yield* penisilin yang lebih tinggi dibandingkan dengan sumber nitrogen lainnya. Beberapa komponen dalam CSL dikonversi menjadi *phenylacetic acid*. *Cottonseed flour* atau *soybean meal* dapat digunakan sebagai sumber nitrogen, namun lebih mahal dibandingkan CSL.

Proses untuk produksi penisilin pada mulanya melibatkan fase *batch* dimana terjadi pertumbuhan sel. Pada 40 jam pertama proses fermentasi, pertumbuhan sel yang cepat dapat dicapai dengan *doubling time* hampir 6 jam. Setelah diperoleh densitas sel yang tinggi, nutrisi yang terdiri dari glukosa dan CSL ditambahkan perlahan atau secara bertahap untuk mengurangi pertumbuhan sel dan memaksimalkan produksi penisilin. Pada tahap ini, konsentrasi oksigen, karbon, nitrogen, dan fosfat harus rendah.



Gambar 14.3. Skema proses produksi penisilin (Shuler dan Kargi, 2001)

Diagram sederhana proses produksi penisilin ditunjukkan pada Gambar 14.3. Sel vegetatif dikultivasi dalam *shake flasks* kemudian ditransfer ke *seed fermenter*. Fermentor untuk produksi berupa tangki berpengaduk yang terbuat dari *stainless steel*. Temperatur proses dikendalikan pada 25-28°C menggunakan koil pendingin. *Antifoam* ditambahkan untuk mengurangi pembentukan busa. Oksigen terlarut dijaga pada konsentrasi > 2 mg/L dan pH pada 6,5. Transfer oksigen menjadi masalah utama pada fermentasi penisilin karena *broth* memiliki viskositas yang tinggi. Oleh karena itu, pemilihan *strain* tertentu menjadi penting agar viskositas medium lebih rendah sehingga suplai oksigen meningkat. Menurut Konig dkk. (1981), kecepatan pengadukan yang tinggi juga dapat meningkatkan konsentrasi oksigen terlarut, sehingga fase produksi penisilin lebih singkat, pertumbuhan sel lebih cepat, dan lebih banyak sumber karbon yang terkonversi menjadi CO_2 .

Proses konvensional untuk *recovery* penisilin dari *broth* fermentasi berupa metode adsorpsi menggunakan karbon aktif. Setelah dicuci dengan air, karbon aktif dielusi menggunakan aseton 80%. Penisilin dipekatkan dengan cara evaporasi pada kondisi vakum, temperatur 20-30°C. Larutan yang tersisa didinginkan hingga 2°C, diturunkan pH-nya menjadi 2-3,

kemudian penisilin diekstrak menggunakan *amyl acetate*. Penisilin dikristalisasi dari *amyl acetate* pada pH 7 dan kondisi vakum. Meskipun demikian, proses ini tidak ekonomis karena harga karbon aktif yang tinggi.

Proses *recovery* saat ini meliputi metode filtrasi, ekstraksi, adsorpsi, kristalisasi, dan *drying*. Filtrasi umumnya dilakukan menggunakan *rotary vacuum drum filter* kapasitas tinggi untuk memisahkan *mycelia*. *Mycelia* dicuci pada filter dan dibuang. Filtrat yang mengandung penisilin didinginkan hingga 2-4°C untuk menghindari terjadinya degradasi kimia atau enzimatis dari penisilin.

Ekstraksi *solvent* dilakukan pada pH rendah yaitu 2,5-3 menggunakan *amyl acetate* atau *butyl acetate* sebagai pelarut. Dalam hal ini digunakan *multistage centrifugal extractor*, kontinyu, *countercurrent*. Untuk menghindari degradasi penisilin ketika ekstraksi *solvent* pada pH rendah, temperaturnya dijaga pada 2-4°C dan proses filtrasi dilakukan sangat singkat (1-2 menit). Setelah itu, adsorpsi menggunakan karbon dilakukan untuk menghilangkan pengotor dan pigmen dari *solvent* yang mengandung penisilin setelah proses ekstraksi.

Proses kristalisasi dapat dilakukan pada *solvent* atau fase *aqueous* yang dihasilkan. Konsentrasi penisilin, pH, dan temperatur perlu disesuaikan saat proses kristalisasi. Kristal dipisahkan menggunakan *rotary vacuum filter*, kemudian dicuci menggunakan *anhydrous butyl alcohol* untuk menghilangkan pengotornya. *Belt filter horizontal* digunakan untuk pengumpulan dan pengeringan kristal.

Penisilin dalam bentuk kristal dijual sebagai *intermediate* atau dapat dikonversi menjadi 6-APA (*6-aminopenicillanic acid*) yang digunakan untuk produksi penisilin semi-sintetik. Dari sisi ekonomi, biaya yang paling berpengaruh pada produksi penisilin adalah bahan baku dan utilitas. Oleh karena itu dengan menggunakan bahan baku yang lebih murah, seperti molasses atau pati, serta *strain* yang sudah dikembangkan secara genetik diharapkan mampu menghasilkan *yield* penisilin yang lebih tinggi, dengan biaya produksi yang lebih rendah.

3. Proses Pengolahan Limbah

Secara umum limbah diklasifikasi ke dalam tiga kelompok:

- a. Limbah industri, dimana karakteristiknya bervariasi antara satu industri dengan industri lainnya. Limbah industri biasanya mengandung hidrokarbon, karbohidrat, alkohol, lipid, dan senyawa organik aromatik. Limbah industri banyak mengandung senyawa karbon dengan kandungan nitrogen yang rendah (rasio C/N tinggi). Oleh karena itu, pengolahan limbah industri secara biologi biasanya memerlukan tambahan komponen nitrogen dan nutrisi lainnya
- b. Limbah domestik, yang dihasilkan dari aktivitas manusia sehari-hari. Jumlah dan komposisi limbah domestik bervariasi terhadap waktu, tergantung pada aktivitas manusia
- c. Limbah pertanian, diantaranya termasuk limbah tanaman seperti jerami. Jenis limbah ini biasanya banyak mengandung karbon karena tingginya kandungan selulosa

Ketiga jenis limbah tersebut memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Metode pengolahannya pun beragam tergantung pada karakteristiknya. Tiga metode pengolahan limbah yang paling umum adalah:

- a. Pengolahan secara fisik (*physical treatment*) meliputi *screening*, flokulasi, sedimentasi, filtrasi, dan flotasi dimana metode ini sering digunakan untuk menghilangkan bahan tidak terlarut (*insoluble material*)
- b. Pengolahan secara kimia (*chemical treatment*) meliputi oksidasi kimia (klorinasi, ozonisasi) dan pengendapan secara kimia menggunakan CaCl_2 , FeCl_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, atau $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
- c. Pengolahan secara biologi (*biological treatment*) meliputi pengolahan limbah aerobik dan anaerobik menggunakan mikroorganisme kultur campuran (*mixed culture*)

Karakteristik pada air limbah harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pengolahan, diantaranya karakteristik fisik seperti warna, bau, pH, suhu, dan kandungan padatan (*suspended* dan *dissolved solid*); serta karakteristik kimia seperti komponen organik dan anorganik.

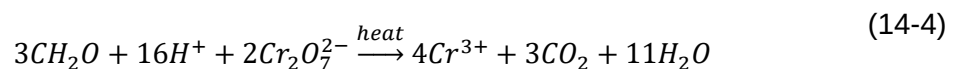
Senyawa karbon yang banyak terdapat dalam limbah industri adalah karbohidrat, lipid, minyak, hidrokarbon, dan protein. Komponen lainnya seperti fenol, surfaktan, herbisida, pestisida, dan senyawa aromatik biasanya ada dalam konsentrasi yang rendah ($\ll 1 \text{ g/L}$) tetapi sulit untuk didegradasi secara

biologi. Senyawa anorganik juga seringkali terdapat dalam limbah seperti diantaranya senyawa nitrogen (NH_4^+ dan NO_3^-), sulfur (SO_4^{2-} , SO_3^{2-}), fosfor (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), logam berat (Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}), dan gas terlarut (H_2S , NH_3 , CH_4).

Kandungan karbon dalam sampel air limbah dapat dinyatakan dalam bentuk *biological oxygen demand* (BOD), *chemical oxygen demand* (COD), dan *total organic carbon* (TOC). BOD₅ menunjukkan jumlah oksigen terlarut yang dikonsumsi ketika sampel air limbah diumpankan bakteri aktif dan diinkubasi pada 20°C selama 5 hari. Jumlah oksigen yang dikonsumsi dapat merepresentasikan kandungan senyawa organik dalam air limbah.

COD merupakan ukuran konsentrasi senyawa organik dalam limbah yang dapat teroksidasi secara kimia. Senyawa organik dioksidasi menggunakan oksidator kuat, dan berdasarkan stoikiometri reaksi, kandungan senyawa organik dapat dihitung. Hampir semua senyawa organik dalam limbah mampu dioksidasi oleh *chemical oxidant*. Oleh karena itu, nilai COD dari suatu sampel limbah biasanya lebih tinggi dari BOD terukur ($\text{COD} > \text{BOD}_5$).

Misalnya untuk reaksi oksidasi kimia berikut,



dikromat dapat digunakan sebagai *oxidizing agent*, dan berdasarkan keseimbangan redoks, jumlah oksigen yang diperlukan untuk mengoksidasi senyawa organik dapat dihitung. Metode ini lebih cepat, mudah, dan lebih murah dibandingkan dengan pengukuran BOD.

Kandungan TOC dalam sampel limbah dapat ditentukan menggunakan TOC *analyzer*. Setelah proses pelarutan, sampel diinjeksi ke dalam *furnace* temperatur tinggi (680-1350°C), lalu semua senyawa karbon organik dioksidasi menjadi CO_2 yang diukur menggunakan *infrared analyzer*. Untuk menentukan kandungan TOC, sampel limbah harus diasamkan untuk menghilangkan senyawa karbon anorganik. Kandungan total karbon pada air limbah dapat ditentukan sebelum dan setelah asidifikasi, dan perbedaannya menunjukkan kandungan senyawa karbon anorganik.

Metode pengolahan limbah secara biologi umumnya meliputi tiga tahapan, yaitu:

- a. *Primary treatment* mencakup penghilangan padatan berukuran besar dan bahan tersuspensi (*screening*, sedimentasi, filtrasi) serta pengkondisian air

limbah dengan penyesuaian pH dan penambahan nutrisi seperti PO_4^{3-} dan NH_4^+

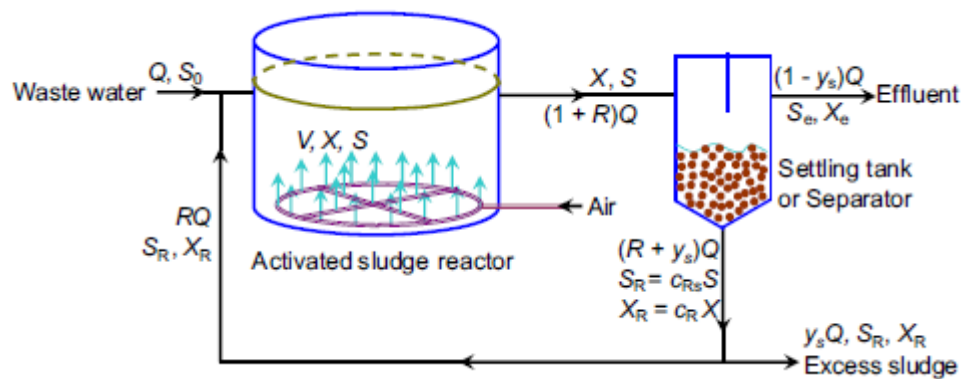
- b. *Secondary treatment* merupakan tahapan utama pada pengolahan limbah secara biologi. Tahapan ini meliputi oksidasi biologi atau pengolahan senyawa organik (*soluble* dan *insoluble*) secara anaerob. Senyawa organik dioksidasi menjadi CO_2 dan H_2O oleh mikroorganisme pada kondisi aerobik. Senyawa organik yang tidak teroksidasi serta padatan dari *treatment* aerobik didekomposisi menjadi CH_4 , CO_2 , dan H_2S pada kondisi anaerob.
- c. *Tertiary treatment* meliputi penghilangan sisa senyawa anorganik (seperti fosfat, sulfat, amonium) dan senyawa organik yang sulit diproses melalui satu atau lebih metode separasi secara fisik, misalnya adsorpsi karbon dan *deep-bed filtration*. Pada beberapa kasus dapat digunakan teknologi berbasis membran seperti *reverse osmosis* atau elektrodialisis.

a. Pengolahan Limbah secara Biologi

Pengolahan limbah secara biologi biasanya memanfaatkan kultur campuran mikroorganisme. Pengolahan ini dapat dilakukan secara aerobik maupun anaerobik. Proses aerobik yang umum digunakan untuk pengolahan limbah diantaranya *activated sludge*, *trickling filter*, *rotating biological contactors*, dan *oxidation ponds*. Pada bagian ini akan dijelaskan satu proses yang paling umum, yaitu *activated sludge*.

Skema pengolahan limbah dengan metode *activated sludge* ditunjukkan pada Gambar 14.4. Unit proses *activated sludge* meliputi reaktor kontinu dengan aerasi, serta *settling tank*. *Concentrated cell* dari *settling tank* direcycle kembali ke dalam reaktor. Penggunaan kultur campuran sering dimanfaatkan dalam bioreaktor. Beberapa mikroorganisme dalam kultur campuran ini dapat menghasilkan polisakarida yang membantu sel untuk saling bergabung membentuk flok. Pembentukan flok ini penting untuk memudahkan proses sedimentasi

Recycle sel dari unit sedimentasi dapat meningkatkan laju volumetrik oksidasi biologi, sehingga mengurangi *residence time* atau volume reaktor. Rasio *recycle* juga perlu dikendalikan untuk memaksimalkan laju penghilangan BOD.



Gambar 14.4. Skema unit proses *activated sludge* (Liu, 2013)

Pemilihan aerator merupakan faktor penting dalam desain proses *activated sludge*. Kebutuhan aerasi bervariasi tergantung pada sifat limbah dan konsentrasi sel. Kebutuhan oksigen untuk *activated sludge* umumnya sekitar 30-60 m³-O₂/kg BOD yang dihilangkan (Liu, 2013).

Berbagai modifikasi dari proses *activated sludge* telah dikembangkan, dua diantaranya adalah:

- 1) *Step feed process*. Pada proses ini, aliran umpan didistribusi di sepanjang reaktor. Hal ini membuat lebih stabil dan lebih efektif dalam hal transfer oksigen dan konsumsi oksigen bagi mikroorganisme
- 2) *Solids reaeration (contact stabilization)*. Pada proses *activated sludge* konvensional, senyawa organik terlarut dapat diserap dengan cepat ke dalam flok, sementara konversi senyawa organik menjadi CO₂ dan H₂O menjadi lambat. Pada *contact stabilization*, dua tangki digunakan: tangki pertama (*residence time* sekitar 1 jam) digunakan untuk mempercepat serapan senyawa organik; sementara tangki kedua (*residence time* 3-6 jam) digunakan untuk reaerasi dan konversi akhir bahan organik. Dengan memekatkan *sludge* sebelum proses oksidasi, maka volume total tangki yang diperlukan untuk aerasi bisa berkurang hingga 50% dibandingkan dengan sistem konvensional.

C. Latihan Soal

1. Berikan contoh lain dari proses aerobik dalam industri bioproses kemudian paparkan prosesnya secara singkat!

2. Berikan contoh lain dari proses anaerobik dalam industri bioproses kemudian paparkan prosesnya secara singkat!
3. Jelaskan tentang proses trickling filter untuk pengolahan limbah, kemudian tuliskan kelebihan dan kekurangannya jika dibandingkan dengan proses activated sludge!

B. Daftar Pustaka

- Dutta, R (2008), *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Springer, India
- Konig, B., Seewald, Ch., dan Schugerl, K. (1981), *Process Engineering Investigations of Penicillin Production*, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12(205-211)
- Liu, S (2013), *Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*, First Edition 2013, Elsevier
- Shuler ML dan Kargi F (2001), *Bioprocess Engineering*, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) *Biochemical Engineering*, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.
- Alistair Rogers and Yves Gibon, Chapter 4 Enzyme Kinetics: Theory and Practice, https://www.researchgate.net/publication/281220476_Enzyme_kinetics_Theory_and_practice, diunduh 25 November 2021
- August, P.R., Yu, T-N and Floss, H.G. "Molecular biological aspects of antibiotic biosynthesis." *Drug Discovery from Nature*. Ed. Grabley, S and Thiericke, R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. 215-232.
- Back, J. G., (1996). *Microbiology: Principles and Applications*, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Bader FG (1986) Sterilization: Prevention of contamination. In: Demain A and Solomon NA (eds.) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 345–361. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Bisswanger H (2002) *Enzyme Kinetics, Principals and Methods*. Wiley-VCH Weinheim, Germany
- Cornish, A. and Bowden, (2012). *Fundamentals of enzyme kinetics*, fourth edition, Wiley-Blackwell, chapter 2. <https://www.facebook.com/pages/Ebooks-Chemical-Engineering/238197077030>
- Dong-MeiLiu, Juan Chen, Yan-PingShi, (2018) Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 102, 332-342
- Doran, P.M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd edition, Academic Press
- Dutta, R (2008), *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Springer, India
- Gottschalk U (2011) Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry, Elsevier, p 670-681
- Homaei, AA., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R., (2013) Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol* 6:185–205, DOI 10.1007/s12154-013-0102-9

- Konig, B., Seewald, Ch., dan Schugerl, K. (1981), Process Engineering Investigations of Penicillin Production, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12(205-211)
- Liu, S. and Suny Esf, (2013), *Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*, First Edition 2013, Elsevier
- Luna, C.; Luna, D.; Calero, C; Bautista, F. M.; Romero, A.A.; Posadillo, A.; Verdugo, C. 2016. Chapter 7. Biochemical catalytic production of biodiesel. *Handbook of Biofuels Production* (R. Luque, C. Sze Ki Lin, K. Wilson, J. Clark. Woodhead Publishing (Elsevier). Pages 165-199. DOI: 10.1016/B978-0-08-100455-5.00007-2
- Nisha S, Arun Karthick S and Gobi N (2012), A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, *Che Sci Rev Lett* 2012, 1(3), 148-155
- Petrides. D.P, Calandranis, N.J. and Conney, C.L. 2006. Dalam Brock, T.d et al, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2 nd ed. ASM Press, Washington, D.C. Back, J. G., (1996). *Microbiology: Principles and Applications*, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Raja Ghos, (2006) *Principles Of Bioseparations Engineering*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore
- Selvaraj Raja, Vytla Ramachandra Murty, Varadavenkatesan Thivaharan, Vinayagam Rajasekar, Vinayagam Ramesh (2011) *Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review*, *Science and Technology*, 1(1): 7-16
- Shigeo Katoh, Jun-ichi Horiuchi, and Fumitake Yoshida (2015). *Biochemical Engineering, Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*, Second Completely Revised and Enlarged Edition, WILEY-VCH.
- Shuler ML dan Kargi F (2001) *Bioprocess Engineering*, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.
- Singhal, G., Verma, V., Bhagyawant, S.S., Srivastava, S., *Fermentation Technology Prospecting on Bioreactors/Fermenters: Design and Types dalam Applications of Fermentation Technology* (2018). Arindam Kuila, A. (editor) and Vinay Sharma (editor), John Wiley & Sons, Inc. and Scrivener Publishing LLC.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). *Principles of Fermentation Technology*, 2nd, Pergamon Press
- Richards JW (1968) *Introduction to Industrial Sterilisation*. London: Academic Press.

- Wallhäusser KH, (1985) Chapture Sterilisation. In: Rehm H-J and Reed G (eds.) Sterilisation: Biotechnology, vol. 2, pp. 700–716. Weinheim: VCH.
- Willey, J., Sandman, K. and Wood, D. (2020). Prescott's Microbiology, 11th Edition, McGraw-Hill Higher Education

RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER (RPS)

Program Studi	: Teknik Kimia S-1	Mata Kuliah/Kode	: Teknologi Bioproses/TKM0312
Prasyarat	: -	Sks	: 2 Sks
Semester	: IV	Kurikulum	: KKNi
Deskripsi Mata Kuliah	: Mata kuliah Teknologi Bioproses merupakan mata kuliah wajib program studi Teknik Kimia yang mempelajari tentang pengantar bioproses secara umum; sel mikroorganisme; isolasi, skrining, preservasi, dan pengembangan mikroba industri; dasar fermentasi; sterilisasi; kinetika pertumbuhan sel; bioreaktor; proses hilir; enzim dan kinetikanya; imobilisasi enzim; serta aplikasi dan industri bioproses	Capaian Pembelajaran	: Setelah mempelajari mata kuliah ini mahasiswa mampu menganalisis proses biokimia dan aspek teknis dalam bioproses secara komprehensif termasuk komponen-komponen pendukung dan aplikasinya
Penyusun	: 1. Dr. Ir. Ahmad Wibisana, M.T. 2. Rifkah Akmalina, S.T., M.T.		

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1	Mahasiswa mampu: - Memahami definisi dan ruang lingkup bioproses serta keterkaitannya dengan ilmu-ilmu lain - Memahami prinsip, keunggulan, dan kelemahan bioproses - Memahami perkembangan industri bioproses - Memahami aplikasi bioproses	Pengantar Bioproses	Ceramah dan diskusi	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
2	Mahasiswa mampu: - Memahami keanekaragaman hayati - Memahami klasifikasi organisme - Memahami komposisi kimiawi sel dan fungsinya	Sel Mikroorganisme	Ceramah, diskusi dan latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%
3	Mahasiswa mampu: - Memahami pengertian mikroba industri dan karakteristiknya - Memahami teknik-teknik isolasi,	Isolasi, Skrining, Preservasi dan Pengembangan Mikroba Industri	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	skrining, dan identifikasi mikroorganisme 3. Memahami teknik- teknik preservasi dan pengembangan mikroba industri					
4	Mahasiswa mampu: 1. Memahami sejarah perkembangan proses fermentasi 2. Memahami formulasi medium untuk proses fermentasi 3. Memahami jenis- jenis fermentasi	Dasar-Dasar Fermentasi	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
5	Mahasiswa mampu: 1. Memahami prinsip sterilisasi medium pada proses fermentasi 2. Memahami prinsip sterilisasi udara pada proses fermentasi	Sterilisasi	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%
6	Mahasiswa mampu: 1. Memahami kinetika pertumbuhan sel untuk kultur curah 2. Memahami perhitungan perolehan sel dinyatakan terhadap	Kinetika Pertumbuhan Sel	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	konsumsi bahan yang lain 3. Memahami kinetika pertumbuhan sel dengan model Monod dan model penghambatan					
7	Mahasiswa mampu memahami jenis-jenis bioreaktor, prinsip kerja dan aplikasinya	Bioreaktor	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	8%
UTS						
8	Mahasiswa mampu: 1. Memahami aspek kinerja bioreaktor	Rekayasa Bioreaktor	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	2. Memahami dasar perancangan bioreactor 3. Memahami cara untuk mencapai dan mempertahankan kondisi aseptik				pertanyaan	
9	Mahasiswa mampu: 1. Memahami tahapan proses hilir 2. Memahami teknik-teknik klarifikasi kaldu (<i>broth</i>) fermentasi dan <i>recovery</i> sel	Proses Hilir: Klarifikasi dan Rekoveri Sel	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%
10	Mahasiswa mampu: 1. Memahami teknik-	Proses Hilir: Isolasi dan	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	teknik untuk isolasi produk 2. Memahami teknik-teknik untuk pemurnian produk 3. Memahami teknik-teknik perlakuan akhir produk	Pemurnian			ketepatan menjawab pertanyaan	
11	Mahasiswa mampu: 1. Memahami klasifikasi dan tata nama enzim 2. Memahami kerja enzim 3. Memahami struktur dan bagian enzim 4. Memahami	Enzim	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	karakteristik penting enzim 5. Memahami faktor-faktor yang berpengaruh					
12	Mahasiswa mampu: 1. Memahami kinetika reaksi enzimatis 2. Memahami jenis-jenis inhibisi enzim dan mekanismenya	Kinetika Enzim	Ceramah, Diskusi dan Latihan	Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%
13	Mahasiswa mampu: 1. Memahami teknik-teknik imobilisasi enzim 2. Memahami aplikasi	Imobilisasi Enzim	Presentasi, diskusi	Presentasi dan Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	7%

PERTEMUAN KE-	KEMAMPUAN AKHIR YANG DIHARAPKAN	POKOK BAHASAN	METODE PEMBELAJARAN	PENGALAMAN BELAJAR	KRITERIA PENILAIAN	BOBOT NILAI
	enzim amobil					
14	Mahasiswa mampu menganalisis teknologi bioproses dengan menggunakan aplikasi ilmu bioproses di industri, khususnya dalam produksi <i>chemicals</i> dan pengolahan air limbah	Aplikasi dan Industri Bioproses	Presentasi, diskusi	Presentasi dan Diskusi	Keaktifan berdiskusi dan ketepatan menjawab pertanyaan	8%
UAS						

Referensi:

Aiba S, Humphrey AE, and Millis N (1973) Biochemical Engineering, pp. 271–301. New York, NY: Academic Press.

Back, J. G., (1996). Microbiology: Principles and Applications, 3d ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Doran, P.M. (2013). Bioprocess Engineering Principles, 2nd edition, Academic Press

Liu, S. and Suny Esf, (2013), Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, First Edition 2013, Elsevier

Shuler ML dan Kargi F (2001) Bioprocess Engineering, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc.

Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1995). Principles of Fermentation Technology, 2nd, Pergamon Press

Ketua Program Studi

Tangerang Selatan, Februari 2022
Ketua Tim Penyusun

Ir. Wiwik Indrawati, M.Pd
NIDN. 0429036203

Dr. Ir. Ahmad Wibisana, M.T
NIDK. 8863500016