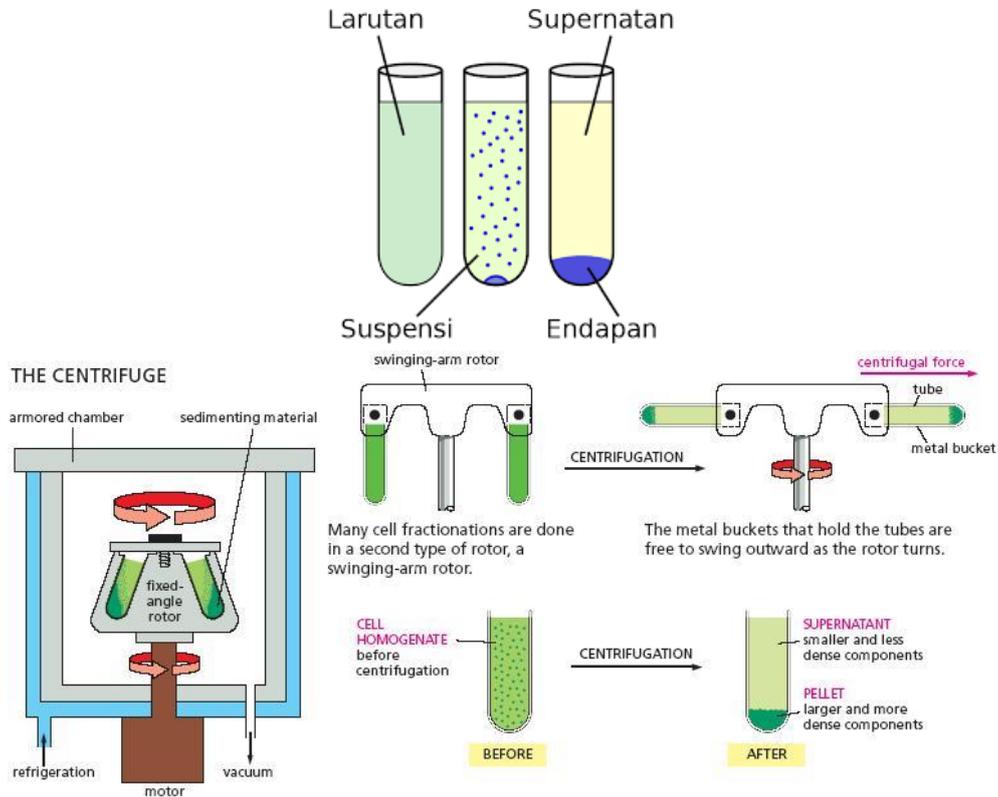


MODUL

MIKROBIOLOGI INDUSTRI



*Penapisan/Pengendapan Supernatan
dan Purifikasi Produk*

Prof. Dr. Ir. Hesty Heryani, M.Si., IPU., ASEAN Eng



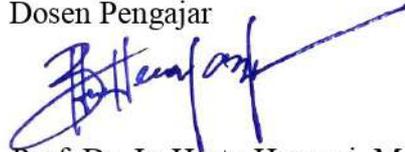
Universitas Lambung Mangkurat
2022

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Modul : PENAPISAN/PENGUNDUHAN SUPERNATAN
DAN PURIFIKASI PRODUK
Mata Kuliah : Mikrobiologi Industri
Kode mata Kuliah : EIBB 204
Dosen Pengajar : Prof. Dr. Ir. Hesty Heryani, M.Si., IPU., ASEAN Eng
Fakultas : Jurusan Teknologi Industri Pertanian,
Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat

Banjarbaru, 23 Maret 2022

Dosen Pengajar



Prof. Dr. Ir. Hesty Heryani, M.Si., IPU., ASEAN Eng
NIP. 19670620 199203 2 002

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL.....	vi
PENDAHULUAN.....	1
Deskripsi Singkat Mata Kuliah.....	1
Tujuan Pembelajaran	1
<i>Learning Outcomes</i> (Capaian Pembelajaran)	1
Ruang Lingkup Pokok Bahasan Modul.....	2
MATERI PEMBELAJARAN PENAPISAN/PENGUNDUHAN SUPERNATAN DAN PURIFIKASI PRODUK	3
Pengunduhan Produk Intrseluler dan Ekstraseluler	4
Bakteri Isolat Lokal Penghasil Biosurfaktan	5
Penentuan Isolat Lokal Terbaik.....	8
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan	10
pH.....	10
Suhu.....	12
Agitasi dan Aerasi	12
Faktor Lain Yang Berpengaruh Terhadap Produksi Biosurfaktan	14
Metode-Metode Pengunduhan Dalam Pengembangan dan Purifikasi Produk Metabolit Base Mikroba.....	15
Sentrifugasi	15
<i>Tubular Bowl Centrifuge</i>	17
<i>Disc Bowl Centrifuge</i>	17
<i>Perforate Bowl Basket Centrifuge</i>	18
<i>Zonal Ultracentrifuge</i>	19
Koagulasi dan Flokulasi	19
Sel Utuh.....	19
Sel Hancur dan Protein.....	20
Pemurnian Cairan Fermentasi Dalam Jumlah Besar Sebagai Produk	20
Metode Purifikasi	20
Filtrasi.....	21

Presipitasi	21
Pemurnian Asam Sitrat	22
Pemurnian lanjut	22
Kromatografi Filtrasi Gel	23
Kromatografi Pertukaran Ion	25
LATIHAN (EVALUASI MANDIRI)	30
DAFTAR PUSTAKA	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat lokal BMN 14 (□) dan BMN 27 (△) serta kondisi tegangan permukaan BMN 14 (×) dan BMN 21 (*)	7
Gambar 2. Pola biosurfaktan BMN 14 (□) dan BMN 27 (△) serta tegangan permukaan BMN 14 (×) dan BMN 27 (*) selama fermentasi	8
Gambar 3. Hubungan antara berbagai konsentrasi ekstrak kasar terhadap tegangan permukaan	11
Gambar 4. <i>Tubular Bowl Centrifuge</i>	17
Gambar 5. <i>Disc Bowl Centrifuge</i>	18
Gambar 6. <i>Perforate Bowl Basket Centrifuge</i>	18
Gambar 7. <i>Zonal Ultracentrifuge</i>	19
Gambar 8. Pemurnian Produk Fermentasi	20
Gambar 9. Pemurnian enzim dengan filtrasi gel	23
Gambar 10. Pemurnian enzim dengan kromatografi pertukaran ion	27

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi media untuk propagasi dan fermentasi	6
---	---

PENDAHULUAN

Deskripsi Singkat Mata Kuliah

Mata kuliah Mikrobiologi Industri menjelaskan terkait pengertian, cakupan dan dasar mikrobiologi industri, industri fermentasi, bioteknologi industri, teknik isolasi dan peningkatan kinerja, pemeliharaan kultur mikrobial potensial dalam industri, proses produksi dalam bioreaktor, penapisan supernatan dan purifikasi produk, produksi metabolit primer dan sekunder, biokonversi steroid serta protein sel tunggal, pengelolaan limbah ramah lingkungan serta studi kasus relevan.

Tujuan Pembelajaran

Diakhir Perkuliahan diharapkan Mahasiswa memiliki pengetahuan, pemahaman, dan kemampuan untuk menganalisis serta menghasilkan produk bernilai tambah tinggi *base* mikroorganisme, pemahaman industri fermentasi, bioteknologi industri, teknik isolasi dan peningkatan kinerja, pemeliharaan kultur mikrobial potensial dalam industri, proses produksi dalam bioreaktor, penapisan supernatan dan purifikasi produk, produksi metabolit primer dan sekunder, biokonversi steroid serta protein sel tunggal, pengelolaan limbah ramah lingkungan serta kemampuan dalam menganalisis peran mikrobiologi industri dalam penciptaan nilai tambah produk sesuai dengan capaian pembelajaran (LO) mengacu pada sikap, pengetahuan, keterampilan umum dan keterampilan khusus untuk ke depan.

***Learning Outcomes* (Capaian Pembelajaran)**

1. Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan prinsip-prinsip dasar pengembangan mikroorganisme yang berperan dalam industri
2. Mahasiswa mampu menerapkan prinsip-prinsip dimaksud untuk keperluan

proses dalam industri fermentasi maupun bioteknologi

3. Mahasiswa mampu menganalisis atas dasar *feed*-standar proses-output mengacu pada *outcome* yang diharapkan.
4. Mahasiswa mampu mengevaluasi kinerja proses produksi base mikroorganisme industri
5. Mahasiswa mampu memecahkan permasalahan yang ditemui dari *feed* hingga hasil akhir base *value added*.
6. Mahasiswa mampu mengelola limbah industri secara berkelanjutan

Ruang Lingkup Pokok Bahasan Modul

Materi membahas terkait mikrobial yang umumnya terlibat dalam fermentasi, bakteri isolat lokal penghasil biosurfaktan, kurva pertumbuhan isolat lokal, penentuan isolat lokal terbaik pola yang memperlihatkan kemampuan kedua isolat tersebut memproduksi biosurfaktan dan menurunkan tegangan, faktor-faktor yang mempengaruhi produksi biosurfaktan, faktor lain yang berpengaruh terhadap produksi biosurfaktan, metode-metode pengunduhan dalam pengembangan dan purifikasi produk metabolit base mikroba dan pemurnian cairan fermentasi dalam jumlah besar sebagai produk.

MATERI PEMBELAJARAN

PENAPISAN/PENGUNDUHAN SUPERNATAN DAN PURIFIKASI PRODUK

Kaldu (*broth*) atau cairan fermentasi yang dihasilkan dari proses dalam bioreaktor/fermentor, belum mempunyai nilai komersial. Seiring perkembangan teknologi, fermentasi merupakan seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan mikroorganisme yang melibatkan enzim yang dihasilkannya. Dengan kata lain, fermentasi adalah perubahan struktur kimia dari bahan-bahan organik dengan memanfaatkan agen-agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis. Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi 4 jenis:

1. Produk biomassa
2. Produk enzim
3. Produk metabolit
4. Produk transformasi

Mikrobia yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Contoh bakteri yang digunakan dalam fermentasi adalah *Acetobacter xylinum* pada pembuatan nata decoco, *Acetobacter aceti* pada pembuatan asam asetat. Contoh khamir dalam fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan alkohol sedang contoh kapang adalah *Rhizopus sp* pada pembuatan tempe, *Monascus purpureus* pada pembuatan angkak dan sebagainya (Isroi, 2008).

Kaldu atau cairan fermentasi ini perlu dipisahkan dan dimurnikan dari zat-zat pelarut, dan biomassa. Pemisahan dan pemurnian kaldu fermentasi dilakukan dalam proses hilir (*downstream processing*), umumnya sangat sulit dan mahal. Biaya untuk proses tersebut bervariasi dari 20% sampai dengan 60% dari biaya

total produksi. Oleh karena itu pemilihan proses fermentasi harus dilihat dilihat secara integral (bukan hanya proses fermentasi tetapi juga proses dari pemurnian (purifikasi) atau proses hilirnya.

Pengunduhan Produk Intrseluler dan Ekstraseluler

Untuk produk dengan biaya besar perlu pemilihan proses yang tepat dan efisien. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan proses pengunduhan dan pemurnian produk:

1. Lokasi produk di dalam sel (intrseluler) atau luar sel (ekstraseluler)
2. Proses fermentasi yang dilaksanakan (kultur padat/cair)
3. Sifat-sifat fisik dan kimia dari produk yang diinginkan (misalnya ukuran, muatan, kelarutan dari produk menentukan pilihan prosedur proses. Oleh karena itu unit operasi yang digunakan untuk perolehan produk dan purifikasi dan prinsip-prinsip pemisahan
4. Kandungan substransi lain dalam cairan yaitu jumlah zat pengotor (*impurities*) dalam kaldu fermentasi
5. Bentuk produk yang diinginkan (padat, cair, atau kristal)
6. Standar kemurniaan produk
7. Nilai ekonomis produk

Jika produk ekstraseluler yang diinginkan, maka dilakukan pemisahan sel dari produk sehingga diambil cairan bebas sel yang selanjutnya dipekatkan dan dimurnikan. Kemudian produk yang terdapat di dalam sel (intraseluler) dapat dilepaskan dengan cara pemecahan sel dan kemudian dimurnikan lebih lanjut.

Menurut Hesty (1998) mikroba memiliki potensi untuk menghasilkan bahan aktif permukaan (*surface-active agents*) yang bersifat *biodegradable* yang dikenal

dengan biosurfaktan. Berdasarkan perkembangan industri yang pesat seperti industri farmasi, kosmetik, deterjen, cat, kertas dan *coating*, plastik dan lainnya mengakibatkan kebutuhan akan bahan aktif seperti biosurfaktan semakin meningkat (McKane dan Kandel, 1985). Biosurfaktan mengandung senyawa aktif seperti halnya biosurfaktan sintetik, akan tetapi dengan keunggulan sifat yang dapat terurai secara biologis; sehingga dengan demikian penggunaannya di industri merupakan salah satu penerapan teknologi bersih (*cleaner technology*) (Hesty, 1998).

Biosurfaktan terdiri dari berbagai kelompok dan bersifat tak beracun. Kelompok tersebut antara lain adalah glikolipida, lipopeptida, asam lemak, dan fosfolipida, tergantung pada jenis mikroba penghasilnya (Fiechter, 1992). Diantara biosurfaktan, lipopeptida merupakan salah satu jenis yang terpenting, dihasilkan antara lain oleh *Bacillus sp* yang dikenal salah satunya dengan nama komersial *Surfactin* (Hesty, 1998).

Bakteri Isolat Lokal Penghasil Biosurfaktan

Mikroba yang dipergunakan dalam penelitian Hesty (1998) merupakan bakteri isolat lokal yang diisolasi dari contoh tanah yang tercemar oleh minyak nabati berdasarkan hasil identifikasi dengan metoda Morikawa *et al.*, (1992) menunjukkan bahwa mikroba isolat lokal BMN 14 dan BMN 27 yang berasal dari hasil isolasi peneliti sebelumnya (Richana, 1997) termasuk ke dalam genus *Bacillus sp*.

Dalam persiapan sediaan mikroba yang dilakukan Hesty (1998) isolat mikroba ditumbuhkan pada media nutrien agar (NA) kemudian disuspensikan secara aseptis pada media nutrien broth (NB) perbandingan 1:1. Kemudian

selanjutnya ditumbuhkan kembali pada media nutrisi agar dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan yang diperoleh inilah yang diperbanyak dan disebarkan sebagai inokulum bilamana melakukan propagasi.

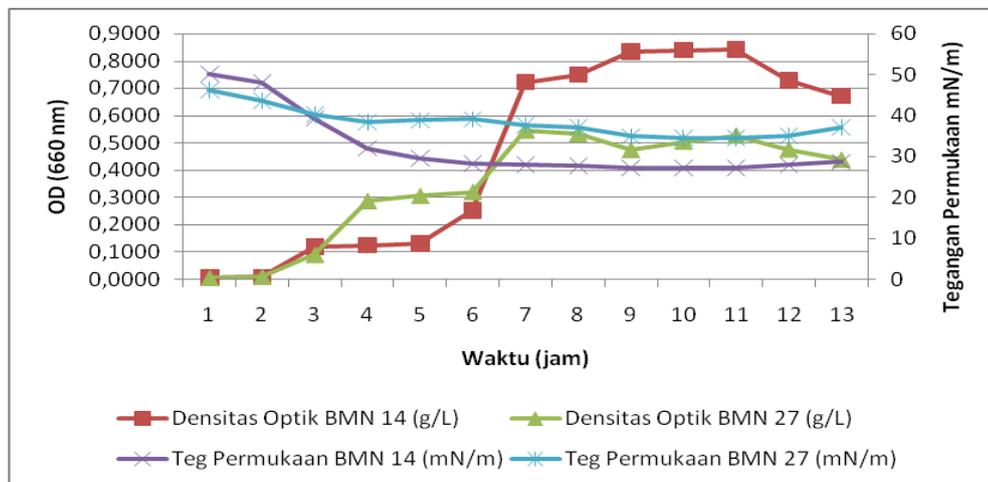
Proses propagasi dilakukan dengan menggunakan inokulum dari NA menggunakan jarum ose pada semua bagian yang ditumbuhi mikroba. Selanjutnya dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi media glukosa dan garam mineral sebanyak 50 ml disajikan pada Tabel 1. Selanjutnya dengan menggunakan *waterbath shaker* pada agitasi 140 rpm, suhu 37°C proses terus berjalan hingga diperoleh kenampakan busa dan tingkat kekeruhan (densitas optik) yang optimum (pada jam ke berapa diperoleh kondisi ini diamati pada penentuan waktu propagasi). Sebanyak 10 % dari media fermentasi, inokulum hasil propagasi, diambil kemudian ditambahkan pada masing-masing media fermentasi dan digunakan untuk produksi biosurfaktan.

Tabel 1. Komposisi media untuk propagasi dan fermentasi

Komposisi Media	Konsentrasi
NH ₄ NO ₃	0,04 M, 0,05 M dan 0,06 M (sesuai perlakuan)
KH ₂ PO ₄	0,03 M
Na ₂ HPO ₄	0,04 M
MgSO ₄	8,0 x 10 ⁻⁴ M
CaCl ₂	7,0 x 10 ⁻⁶ M
FeSO ₄	4,0 x 10 ⁻⁶ M
Na ₂ EDTA	4,0 x 10 ⁻⁶ M
Glukosa	1%, 3%, 5% dan 7% (sesuai perlakuan)

Sumber : Hesty, 1998

Berdasarkan penelitian Hesty (1998) didapatkan kurva pertumbuhan isolat lokal penghasil biosurfaktan dengan pengamatan setiap tiga jam terhadap OD pada panjang gelombang 600 nm dan tegangan permukaan media fermentasi. Hasil pengukuran yang diperoleh diberikan pada Gambar 1.



Sumber : Hesty, 1998

Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat lokal BMN 14 (□) dan BMN 27 (△) serta kondisi tegangan permukaan BMN 14 (×) dan BMN 21 (*)

Pada Gambar 1 terlihat produksi biomassa yang ditunjukkan dalam nilai OD yang meningkat tajam setelah 12 jam pertumbuhan. Kedua isolat ini merupakan isolat lokal yang belum pernah diteliti sebelumnya dengan menggunakan komposisi media fermentasi pada Tabel 3. Pola pertumbuhan dengan fase lag kurang lebih 11 jam dan ini hampir sama dengan hasil penelitian Sheppard dan Cooper (1991) menggunakan ATCC 21332 dengan sumber C yang sama yaitu glukosa dan sumber N dari $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ternyata fase adaptasi selama 11-12 jam.

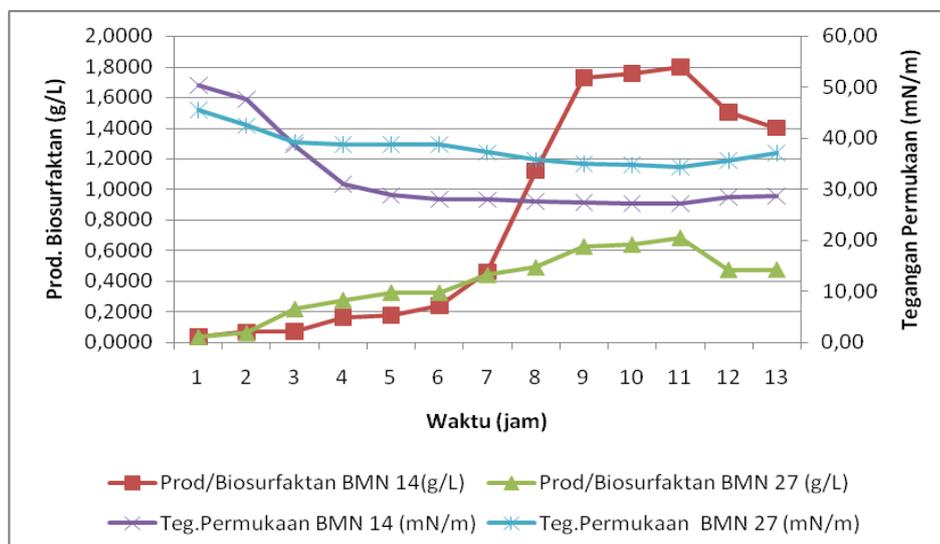
Penurunan tegangan permukaan yang tajam terjadi pada jam ke-9 terutama pada isolat BMN 14, sedangkan tegangan permukaan terendah dicapai pada jam ke-30. Rendahnya tegangan permukaan memberikan petunjuk bahwa bahan aktif yang berupa biosurfaktan yang diproduksi tinggi. Hal ini terlihat pada pengamatan

secara visual dari jam ke-6 ke jam ke-9, ternyata terjadi perubahan pada jumlah busa dari cairan fermentasi.

Pada kurva pertumbuhan memperlihatkan fasa eksponensial dari bakteri isolat lokal berlangsung dari jam ke 9 hingga jam ke 30. Pengamatan pada nilai OD menunjukkan pada jam ke 24 hingga jam ke 30 memiliki kisaran OD hampir konstan yaitu 0,832 – 0,841 g/L dengan tegangan permukaan 27,25 – 27,35 mN/m. Nilai OD pada jam ke-24 sampai jam ke-30 inilah yang diacu pada penelitian selanjutnya sebagai waktu propagasi untuk masuk ke fermentasi.

Penentuan Isolat Lokal Terbaik

Kedua isolat telah dibuktikan menghasilkan endapan asam dan mampu menurunkan tegangan permukaan hingga 30 mN/m, yang merupakan indikasi bahwa isolat dari tanah tercemar minyak nabati tersebut mampu memproduksi biosurfaktan (Hesty, 1998). Pola yang memperlihatkan kemampuan kedua isolat tersebut memproduksi biosurfaktan dan menurunkan tegangan diperlihatkan pada Gambar 2.



Sumber : Hesty, 1998

Gambar 2. Pola biosurfaktan BMN 14 (□) dan BMN 27 (△) serta tegangan permukaan BMN 14 (×) dan BMN 27 (*) selama fermentasi

Pada Gambar 2 terlihat isolat BMN 14 mampu menurunkan tegangan permukaan hingga 27,20 mN/m, sedangkan BMN 27 hingga 34,25 mN/m. Hasil biosurfaktan tertinggi diberikan oleh isolat BMN 14 pada jam ke 30 dengan perolehan biosurfaktan 1,796 g/L, sedangkan BMN 27 hanya 0,685 g/L. Hasil tersebut memperkuat dugaan bahwa isolat BMN 14 adalah kelompok *Bacillus sp* yang dikenal paling produktif menghasilkan biosurfaktan dari Lin *et al.* (1994) dan Melnerney *et al.* (1985) dengan menggunakan mikroba dari kelompok yang sama dimana lipopeptida jenis *lichenysin* B dihasilkan mempunyai kemampuan menurunkan tegangan muka hingga 27 mN/m.

Pola isolat BMN 14 ini juga sesuai dengan hasil penelitian Cooper dan Zajic (1989) yang menyatakan, bahwa produksi biosurfaktan sampai batas tertentu berkorelasi dengan penurunan tegangan muka cairan kultivasi dan nilainya dapat mencapai kurang dari atau sama dengan 30 mN/m. Pada 6 jam pertama pengamatan, tampak tidak terjadi peningkatan produksi yang nyata. Hal ini diduga karena terjadi penyesuaian (adaptasi) mikroba terhadap lingkungannya. Peningkatan produksi biosurfaktan yang cepat setelah jam ke 18 tidak diikuti dengan penurunan tegangan muka. Hal ini sesuai dengan penelitian Drouin dan Cooper (1991) menggunakan bakteri *Bacillus sp* yang menyatakan tegangan muka relatif konstan setelah jam ke-18. Selain itu menurut Georgiou (1992) data yang relatif konstan pada tegangan permukaan, dapat terjadi karena produksi biosurfaktan pada saat ini diubah menjadi metabolit lain yang tidak berdampak pada penurunan tegangan permukaan, seperti yang terjadi pada fermentasi menggunakan *Basillus licheniformis* JF-2 penghasil biosurfaktan.

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan

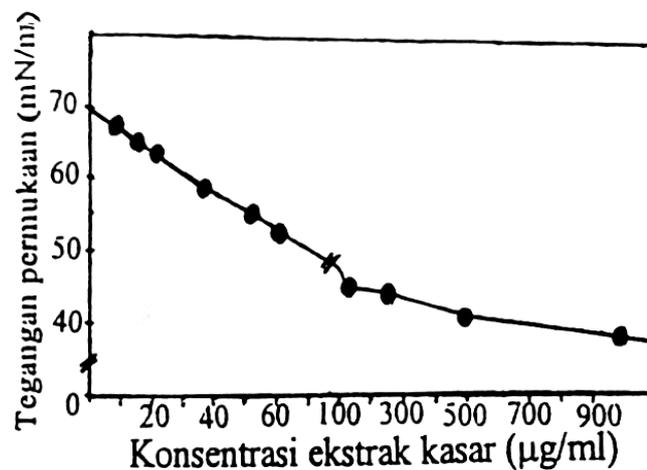
Surfaktan yang diproduksi dengan menggunakan mikroba secara fermentasi curah dipengaruhi beberapa faktor yang bilamana dapat dikontrol dengan baik dan sesuai dengan kondisi pertumbuhan yang diharapkan dapat memacu pertumbuhan dan pembentukan produk metabolit secara optimal. Menurut Fiechter (1992) bahwa tipe, ciri, dan jumlah biosurfaktan yang diproduksi pada fermentasi tidak hanya bergantung pada jenis mikroba yang digunakan, tetapi juga dari substranya. Lebih lanjut disebutkan limitasi substrat pada media fermentasi, parameter fisiko-kimia seperti aerasi, suhu dan pH merupakan parameter proses yang menentukan tipe dan produksi biosurfaktan.

pH

Menurut Richana (1997) produksi biosurfaktan menggunakan bakteri isolat lokal BMN 14 dan BMN 27 memiliki pH akhir fermentasi masing-masing 6,72 dan 6,82 dengan lama fermentasi 2 hari dan pH awal media 7. Kondisi akhir pH cairan fermentasi berkorelasi dengan endapan asam yang dihasilkan. Lebih lanjut penelitian tersebut menyebutkan bilamana pH akhir lebih besar dari 6,5 menghasilkan endapan asam lebih tinggi dari yang memiliki pH akhir lebih kecil dari 6,5.

Penurunan pH sangat berpengaruh terhadap polimer yang dihasilkan. Stabilitasnya emulsi sangat dipengaruhi oleh penurunan pH media fermentasi. Bilamana kondisi tersebut terjadi maka bertolak belakang dengan teori yang menyatakan stabilitasnya emulsi yang terbentuk merupakan ciri diproduksinya biosurfaktan (Banat, 1993).

Cooper dan Goldenberg (1987) menyatakan bahwa penurunan pH sangat berpengaruh terhadap polimer yang dihasilkan, akan tetapi kenaikan pH selama fermentasi tidak mempengaruhi konsentrasi polimer yang dihasilkan. Menurut Javaheri *et al.*, (1985) kisaran pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan berkisar 4,6 - 9. Petunjuk banyaknya produksi biosurfaktan dapat dilihat dari banyaknya asam (ekstrak kasar) yang terbentuk setelah penambahan HCl. Ekstrak yang dilanitkan dalam air suling (pH 7,0) dapat diuji kemampuannya dalam menurunkan tegangan permukaan pada Gambar 6.



Sumber : Melnerney et al., 1990

Gambar 3. Hubungan antara berbagai konsentrasi ekstrak kasar terhadap tegangan permukaan

Pada Gambar 3 tersebut terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar (900 µg/ml) yang terkandung dalam suatu cairan, maka tegangan permukaan juga semakin rendah, dalam hal ini berbanding terbalik. Tegangan permukaan menurun dari 70 mN/m hingga 30 mN/m. Tingginya konsentrasi endapan asam yang diperoleh tidak terlepas dari pH cairan fermentasi pada saat pengamatan yang sama. Kisaran pH 6-7 merupakan yang terbaik untuk isolat BMN 14 dan BMN 27 (Richana, 1977).

Suhu

Suhu memiliki peranan penting dalam memproduksi biosurfaktan. Penelitian ini sesuai dengan jenis mikroba yang digunakan menurut Sen (1996) suhu yang optimum 37°C. Kondisi suhu ini berbeda dengan penelitian Richana (1997) yang dilakukan pada suhu 30°C. Suhu yang digunakan 37°C sesuai dengan jenis bakteri yang digunakan yaitu dari kelompok *Bacillus sp* dan perbedaan sumber nitrogen. Perbedaan suhu dan sumber N diharapkan dapat menghasilkan biosurfaktan yang lebih tinggi dibanding penelitian sebelumnya dan memberikan tegangan permukaan terendah.

Suhu yang diterapkan pada penelitian ini sesuai dengan Javaheri *et al.*, (1985) yang menyebutkan bahwa *Bacillus licheniformis* JF-2 pada kondisi aerob dan suhu 35-40°C pada aerasi 0,5-1 w.m. Menurut Javaheri *et al.* (1985) *B.licheniformis* JF-2 pada kondisi aerob pada suhu 35-40°C, pH 6-7, agitasi 400 rpm dan aerasi 0,5-1 vvm. Cooper *et al.* (1981) dalam penelitiannya menghasilkan produksi biosurfaktan oleh *Bacillus* galur IAF 343 dilakukan pada suhu 37°C.

Agitasi dan Aerasi

Agitasi dan aerasi merupakan dua faktor yang erat hubungannya terutama dengan keberadaan oksigen pada sistem fermentasi aerob. Pengendalian agitasi pada kondisi fermentasi bertujuan agar penyebaran zat hara pada bioreaktor lebih seragam, sehingga dapat mengurangi perubahan suhu yang terjadi dalam cairan fermentasi, karena dalam merancang bioreaktor perpindahan panas merupakan aspek penting yang harus diperhatikan. Menurut Kim *et al.* (1990) produksi biosurfaktan tinggi pada laju alir udara yang rendah, dan biasanya biosurfaktan dihasilkan oleh mikroba pada fasa stasioner atau eksponensial.

Pengendalian agitasi dapat meningkatkan laju pindah panas antara cairan fermentasi dan permukaan sistem pendingin pada bioreaktor dan memudahkan perpindahan oksigen dari gas ke cairan. Semakin besar tingkat oksigen terlarut, maka produksi biosurfaktan juga meningkat karena oksigen juga dapat merupakan sumber nitrogen yang dibutuhkan. Hal ini sesuai hasil penelitian dari Scragg (1991) yang menyatakan bahwa aerasi dan agitasi berperan dalam memasok kebutuhan oksigen untuk mikroba menurut tingkat metabolik yang tepat.

Doelle (1994) menyebutkan oksigen merupakan syarat utama dalam proses pertumbuhan mikroba. Oleh karena itu dalam bentuk oksigen terlarut merupakan faktor penting dan diperlukan dalam proses fermentasi.

Pada fermentasi dalam bioreaktor, tingginya konsentrasi oksigen terlarut dipengaruhi oleh *empeller* dalam bioreaktor. Peran *empeller* penting sebagai pemecah gelembung udara yang dipompakan ke dalam bioreaktor. Keberadaan *empeller* dapat meningkatkan jumlah oksigen terlarut dalam proses fermentasi sehingga pertumbuhan dan produksi biosurfaktan diharapkan tercapai optimal (Scragg, 1991).

Agitasi memiliki peranan penting terutama pada fermentasi aerob. Hal ini berimbang dengan kemampuan transfer oksigen yang merupakan sumber energi dan merupakan proses yang diperlukan pada pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk metabolit, Richana (1997) memproduksi biosurfaktan menggunakan bakteri isolat lokal BMN 14 dan BMN 27 pada agitasi 200 rpm baik pada *waterbath shaker* maupun bioreaktor Biostat 2 L.

Faktor Lain Yang Berpengaruh Terhadap Produksi Biosurfaktan

Selain faktor yang telah disebutkan, produksi metabolit secara fermentasi oleh mikroba umumnya juga dipengaruhi oleh garam-garam mineral yang mampu sebagai pemacu pembentukan produk seperti Fe, Mg, Mn dan Ca. Pemisahan produk akhir dari media merupakan bagian biaya yang terbesar yang harus dikeluarkan. Untuk itu perlu dicari metode yang tepat untuk pemanenan biosurfaktan sehingga menghasilkan produk biosurfaktan yang tinggi. Menurut Cooper (1986) masalah yang sering dihadapi adalah rendah hasil dan penghambatan yang terjadi oleh produk akhir tersebut.

Penambahan induser asam lemak (asam oleat) telah dilaporkan Banat (1993). Asam oleat ($C_{18}H_{32}O_2$) adalah salah satu turunan lipida. merupakan asam lemak tak jenuh dengan ikatan rangkap dan mempunyai sifat dapat berdisosiasi menjadi ion. Sifat-sifat tersebut memungkinkan terjadinya isomer-isomer (cis/trans) pada ikatan rangkapnya. Selain itu sifat utama lainnya yang relatif stabil terhadap panas, tidak menguap serta titik cair yang rendah memungkinkan untuk digunakan sebagai substrat oleh mikroba. Penambahan asam lemak atau ester asam lemak sebagai campuran pada sumber karbon, akan berpengaruh terhadap peningkatan produk yang terbentuk terutama yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik seperti biosurfaktan (Ratledge, 1986).

Faktor lain yang berpengaruh terhadap produksi biosurfaktan yaitu penggunaan berbagai pelarut yang sesuai sangat menentukan dalam kemampuan mengekstraksi biosurfaktan dari endapan asam yang terjadi. Pemilihan metanol sebagai pelarut untuk mengekstraksi biosurfaktan didasarkan pada penelitian dari Melnerney *et al.* (1990) yang mendapatkan kemampuan perolehan hasil

pemanenan (*percent recovery*) sebesar 94%. Selain itu, banyaknya busa yang tertinggal pada bioreaktor pada saat melakukan isolasi biosurfaktan dapat berakibat hilangnya produksi biosurfaktan yang telah diproduksi oleh bakteri tersebut. Menurut Berheiner (1970) adanya busa sebagai petunjuk adanya bahan aktif permukaan pada cairan tersebut yang disebut biosurfaktan.

Keberadaan inhibitor atau produk penghambat dapat menyaingi substrat pembatas yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Substrat dapat menjadi penghambat pembentukan produk jika nilai pembatasnya lebih besar dari nilai kritis substrat yang dibutuhkan mikroba (Pirt, 1975).

Metode-Metode Pengunduhan Dalam Pengembangan dan Purifikasi Produk Metabolit Base Mikroba

Sentrifugasi

Sentrifugasi adalah proses pemisahan cairan dan partikel berdasar densitas. Sentrifugasi dapat digunakan untuk pemisahan sel dari cairan kultur, sel pecah dari cairan, dan kelompok endapan. Pada pemisahan, partikel yang densitasnya lebih tinggi daripada pelarut turun (sedimentasi), dan partikel yang lebih ringan mengapung ke atas. Perbedaan densitas yang tinggi, membuat partikel bergerak lebih cepat. Jika tidak terdapat perbedaan densitas (kondisi isoponik), partikel tetap setimbang.

Ada beberapa fungsi sentrifugasi dalam pemisahan cairan, yaitu:

1. Pemisahan (padat/cair, padat/cair/cair dan padat/padat/cair)

Sentrifugasi dapat digunakan untuk pemisahan padat – cair menyediakan padatan berat dari cairan. Sentrifugasi juga dapat digunakan untuk memisahkan fase berat, dan dua fasa cair ringan, dengan salah satu fase ringan yang lebih

ringan dari lainnya. Padatan dapat lebih ringan dari cairan dan pemisahan adalah dengan flotasi dari fase padat terdispersi.

2. Klasifikasi urutan berdasarkan ukuran dan densitas

Sentrifugasi digunakan untuk mengklasifikasikan padatan dengan ukuran yang berbeda. Salah satu aplikasi adalah untuk mengklasifikasikan kristal berbagai ukuran yang berbeda, dengan kehalusan ukuran submikron dengan fase ringan dan hanya mempertahankan ukuran yang lebih besar pada fase berat yang dipisahkan. Salah satu dari padatan dipisahkan menjadi produk. Sebagai contoh, kristal yang lebih besar dapat menjadi kristal produk sedangkan kristal halus yang kembali ke kristalisator untuk tumbuh kristal yang lebih besar. Aplikasi lain yang serupa adalah untuk mengklasifikasikan ukuran puing – puing sel yang lebih kecil dalam fase cair dari berat produk setelah homogenisasi sel.

3. Menghilangkan partikel kebesaran dan asing (*Degritting*)

Degritting mirip dengan klasifikasi di mana partikel yang tidak diinginkan, lebih besar atau lebih padat, ditolak diendapan, dengan produk (lebih kecil atau kurang padat) meluap di fase cair yang lebih ringan. Situasi lain adalah dimana partikel yang tidak diinginkan lebih kecil ditolak dalam fase cair ringan, dan padatan berat yang berguna diselesaikan dengan fase berat.

4. Penebalan atau menghapus konsentrasi cair

Sentrifugasi sering digunakan untuk berkonsentrasi fase padat dengan pengendapan dan pepadatan, menghilangkan fase cairan berlebih di *overflow*. Ini mengurangi volume produk dalam pengolahan berkonsentrasi padatan.

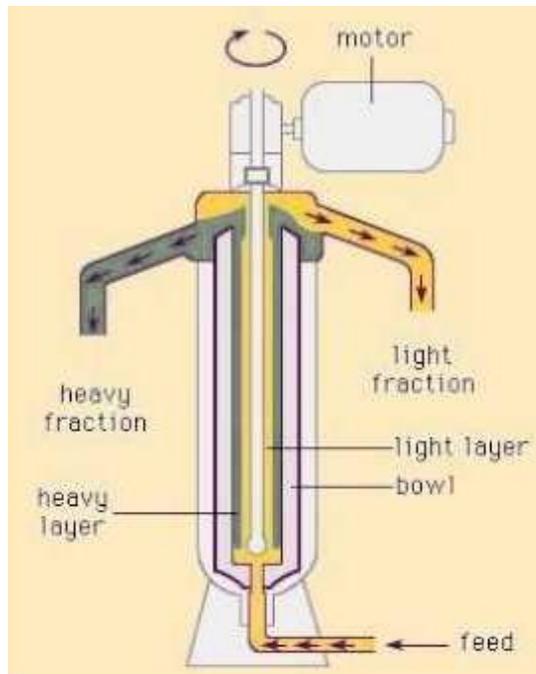
5. Pemisahan kotoran dengan mencuci atau pengenceran (*repulping*)

Dengan suspensi pekat yang mengandung kontaminan seperti garam dan ion, itu diencerkan dan dicuci sehingga kontaminan dilarutkan dalam cairan pencuci. Selanjutnya, suspensi tersebut disentrifugasi untuk menghilangkan cairan pencuci dengan kontaminan terlarut atau padatan tersuspensi halus. Selanjutnya, produk dapat lebih terkonsentrasi dengan sentrifugasi.

Ada sejumlah tipe sentrifugasi, beberapa diantaranya:

Tubular Bowl Centrifuge

- Paling umum digunakan untuk pemisahan padat-cair, isolasi enzim.
- Dapat dicapai pemisahan yang baik untuk sel mikrobia dalam larutan.



Gambar 4. *Tubular Bowl Centrifuge*

Disc Bowl Centrifuge

- Secara luas digunakan untuk memisahkan sel.
- Dapat untuk memisahkan sel mikrobia yang dipecah dan endapan protein.

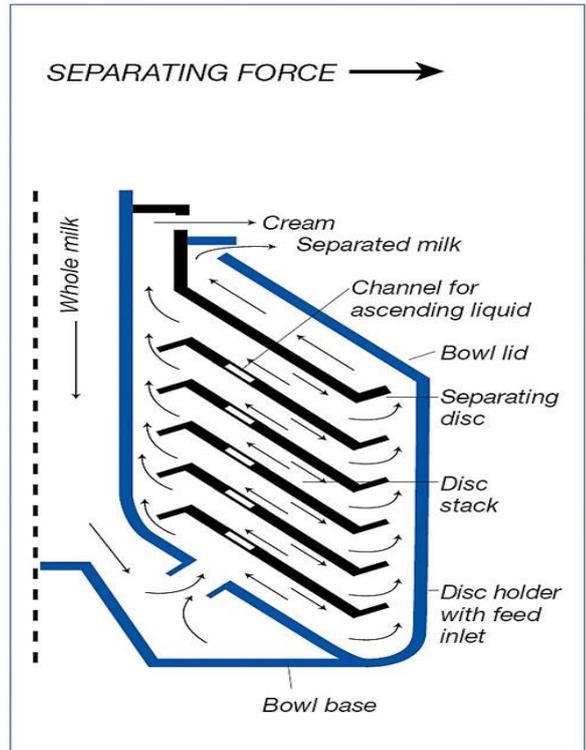
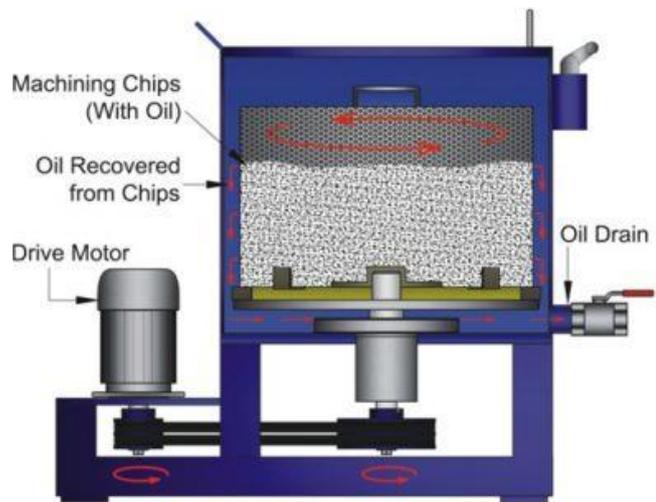


Diagram showing the separation of cream from milk with a disc bowl centrifuge

Gambar 5. Disc Bowl Centrifuge

Perforate Bowl Basket Centrifuge

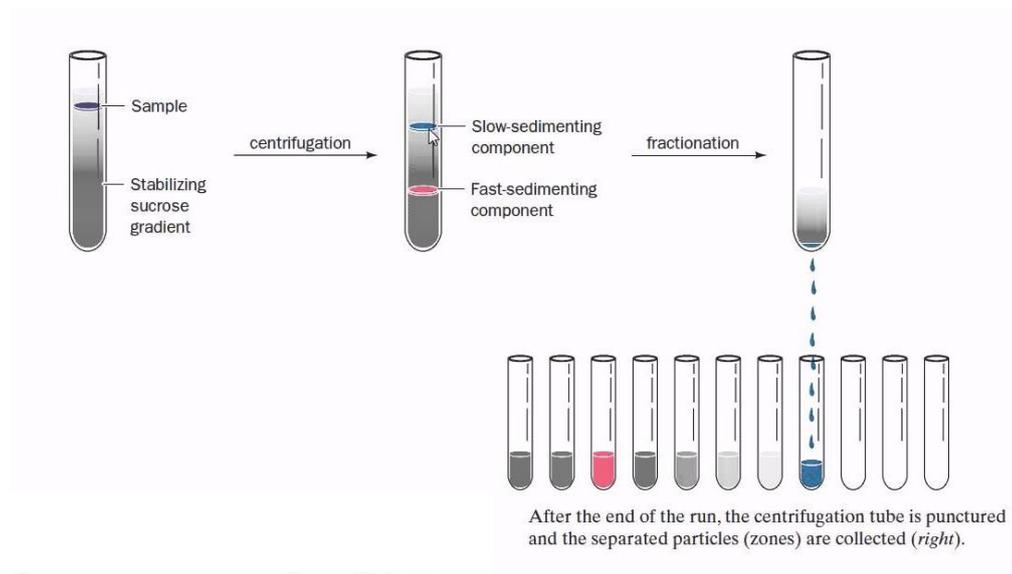
- Pengecualian pada pemisahan adsorbent, seperti selulosa dan agarosa.



Gambar 6. Perforate Bowl Basket Centrifuge

Zonal Ultracentrifuge

- Digunakan dalam industri vaksin karena dapat secara mudah memisahkan sel yang dipecah dari virus.
- Dapat untuk mengendapkan protein dengan baik.
- Secara eksperimental digunakan untuk pemurnian RNA polymerase dan berbagai enzim.



Gambar 7. Zonal Ultracentrifuge

Koagulasi dan Flokulasi

Koagulasi ditetapkan untuk proses-proses biologikal jika partikel kecil secara langsung melekat satu dengan lainnya. Flokulasi adalah agensia yang bekerja untuk menggabungkan partikel. Teknik koagulasi dan flokulasi biasanya digunakan untuk sel utuh, sel pecah atau protein terlarut.

Sel Utuh

Banyak agensia flokulasi digunakan untuk pemisahan produk, seperti : polielektrolit anionik dan kationik, alumina, dan polimer sintetik.

Sel Hancur dan Protein

Koagulasi dan flokulasi banyak digunakan dengan dilakukan agitasi. Koagulasi dan flokulasi dapat digunakan sebagai alternatif metode presipitasi pada pemisahan enzim. Agensia yang digunakan untuk sel utuh adalah sama dengan untuk sel hancur maupun protein.

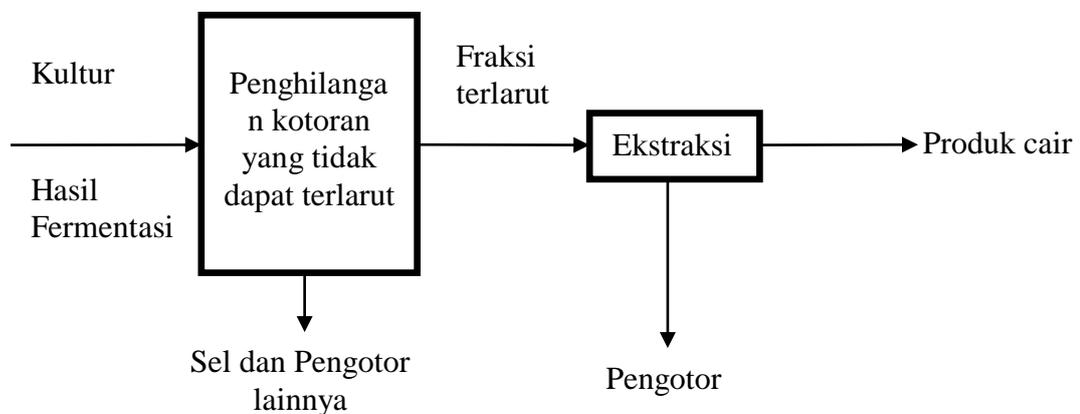
Pemurnian Cairan Fermentasi Dalam Jumlah Besar Sebagai Produk

Metode Purifikasi

Terdapat berbagai metode purifikasi antara lain adalah:

1. Secara gravitasional, terdiri dari dua cara yaitu sentrifugasi dan flokulasi.
2. Secara mekanis, terdiri dari dua cara yaitu dengan filtrasi dan dialisis.
3. Penggunaan sifat permukaan, terdiri dari adsorpsi, ion exchange dan flotasi.
4. Metode secara elektrik ini menggunakan elektroforesis, elektrodialisis dan elektro-osmosis.

Secara umum metode pemurnian produk fermentasi terdiri dari empat tahapan utama yaitu penghilangan kotoran, ekstraksi, konsentrasi dan purifikasi. Secara sistematis tahapan tersebut dapat dilihat pada Gambar



Gambar 8. Pemurnian Produk Fermentasi

Filtrasi

Filtrasi adalah cara pemurnian produk menggunakan alat penyaring. Kain saring atau beberapa bahan porus banyak dipakai, jika perlu ditambah dengan menggunakan tekanan untuk mendorong partikel melewati filter. Elemen-elemen dipisahkan berdasarkan ukuran.

Presipitasi

Presipitasi adalah prosedur penambahan larutan ionik untuk membuat larutan fermentasi menjadi bentuk partikel yang tidak larut. Presipitasi biasanya untuk memisahkan enzim atau protein. Cara yang sederhana biasanya dengan mengubah pH dan suhu. Presipitasi dapat dilakukan secara batch atau kontinyu.

Variasi suhu dan pH

- Umumnya kebanyakan protein dan enzim meningkat kelarutannya dengan meningkatnya suhu.
- Dengan mengatur pH, polaritas enzim dapat diturunkan sehingga tidak bermuatan, polaritas yang paling rendah menjadikan enzim sedikit larut dan cairan.

Presipitasi oleh Solven Organik

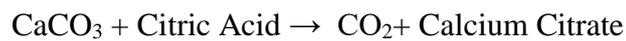
- Dengan penambahan solven organik ke cairan fermentasi, konstanta dielektrik akan turun menyebabkan keluturan berkurang.
- Sering digunakan secara industri karena murah dan sederhana.

Presipitasi oleh Ion Logam

- Garam metal dengan solubilitas lebih rendah dapat dibentuk oleh enzim dan protein.
- Garam Mangan dapat digunakan untuk pengendapan asam nukleat.

Pemurnian Asam Sitrat

Metode yang digunakan dalam pemurnian asam sitrat dari cairan fermentasi terdiri dari dua teknik yaitu presipitasi dan filtrasi. Cairan asam sitrat dari fermentor produksi sangat terkontaminasi oleh biomass, garam, sukrosa, dan air. Pertama, asam sitrat harus direaksikan dengan kalsium karbonat untuk menetralkan larutan dan membentuk presipitat tidak larut kalsium sitrat. Kalsium sitrat mengandung asam sitrat 74%. Reaksi Kimianya adalah:



Kalsium sitrat kemudian dicuci, dipanaskan dan disaring untuk menghilangkan kontaminan. Tergantung rancangan skema pemurnian, filter dapat ditempatkan sebelum reaksi pertama dengan kalsium karbonat. Secara sederhana filter dapat memisahkan sebagian besar kontaminan tergantung ukurannya dilanjutkan untuk kontaminan yang lebih kecil pada filter berikutnya. Kalsium sitrat kemudian ditambah asam sulfat. Suhu reaksi ini di bawah 60°C. Reaksi akan menghasilkan asam sitrat bebas dan presipitat baru kalsiumsulfat, yang akan dibutuhkan nantinya. Dalam filter ini, kalsium sulfat dicuci dari asam sitrat dan meninggalkan biomass. Kontaminan dapat dipisahkan dengan filter yang lebih baik seperti mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi.

Pemurnian lanjut

Asam sitrat dapat dihasilkan dalam dua bentuk: - monohidrat dan anhidrat. Bentuk-bentuk ini membutuhkan tambahan tahap pemurnian untuk mencapai kemurnian yang diinginkan.

1. *Monohydrate*, mengandung satu molekul air untuk tiap asam sitrat.

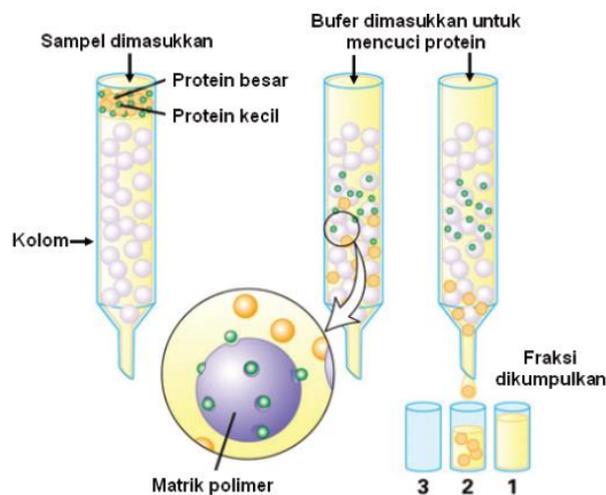
Membutuhkan kristalisasi berulang sampai kandungan air sekitar 7,5-8,8%

2. *Anhydrous*, memisahkan semua air dari produk akhir. Dibuat dengan dehidrasi produk asam sitrat monohidrat pada suhu di atas 36,6°C

Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan metode pemisahan yang penting dalam proses pemurnian protein. Beberapa istilah lain juga digunakan untuk filtrasi gel, yaitu : size exclusion chromatography, molecular sieving dan gel permeation chromatography (Bollag *et al.*, 1996, Hedlund 2004). Filtrasi gel memisahkan protein atau molekul lain berdasarkan ukurannya. Prinsip filtrasi gel adalah penyaringan molekul dimana sampel yang berupa campuran molekul dilewatkan ke dalam kolom berisi gel berpori. Ukuran pori gel yang kecil memungkinkan bufer dan molekul kecil masuk ke dalamnya, sedangkan molekul berukuran lebih besar dari pori tidak dapat masuk. Hal ini mengakibatkan molekul berukuran besar akan terelusi terlebih dahulu diikuti molekul yang berukuran lebih kecil (Suhartono 1989, Bollag *et al.*, 1996). Tahapan dalam filtrasi gel yaitu: memasukkan sampel ke dalam kolom berisi gel yang telah diseimbangkan dengan bufer, elusi sampel dengan bufer dan koleksi eluen seperti terlihat dalam Gambar

9.



Gambar 9. Pemurnian enzim dengan filtrasi gel

Beberapa matrik yang digunakan dalam filtrasi gel adalah dekstran, akrilamid, agarosa dan polistiren. Beberapa istilah juga digunakan untuk gel dari polimer yang berbeda, misalnya Sephadex (gel dekstran), superose (gel agarosa), bio-gel (gel akrilamida), superdex (gel agarosa/ dekstran), sephacryl (dekstran/bis-akrilamida) dan sebagainya (Hedlund, 2004). Sephadex bersifat tahan terhadap garam atau basa pada konsentrasi tinggi, tetapi rusak oleh asam (dibawah pH 2) dan oksidator kuat. Contoh Sephadex adalah Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-75 dan Sephadex G-100. Huruf G menunjukkan bahwa Sephadex tersebut dikembangkan dengan air sedangkan nomor dibelakangnya menunjukkan besarnya pengembangan tersebut, misalnya 20 kali, 50 kali dan sebagainya (Suhartono, 1989).

Solut yang memiliki berat molekul sama tetapi memiliki bentuk berbeda akan terelusi dengan volume retensi yang berbeda. Molekul yang memiliki bentuk bulat akan terelusi lebih dahulu, kemudian bentuk *flexible-coil* dan terakhir bentuk sferis. Beberapa faktor yang mempengaruhi resolusi protein yang dielusi adalah: ukuran partikel matrik, kecepatan aliran, panjang kolom, volume dan viskositas sampel. Semakin kecil ukuran partikel maka resolusi semakin baik dan waktu pemisahan dapat dipersingkat karena kecepatan aliran dapat ditingkatkan tanpa mengurangi resolusi. Kecepatan aliran merupakan parameter penting karena filtrasi gel berdasar pada kesetimbangan antara fase mobil dan stasioner. Kecepatan aliran yang terlalu tinggi menyebabkan kesetimbangan tidak tercapai sehingga menghasilkan puncak yang meluas, khususnya untuk molekul besar. Aliran yang terlalu lambat tidak sesuai untuk molekul kecil karena difusi aksial kolom tidak dapat diabaikan lagi. Panjang kolom berpengaruh pada resolusi,

semakin panjang kolom resolusi semakin baik. Volume sampel berpengaruh pada efisiensi pemisahan. Matrik yang memiliki partikel berukuran kecil lebih sensitif terhadap perubahan volume sampel dibanding partikel berukuran besar. Biasanya digunakan 0.5% dan 2-5% volume kolom untuk partikel matrik berukuran 10 μm dan 100 μm berturut-turut. Volume sampel dapat ditingkatkan sampai 30% untuk proses penghilangan garam (*desalting*). Sampel yang memiliki viskositas jauh lebih tinggi dari eluen akan membentuk zona sampel yang tidak stabil dan akan dengan cepat menyebar dan miring (asimetris). Guna mendapatkan hasil optimum, konsentrasi sampel yang disarankan yaitu 70 mg/ml (Hedlund, 2004).

Pada filtrasi gel tidak terjadi ikatan antara matrik dengan protein yang akan dipisahkan sehingga komposisi bufer tidak mempengaruhi resolusi secara langsung. Hal ini merupakan keuntungan teknik filtrasi gel dimana kondisi elusi dapat disesuaikan dengan tipe sampel, kebutuhan untuk purifikasi lebih lanjut, analisis atau penyimpanan. Filtrasi gel sangat sesuai untuk memisahkan biomolekul yang sensitif terhadap perubahan pH, konsentrasi ion logam atau kofaktor dan kondisi lingkungan yang ekstrem. Pemisahan dapat dilakukan dengan adanya ion logam atau kofaktor yang diperlukan, detergen, urea, guanidin hidroklorida, pada kekuatan ion yang tinggi atau rendah, pada suhu dingin atau 37°C dan protein dapat dielusi dengan bufer yang sesuai dengan kebutuhan.

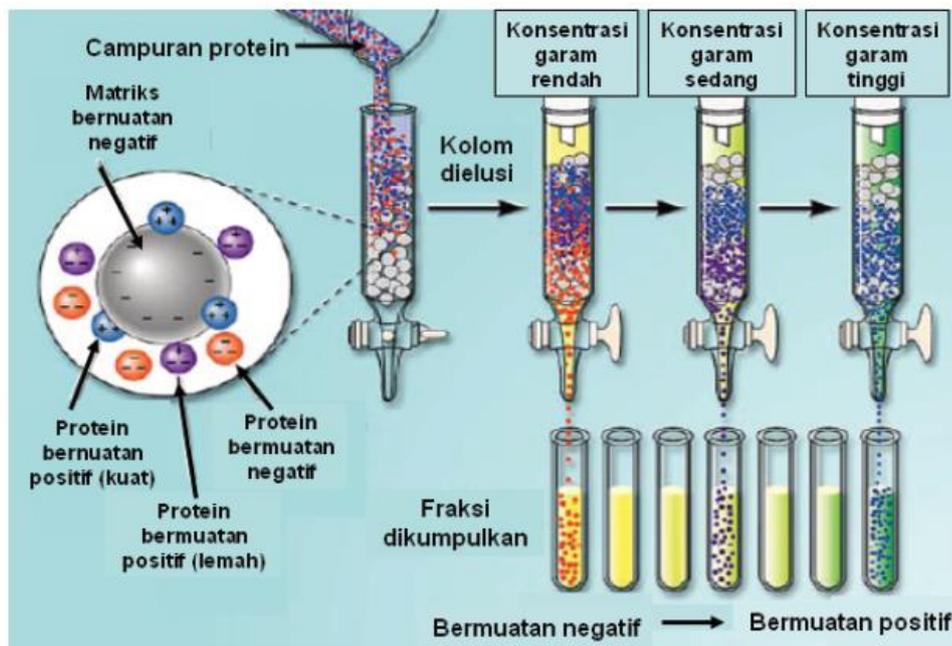
Kromatografi Pertukaran Ion

Kromatografi pertukaran ion memisahkan protein berdasarkan pada muatan bersih protein dan pada kekuatan relatif dari muatan bersih protein tersebut. Kromatografi pertukaran ion memerlukan fase diam yang biasanya merupakan polimer terhidratasi yang bersifat tidak larut seperti selulosa,

dekstran dan agarosa. Gugus penukar ion diimobilisasikan pada matrik. Beberapa gugus penukar anion yaitu aminoetil (AE-) kuaternari aminoetil (QAE-) dan dietilaminoetil (DEAE-), sedangkan gugus penukar kation yaitu sulfopropil (SP-), metil sulfonat dan karboksimetil (CM-). Penukar ion lemah hanya dapat mempertahankan kondisi terionisasi pada rentang pH sempit dan kehilangan muatannya pada pH tertentu, sedangkan penukar ion kuat dapat mempertahankan kondisi terionisasi pada rentang pH yang luas. Misalnya gugus penukar anion lemah DEAE- terionisasi sempurna dibawah pH 6.0 dan akan kehilangan muatannya pada pH 9.0. Gugus penukar kation lemah CM- akan kehilangan muatannya dibawah pH 4.5. Gugus penukar ion kuat Q (penukar anion kuat) dan SP- (penukar kation kuat) dapat mempertahankan kondisi terionisasi pada rentang pH 1 - 10 (Coligan *et al.*, 2003).

Dasar dari kromatografi pertukaran ion adalah ion bermuatan dapat dengan bebas dipertukarkan dengan ion yang memiliki tipe muatan yang sama. Protein yang memiliki muatan negatif dapat dipertukarkan dengan ion klorida. Mula-mula gugus fungsional matrik yang bermuatan negatif mengikat ion dari bufer (misalnya Na⁺). Pada saat sampel dimasukkan ke dalam kolom, maka protein yang bermuatan positif akan menggantikan ion Na⁺ sedangkan protein yang bermuatan negatif atau netral tidak akan terikat. Protein yang tidak terikat dibilas dengan menggunakan bufer (biasanya dengan konsentrasi 10-50 mM). Proses selanjutnya adalah melepaskan ikatan protein yang terikat gugus fungsional matrik dengan cara membilas kolom menggunakan bufer yang mengandung NaCl atau KCl. Pembilasan dilakukan dengan meningkatkan

konsentrasi NaCl atau KCl secara linier atau bertahap sehingga protein yang memiliki ikatan lemah dengan matrik akan lepas terlebih dahulu dan diikuti oleh protein yang memiliki ikatan lebih kuat. Teknik pemurnian enzim dengan kromatografi pertukaran ion ditunjukkan dalam Gambar 10.



Gambar 10. Pemurnian enzim dengan kromatografi pertukaran ion

Kolom untuk kromatografi pertukaran ion biasanya tidak panjang dan memiliki diameter lebih besar dari pada kolom untuk filtrasi gel. Banyaknya sampel yang dimasukkan umumnya sekitar 10-20% dari kapasitas kolom. Pembilasan dengan gradien konsentrasi NaCl yang linier baik digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang memiliki perbedaan muatan bersih yang tidak terlalu besar sedangkan gradien konsentrasi NaCl bertahap baik digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang memiliki perbedaan muatan bersih yang besar.

Pemilihan penukar ion tergantung pada muatan protein target. Muatan bersih protein tergantung pada pH (protein semakin bermuatan positif dengan

menurunkan pH dan semakin negatif dengan menaikkan pH). Pada saat menentukan pH untuk kromatografi, maka harus diperhatikan stabilitas protein target pada pH yang dipilih. Apabila protein stabil pada pH diatas titik isoelektriknya (pI) maka digunakan penukar anion (positif), tetapi bila protein stabil pada pH dibawah pI nya maka digunakan penukar kation (negatif). Jika protein stabil pada rentang 1 unit diatas dan dibawah pI maka kedua penukar ion dapat digunakan.

Matrik yang mengikat gugus fungsional menentukan sifat aliran, ion yang dapat diikat, stabilitas mekanik dan kimia. Ada 3 kelompok matrik yang biasanya digunakan, yaitu : 1. polistiren, poliakrilik atau polifenol; 2. selulosa; dan 3. dekstran (Sephadex) atau agarosa (sepharose). Matrik polistiren dan polifenolik lebih sering digunakan untuk memisahkan molekul-molekul kecil seperti asam-asam amino, peptida kecil, nukleotida, nukleotida siklik, asam-asam organik.

Matrik selulosa biasanya digunakan untuk memisahkan protein (termasuk enzim), polisakarida dan asam nukleat. DEAE-selulosa, CM-selulosa dan fosfoselulosa paling sering digunakan. Matrik polidekstran dan agarosa (misalnya DEAE-Sephadex, CM-Sephadex) digunakan untuk memisahkan protein, hormon, tRNA dan polisakarida. Pada pemurnian xilanase, matrik selulosa biasanya tidak digunakan karena beberapa xilanase tertentu memiliki cellulose binding domain (Subramanian & Prema 2002) yang akan berinteraksi pada proses elusi normal.

Pemilihan penukar ion kuat atau lemah tergantung pada pH molekul target. Molekul yang memerlukan pH sangat rendah atau sangat tinggi untuk dapat berionisasi atau apabila molekul stabil pada pH ekstrim maka penukar ion kuat harus digunakan. Penukar ion lemah akan memberikan hasil pemisahan yang lebih

baik untuk protein-protein yang memiliki muatan bersih yang berdekatan. Keuntungan kromatografi penukar ion diantaranya adalah tidak merusak protein yang dimurnikan dan pada umumnya memiliki kapasitas pengikatan yang tinggi. Kelemahannya adalah protein-protein yang memiliki distribusi gugus bermuatan pada permukaannya atau memiliki pI yang sama atau mirip akan sulit dipisahkan dengan cara kromatografi penukar ion. Selain itu larutan enzim hasil kromatografi penukar ion mengandung kadar garam cukup tinggi yang harus dihilangkan untuk proses pemurnian selanjutnya

LATIHAN (EVALUASI MANDIRI)

DAFTAR PUSTAKA

- Fiechter A. 1992. *Biosurfactants : Moving Toword Industrial. Application*. TIBETCH. 10 : 208-217.
- Hesty H. 1998. *Kajian Produksi Biosurfaktan Dengan Berbagai Tingkat Nisbah C dan N Serta Penambahan Induser*. Thesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- McKane L., Kandel J. 1985. *Microbiology Essentials and Applications*. McGraw-Hill, Inc. New York.
- Morikawa M.M., Ito, Imanaka T. 1992. *Isolation of New Surfactin Procedur Basillus pumilus A-1 and Cloning and Necleotide Squence of the regulator Gene psf-1*. J. Ferment. Bioeng. 74 (5) : 255-261.
- Richana N. 1997. *Produksi Biosurfaktan Lipopeptida oleh Isolat Bakteri Lokal*. Thesis. Pascasarjana IPB. Bogor.
- Sheppard J.D., Cooper D.G. 1991. *The Response of Basillus subtilis ATCC 21332 to Manganese During Continous-phase Groth*. Appl. Microbiol. Bioecthnol.
- Susanti R, Fibriana F. *Teknologi Enzim*. 2017. Penerbit Andi. ISBN : 9789792962765. Yogyakarta.