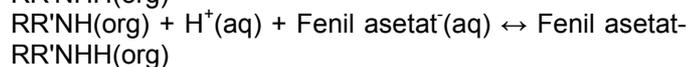
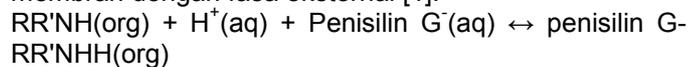


teknik membran cair emulsi (*emulsion liquid membrane*) yang berpotensi untuk dikembangkan ke skala industri. Namun demikian, pembuatan *hollow-fiber* yang sesuai untuk pemisahan penisilin G membutuhkan teknologi yang lebih tinggi dari pada pembuatan membran cair emulsi sehingga penggunaan teknik ini kurang ekonomis [11].

Mekanisme transpor ekstraksi dan re-ekstraksi pada membran cair emulsi didasarkan pada jenis reaksi pengompleksan antara fenil asetat, penisilin G dengan *carrier*. Amin sekunder (sebagai *carrier*) dinotasikan dengan RR'NH, yang terlarut dalam fasa membran bereaksi dengan ion fenil asetat, ion penisilin G dan proton H⁺ menghasilkan kompleks fenil asetat-RR'NHH dan penisilinG-RR'NHH, di permukaan antara fasa membran dengan fasa eksternal [1].



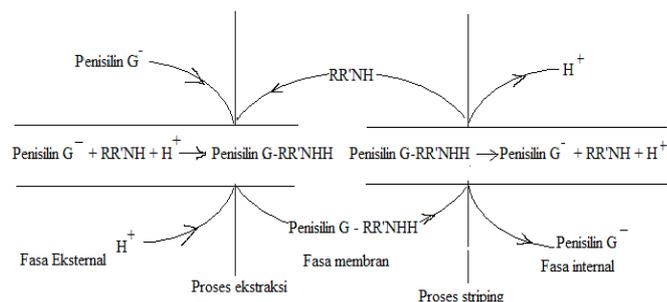
Kompleks Fenil asetat-RR'NHH dan penisilin G-RR'NHH terdifusi ke fasa membran, kemudian ion fenil asetat, ion penisilin dan ion H⁺ terlepas masuk ke fasa penerima. Terlepas dan masuknya ion fenil asetat, ion penisilin dan ion H⁺ ke fasa penerima disebabkan karena gradien konsentrasi fenil asetat, penisilin dan pH. Senyawa *carrier* yang telah melepaskan ion fenil asetat, ion penisilin dan H⁺ kembali ke permukaan fasa membran. Secara keseluruhan proses transpor berpasangan difusi kompleks yang terbentuk dari fasa umpan ke fasa penerima (proses pelucutan/*stripping*) digambarkan seperti Gambar 2 [12].

Dari Gambar 1 dapat dijelaskan bahwa, penisilin G merupakan senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang lebih rendah dibanding fenil asetat, karena pada penisilin G senyawa sikliknya lebih banyak dibanding fenil asetat. Oleh karena itu dengan sifat ke non polaran yang lebih tinggi dari penisilin G, maka penisilin G akan terekstraksi lebih dahulu dibanding fenil asetat. Dengan demikian pada akhir ekstraksi jumlah penisilin G yang didapat pada fasa internal akan lebih banyak penisilin G dari pada fenil asetat.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kristal asam sitrat (C₆H₈)₇.H₂O (Sigma), kristal garam sitrat (C₆H₅O₇Na₃.2H₂O) (Sigma), kristal garam posfat (Na₂HPO₄.2H₂O) (Sigma), kristal garam posfat (NaH₂PO₄.H₂O) (SIGMA), Span 80 (Sigma), pelarut *n*-butyl asetat, kerosen (Sigma) dan dioktilamin (Aldrich) merupakan bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini dan memiliki kualitas proanalisis (p.a.).



Gambar 2. Skema proses transport penisilin melalui membran cair emulsi

Bahan-bahan untuk proses fermentasi yaitu: *Penicillium chrysogenum* NCIM 733, glukosa, starch, (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, minyak kedelai, glukosa, MgSO₄, CaCO₃, *antifoam* dan buffer pH 6,85.

Alat

Konsentrasi penisilin G dan fenil asetat hasil ekstraksi diukur dengan menggunakan HPLC merk Shimadzu Jepang dengan detektor UV. Komposisi eluen 0,01 M NH₄H₂PO₄ : metanol = 7:3; kecepatan alir 1 mL/menit, kolom C8, panjang gelombang 225 nm. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter merk Hanna®. Untuk pemecah emulsi digunakan rangkaian alat dengan frekuensi 2.500 Hz dan tegangan 76 volt AC. Pengaduk reaktor memiliki kecepatan 100 s/d 600 rpm, sedangkan pengaduk pembuat emulsi memiliki kecepatan 1.000 s/d 10.000 rpm.

Alat gelas yang digunakan antara lain: Labu volumetri kapasitas 100 mL, 50 mL dan 25 mL; corong pisah 100 mL; pipet volumetri 10 mL dan 25 mL; pipet ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL; serta mikropipet 100 µL. Reaktor untuk tempat kontak antara fasa emulsi dengan fasa umpan berkapasitas 250 mL, dilengkapi aliran air sebagai pengatur suhu. Wadah pemisah emulsi berkapasitas 20 mL.

Prosedur Kerja

Media dan kondisi fermentasi

Penicillium chrysogenum NCIM 733 dibiakkan (*cultivated*) dalam medium (*starch* 0,5%, (NH₄)₂SO₄ 0,5%, KH₂PO₄ 0,5%, minyak kedelai 0,2%, glukosa 1,5%, MgSO₄ 0,02%, CaCO₃ 0,5%, *antifoam* 0,1%, pH 6,85). Ke dalam tabung dimasukkan 100 ml medium yang diinokulasi dengan 5 mL suspensi spora lalu diinkubasi selama 120 jam pada suhu 30 °C sambil diaduk dengan *orbital shaker* pada 180 rpm.

Penentuan waktu retensi dan luas kurva larutan standar tunggal dan campurannya secara HPLC

Penentuan waktu retensi dan luas kurva larutan standar penisilin G (a). Dengan instrumen HPLC diinjek melalui siring sejumlah volume 1mM larutan penisilin G standar dengan kondisi pengukuran sebagai berikut: perbandingan eluen 0,01 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: metanol = 7:3; laju alir 1 mL/menit, kolom C8, detektor uv pada panjang gelombang 225 nm.

Penentuan waktu retensi dan luas kurva larutan standar fenil asetat. Cara kerja yang sama dilakukan seperti langkah (a), tetapi penisilin G diganti dengan 1 mM fenil asetat.

Penentuan waktu retensi dan luas kurva campuran larutan standar penisilin G dan fenil asetat. Cara kerja yang sama dilakukan seperti langkah (a), tetapi larutan yang diinjek adalah campuran larutan standar penisilin G dengan fenil asetat masing-masing konsentrasinya 1 mM.

Penentuan konsentrasi penisilin g dan fenil asetat hasil fermentasi

Sebelum dilakukan pengukuran, hasil fermentasi terlebih dahulu disaring dengan mikrofiltrasi untuk memisahkan antara mycelium dari cairan hasil fermentasi. Sejumlah 1 mL filtrat dipipet kemudian diencerkan sebanyak 50 kali dengan penambahan buffer fosfat pH 7 di labu ukur 50 mL secara kuantitatif. Kemudian diambil sejumlah volume tertentu hasil pengenceran melalui siring dan diinjek ke perangkat HPLC dengan kondisi pengukuran seperti langkah (a).

Ekstraksi penisilin G dari hasil fermentasi

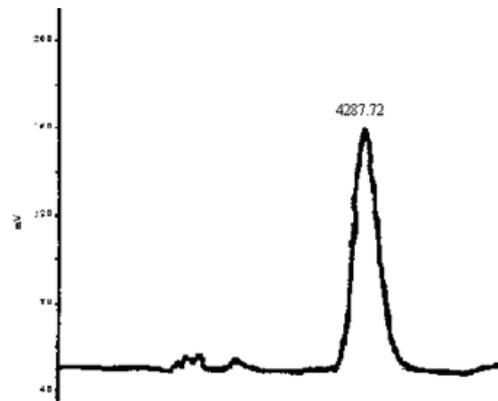
Cairan yang mengandung penisilin G diambil dipisahkan melalui ekstraksi membran cair emulsi pada kondisi optimum. Penisilin G yang diperoleh selanjutnya diubah menjadi kristal dalam bentuk garam penisilin G.

HASIL DAN PEMBAHASAN

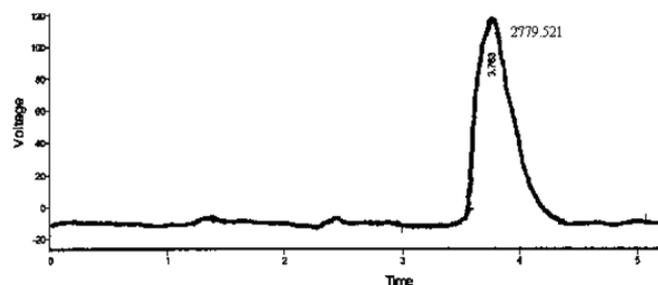
Penentuan waktu retensi larutan standar tunggal dan campurannya secara HPLC

Kromatogram hasil analisis penisilin G standar dapat dilihat pada Gambar 3. Tampak pada kromatogram tersebut hanya terdapat satu puncak dengan waktu retensi 7,16 menit dan luas kurva 4287,72. Puncak tersebut mengindikasikan bahwa penisilin G dalam larutannya tidak mengalami dekomposisi. Hal yang sama untuk analisis fenil asetat standar dapat dilihat pada Gambar 4. Dari hasil elusi 1 mM fenil asetat standar, waktu retensi yang dimiliki 3,76 menit dengan luas kurva 2779,52.

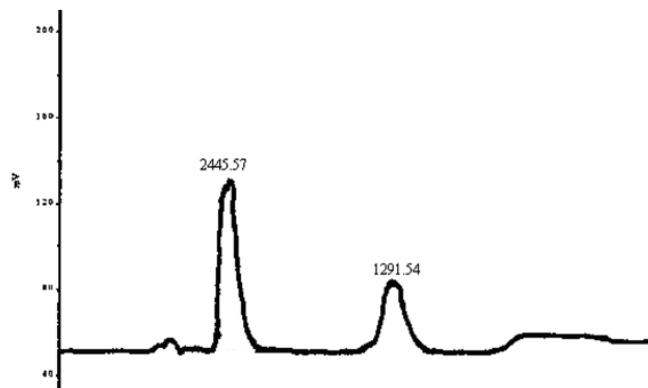
Analisis larutan campuran penisilin G dan fenil asetat standar dapat dilihat pada Gambar 5. Dari



Gambar 3. Kromatogram dan data puncak penisilin G standar 1mM



Gambar 4: Kromatogram dan data puncak fenil asetat standar 1 mM



Gambar 5. Kromatogram dan data puncak campuran penisilin G dan fenil asetat standar dengan konsentrasi masing masing 1 mM

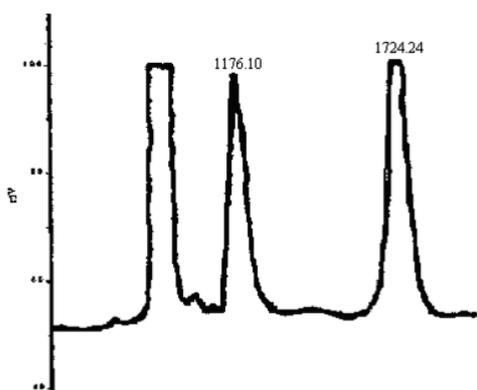
gambar tersebut terlihat 4 puncak yaitu puncak pertama dan kedua adalah puncak larutan buffer sedang puncak ketiga adalah puncak fenil asetat dengan waktu retensi 4,06 menit dan luas kurva 2445,57 sedang puncak keempat adalah puncak penisilin G dengan luas kurva = 1291,54 dan waktu retensi 7,91 menit. Dari data ini dapat ditabelkan antara larutan tunggal dan campurannya terhadap waktu retensi yang diperoleh seperti pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Waktu retensi (t_r) penisilin G dan fenil asetat yang diukur secara HPLC dalam larutan tunggalnya dengan konsentrasi masing-masing 1 mM

Senyawa	t_r menit
Fenil asetat	3,76
Penisilin G	7,16

Tabel 2. Waktu retensi (t_r) penisilin G dan fenil asetat yang diukur secara HPLC dalam campurannya dengan konsentrasi masing-masing 1m M

Senyawa	t_r menit
Fenil asetat	4,06
Penisilin G	7,91



Gambar 6. Kromatogram dan data puncak penisilin G dan fenilasetat hasil fermentasi

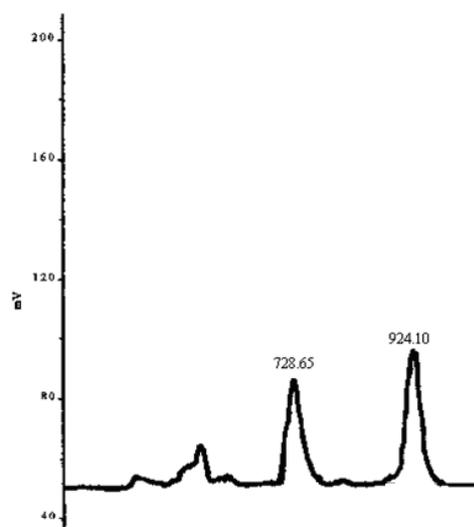
$$\Delta t_r \text{ larutan tunggal} = 3,4 \text{ menit} \frac{t_r \text{ pen G}}{t_r \text{ fen as}} = 1,9$$

$$\Delta t_r \text{ campuran} = 3,85 \text{ menit}, \frac{t_r \text{ pen G}}{t_r \text{ fen as}} = 1,9$$

Berdasarkan harga (t_r) penisilin G dan fenil asetat dari Tabel 1 dan 2 baik dari hasil pengukuran larutan tunggal maupun campurannya memperlihatkan kedua senyawa ini terpisah dengan sempurna dengan jarak waktu retensi (Δt_r) yang cukup jauh, yakni sekitar 3,4 hingga 3,85 menit. Dari gambar kromatogram larutan campuran menunjukkan bahwa penisilin G maupun fenil asetat dalam larutannya dalam keadaan stabil.

Penentuan konsentrasi kandungan penisilin G dan fenil asetat hasil fermentasi

Hasil elusi pengenceran sebanyak 50 kali dari hasil fermentasi didapatkan kromatogram seperti Gambar 6. Dari Gambar 6 didapatkan dua puncak kromatogram, puncak pertama memiliki waktu retensi 3,99 menit dengan luas kurva 1176,10 sedang puncak kedua waktu retensinya adalah 7,60 menit dengan luas kurva 1724,24. Melalui perbandingan waktu retensi kedua kromatogram hasil fermentasi terhadap kromatogram larutan standar tunggal maupun campurannya dalam



Gambar 7. Kromatogram dan data puncak penisilin G dan fenil asetat hasil ekstraksi

kondisi elusi yang sama menunjukkan bahwa kromatogram pertama hasil fermentasi adalah fenil asetat sedang kromatogram kedua adalah penisilin G. Konsentrasi penisilin G dan fenil asetat hasil fermentasi diperoleh dengan cara membandingkan luas kurva penisilin G dan fenil asetat hasil fermentasi dengan larutan campuran standarnya. Konsentrasi penisilin G hasil fermentasi adalah 495,42 ppm. Jika dikonversi ke konsentrasi larutan semula menjadi 24771 ppm. Konsentrasi fenil asetatnya 65,35 ppm. Konsentrasi fenil asetat jika dikonversi ke konsentrasi mula-mula 32675 ppm.

Ekstraksi penisilin G dari hasil fermentasi

Untuk mengetahui konsentrasi penisilin G dan fenil asetat hasil ekstraksi dengan teknik membran cair ini, terlebih dahulu dilakukan deemulsifikasi fasa emulsi. Karena penisilin G dan fenil asetat hasil ekstraksi berada di dalam fasa emulsi. Setelah fasa emulsi pecah, terjadi dua lapisan yaitu fasa membran dan fasa internal, penisilin G berada di fasa internal dipisahkan dengan cara memutar kran yang terdapat pada alat tersebut. Fasa internal dianalisa untuk ditentukan kuantitas penisilin G dan fenil asetat secara HPLC, sedang fasa membran digunakan untuk ekstraksi tahap berikutnya.

Hasil analisis fasa internal penentuan kuantitatif secara HPLC kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 7. Dari Gambar 7 dapat dilihat bahwa puncak ke tiga adalah puncak fenil asetat dengan waktu retensi 4,25 menit dan luas kurva 728,65 sedang puncak keempat adalah puncak penisilin G dengan waktu retensi 6,47 menit dan luas kurva 924,10. Dengan demikian maka konsentrasi penisilin G hasil

ekstraksi adalah 264,47 ppm. Persentase perolehan penisilin G 53,38%. Konsentrasi fenil asetat hasil ekstraksi 39,48 ppm. Persentase perolehan fenil asetat 60,41 %.

Diharapkan dari hasil ekstraksi bahwa penisilin G terpisah dari fenil asetat ternyata fenil asetat tetap ikut terekstraksi bersama penisilin G. Hal ini dapat dijelaskan bahwa ternyata efek sterik (besar dan kecil ukuran molekul) berpengaruh terhadap proses ekstraksi pada teknik membran cair emulsi ini. Pada teknik membran cair emulsi, agar emulsi tidak pecah (stabil) digunakan surfaktan (Span 80) sebagai penurun tegangan permukaan. Surfaktan pada butiran emulsi terletak pada batas antara fasa eksternal dengan fasa membran dan batas antara fasa membran dengan fasa internal. Surfaktan berbentuk misel yang lentur, berpengaruh terhadap ukuran molekul yang akan masuk ke fasa membran. Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa ukuran molekul penisilin G lebih besar dibanding fenil asetat, sehingga fenil asetat akan lebih mudah masuk ke fasa membran dari pada penisilin G. Dengan demikian pada fasa internal didapatkan fenil asetat yang lebih besar jumlahnya daripada penisilin G. Berdasarkan teori kepolaran yang telah dikemukakan pada pendahuluan ternyata efek sterik lebih dominan pengaruhnya terhadap proses pemisahan pada teknik membran cair emulsi.

KESIMPULAN

Konsentrasi penisilin G dan fenil asetat hasil fermentasi dalam 50 mL adalah 24771 ppm dan 32675 ppm. Hasil ekstraksi dengan teknik membran cair emulsi memberikan persentase penisilin G 53,38% sedang fenil asetat 60,41%. Perolehan persentase fenil asetat yang tinggi (60,41%) menunjukkan bahwa penisilin G masih belum dapat dipisahkan dari fenil asetat dengan teknik ekstraksi membran cair emulsi. Walaupun kepolaran penisilin G yang rendah memungkinkan penisilin G terekstrak lebih banyak dibanding fenil asetat, ternyata efek sterik fenil asetat yang memiliki ukuran molekul lebih kecil dari penisilin G memberikan fakta bahwa efek

sterik lebih dominan pengaruhnya dari pada kepolaran. Hal ini dibuktikan dengan perolehan persentase fenil asetat yang lebih tinggi dibanding penisilin G.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Nomor: 012/SP2H/PP/DP2M/III/2008, tanggal 8 Maret 2008.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee, C.J., Yeh, H.J., Yang, W.Y and Kan, C.R., 1994, *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 309-313.
2. Pai, R.A., Doherty, M.F., and Malone, M.F, 2002, *AIChE J.*, 48, 3, 514-526.
3. Adikane, H.V., Singh, R.K., and Nene, S.N., 1999, *J. Membr. Sci.*, 162,1-2, 119-123.
4. van der Wielen L.A.M., Lankveld M.J.A., and Luyben K.Ch.A.M, 1996, *J. Chem. Eng. Data*, 41, 239-243.
5. Chen, D.H, Wang, S.S., and Huang, T.C., 1995, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 64, 284-292.
6. Wang, Z., Guo, Y., Bao, D., and Qi, H., 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81, 560-565.
7. Matsumoto, M., Ohtani, T., and Kondo, K., 2007, *J. Membr. Sci.*, 289, 92-96.
8. Yang, C., Cussler, E.L., 2000, *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 1, 66-73.
9. Breembroek, G.R.M., Witkamp, G.J., and van Rosmalen, G.M., 2000, *Sep. Sci. Technol.*, 35,10, 1539-1571.
10. Lee, S.C., 2004, *J. Membr. Sci.*, 237, 225-232.
11. Frank A.F., 1997, *Sep. Sci. Technol.*, 32, 573-583.
12. Hano, T., Ohtake, T., Matsumoto, M., Ogawa, S., and Hori, F., 1990, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 23, 6, 772-775.