ISOLASI ASAM HIALURONAT DENGAN PRESIPITASI DAN MEMBRAN MIKROFILTRASI *CROSSFLOW*

Erliza Noor

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Hyaluronic Acid (HA) is a high molecular weight and linear polysaccharide which is produced commercially for a wide range of use, such as pharmaceuticals, medical and cosmetic industries. HA, the cementing substances in connective tissue, can be extracted from rooster comb and umbilical cord. More recently, production of HA has been developing by microbial cultivation to increase the yield of production. The purposes of this research are isolating HA from the fermentation broth by precipitation and crossflow microfiltration, also comparing these methods. Precipitation uses etanol, isopropanol and CTAB as the solvents and this research, would seek the best solvent, physical and chemical parameters of the process. The other method, crossflow microfiltration uses a polysulfone membrane tubular with nominal pore size 0.1μm, diameter of tube 1.5 mm. The variables examined were transmembrane pressure, crossflow velocity and feed concentration. The results of precipitation process exhibited that etanol and isopropanol gave the optimum HA precipitate at 95 percent concentration with comparison 1 : 2 for supernatant and solvent. The other method using crossflow microfiltration resulted that steady state flux was achieved rapidly, suggesting that process was stable and no significant fouling occured. In general, the flux increased with increasing transmembrane pressure differences and crossflow velocity and decreased with increasing concentration of HA. Thus, microfiltration can be used to concentrate HA broth cultivation.

PENDAHULUAN

Asam hialuronat adalah polisakarida linear yang merupakan salah satu produk farmasi yang dapat diperoleh melalui proses kultivasi menggunakan bakteri *Streptococcus* (Gibbs, 1968). Hasil kultivasi memerlukan penanganan lebih lanjut (isolasi) untuk memperoleh produk akhir sesuai dengan spesifikasi yang diinginkan dan memisahkan produk dari komponen-komponen, sisa media dan senyawa pengotor lainnya (Belter *et al*, 1988).

Isolasi asam hialuronat dapat dilakukan dengan proses presipitasi. Dengan proses ini akan dihasilkan konsentrasi dan kemurnian produk akhir yang cukup baik. Keuntungan dari presipitasi adalah lebih mudah digunakan untuk skala besar dengan peralatan yang sederhana dan menggunakan banyak alternatif pelarut dengan harga yang murah dan konsentrasi yang relatif rendah (Bailey dan Ollis, 1986). Metode lain yang dapat dikembangkan adalah dengan filtrasi membran. Filtrasi ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain merupakan teknologi yang sederhana, biaya operasi dan kapital yang rendah dan dan relatif mudah untuk meningkatkan skala operasinya (Wankat, 1990).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi asam hialuronat dengan teknik presipitasi dan mikrofiltrasi *crossflow* sehingga dapat dilihat perbandingan antara kedua metode yang digunakan.

BAHAN DAN METODE

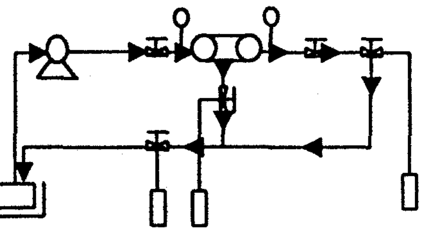
Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam hialuronat (BM 1,0 - 6,0.10^6 Da) hasil kultivasi yang masih bercampur dengan kaldu fermentasinya. Sedangkan peralatan yang digunakan dibagi menjadi peralatan presipitasi dan peralatan mikrofiltrasi *crossflow*.

Peralatan yang digunakan untuk presipitasi adalah spektrofotometer GBC UV/VIS 911 A, vakum filter milipore sentrifuse Brookfield LVF, oven memmert, desikator Glaswer Westheim GL 32, shaker suhu certomat B. Braun, shaker suhu ruang KS 501 D, pH-meter Hana-8519, vortex Maxi Mix II-37600, ultrasentrifuse Sorvall RC 5B Plus, glucose analyzer YSI 2700 select, viscometer Brookfield LVT, labu erlenmeyer dan alat-alat gelas. Sedangkan peralatan yang digunakan untuk mikrofiltrasi adalah modul capillary membran polisulfon (luas permukaan efektif sekitar 26 cm^2 dan diameter tube 1.5 mm serta ukuran rata-rata pori 0.1μm), penangas air, termometer, alat-alat gelas, pompa, selang, fitting dan valve dengan rangkaian alat seperti pada Gambar 1.

Metodologi

Presipitasi asam hialuronat dimulai setelah kaldu kultivasi mempunyai yield cukup besar. Sel pada kaldu kultivasi dipisahkan dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 menit, pada suhu 4°C. Pada supernatant ditambahkan NaCl 1 persen (b/v), kemudian dengan pelarut yaitu etanol, isopropanol, dan cetyl trimetil amonium bromide (CTAB). Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 20 hingga 95 persen, sedangkan konsentrasi isopropanol pada konsentrasi 40 hingga 90 persen, dan untuk CTAB digunakan konsentrasi 5 persen. Perbandingan volume antara supernatan dan pelarut adalah 1 : 1, 1 : 2, dan 1 : 3. Pencampuran dan pengadukkan dilakukan selama 24 jam. Penyaringan asam hialuronat dilakukan dengan filter vakum selanjutnya asam hialuronat dikeringkan pada suhu 70°C selama 24 jam.



Gambar 1. Rangkaian alat proses operasi mikrofiltrasi *crossflow*

Sebelum tahap *recovery* dengan mikrofiltrasi, terlebih dahulu dilakukan pembunuhan sel dengan asam lalu pemisahan biomassa dengan sentrifugasi pada kondisi seperti di atas. Pada mikrofiltrasi *crossflow*, sebelum membran digunakan harus dilakukan sanitasi dengan mengalirkan air destilat dengan suhu 45°C selama 30 menit untuk menghilangkan residu kimia dan dilanjutkan dengan pembilasan dengan sodium hipoklorit 440 ppm pada suhu 40°C selama dua menit. Setelah itu dilakukan penentuan fluks air untuk menentukan kinerja membran. Pengamatan dilakukan terhadap pengaruh waktu, tekanan transmembran, kecepatan *crossflow* dan konsentrasi asam hialuronat terhadap fluks yang dihasilkan. Untuk mengetahui pengaruh waktu terhadap fluks, operasi dilakukan pada kecepatan *crossflow* 0.1 dan 0.18 m/detik dengan konsentrasi asam hialuronat 1.4 dan 1.9 g/L dan tekanan transmembran 1.2 atm. Sedangkan untuk mengamati pengaruh tekanan transmembran terhadap fluks, operasi dilakukan pada tekanan transmembran antara 1.25 - 1.57 atm dan kecepatan *crossflow* 0.32 dan 0.86 m/detik. Pengamatan pengaruh kecepatan *crossflow* terhadap fluks dilakukan dengan cara mengoperasikan proses pada kecepatan *crossflow* 0.34, 0.51, 0.83 dan 1.12 m/detik dengan tekanan transmembran dipertahankan konstan antara 1.45 - 1.6 atm. Pengamatan terakhir adalah pengaruh konsentrasi terhadap fluks, dilakukan dengan mengukur fluks pada berbagai konsentrasi asam hialuronat yaitu 0.9, 0.18 dan 2.8 g/L pada kecepatan *crossflow* 0.3, 0.55, 0.73 dan 0.91 m/detik dan tekanan transmembran dipertahankan konstan antara 1.45 - 1.6 atm

HASIL DAN PEMBAHASAN

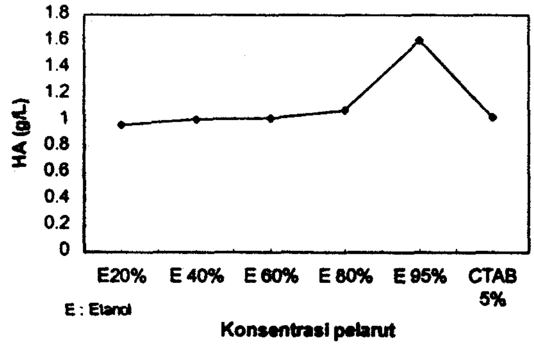
Presipitasi

Presipitasi diawali dengan penambahan garam NaCl dengan konsentrasi 0.17 M. Pemilihan NaCl dipertimbangkan karena harganya yang relatif murah walaupun kekuatan ioniknya tergolong dalam selang kekuatan ionik terbaik.

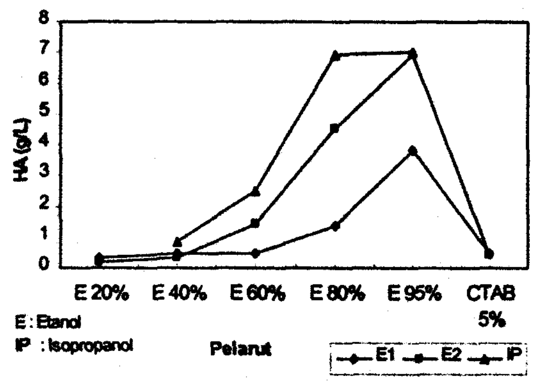
Asam hialuronat standar pada pH 6.62 menghasilkan fraksi terlarut asam hialuronat yang paling kecil, sehingga diperkirakan pH 6.62 merupakan titik isoelektrik asam hialuronat. Dari hasil yang diperoleh, diketahui nilai pH larutan yang dipresipitasi dengan etanol 95 persen adalah 6.60, dimana nilai pH ini sangat dekat dengan pH pada titik isoelektrik, sehingga pelarut etanol 95 persen menghasilkan fraksi asam hialuronat yang tertinggal dalam kaldu kultivasi paling kecil. Untuk supernatan yang ditambahkan pelarut etanol 20, 40, 60, dan 80 persen menghasilkan nilai pH yang jauh dari titik isoelektrik, sehingga diduga asam hialuronat masih banyak yang tertinggal dalam kaldu kultivasi setelah proses presipitasi. Sedangkan nilai pH supernatan sesudah ditambah dengan pelarut etanol pada perbandingan 1 : 2 mendekati nilai pH dari titik isoelektrik, yaitu 6.6. Dengan demikian perbandingan supernatan dan pelarut etanol 1 : 2 adalah yang paling baik untuk presipitasi, karena pH-nya mendekati pH titik isoelektrik.

Pada perbandingan volume supernatan dan pelarut 1 : 1, diperoleh hasil presipitasi flok yang terbentuk dan mengendap setelah supernatan ditambah dengan etanol 20 persen adalah yang paling sedikit, sedangkan flok yang terbentuk dan mengendap setelah penambahan etanol 95 persen adalah yang terbesar. Hasil tersebut menunjukkan bahwa asam hialuronat yang diperoleh semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi pelarut. Hal ini sesuai dengan Kastner dan Golker (1987), yang menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi pelarut akan menyebabkan penurunan konstanta dielektrik dan meningkatkan gaya tarik Coulomb, sehingga kelarutan akan turun.

Dua jenis pelarut yang digunakan secara bersama-sama yaitu etanol dan CTAB, memperlihatkan bahwa CTAB menghasilkan endapan asam hialuronat yang kurang baik pada konsentrasi 5 persen. CTAB mempunyai rumus kimia $C_{19}H_{42}BrN$. Kecilnya endapan asam hialuronat yang terbentuk diduga karena konsentrasi CTAB yang digunakan relatif kecil, yaitu 5 persen. Hal ini mengingat bahwa penggunaan CTAB dalam konsentrasi yang besar sangat tidak efisien, karena CTAB mempunyai harga yang sangat mahal dibandingkan dengan pelarut etanol dan isopropanol. Grafik presipitasi pelarut pada berbagai konsentrasi disajikan pada Gambar 2, 3, dan 4 dibawah ini.



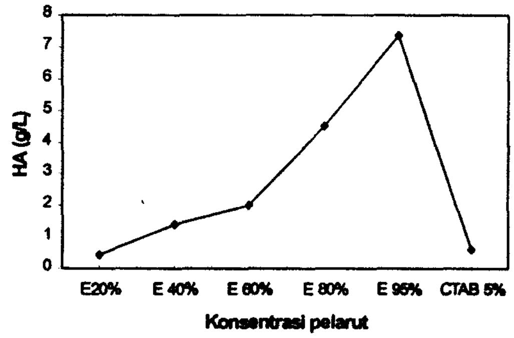
Gambar 2. Variasi konsentrasi pelarut etanol dan CTAB pada presipitasi dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1:1



Gambar 3. Variasi konsentrasi pelarut etanol, CTAB, dan isopropanol pada presipitasi dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1:2

Penentuan konsentrasi pelarut terbaik pada presipitasi menggunakan etanol pada perbandingan supernatan dan pelarut 1:3, memberikan kecenderungan perolehan endapan asam hialuronat yang sama dengan presipitasi sebelumnya, yaitu semakin tinggi konsentrasi pelarut etanol yang digunakan akan menghasilkan endapan asam hialuronat yang semakin tinggi pula. Hasil presipitasi ini menghasilkan asam hialuronat terbesar pada pelarut etanol konsentrasi 95 persen, yaitu sebesar 7.35 g/L.

Untuk mengetahui efisiensi jumlah pelarut yang digunakan dalam presipitasi, maka dilakukan presipitasi pada berbagai perbandingan supernatan dan pelarut yaitu 1 : 1, 1 : 2, dan 1 : 3 dari kaldu kultivasi yang sama, yang mempunyai nilai viskositas 20 centipoise.



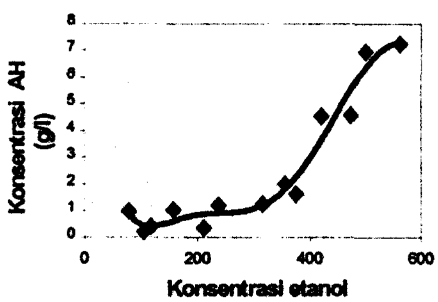
Gambar 4. Variasi konsentrasi pelarut etanol dan CTAB pada presipitasi dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1:3

Presipitasi menggunakan etanol konsentrasi 95 persen pada perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 1 hanya menghasilkan endapan asam hialuronat 1.34 g/L. Hasil ini sangat kecil bila dibandingkan dengan endapan asam hialuronat yang diperoleh pada perbandingan 1 : 2, yaitu sebesar 5.90 g/L, dan untuk perbandingan 1 : 3 sebesar 5.92 g/L. Pada perbandingan 1 : 2 dengan 1 : 3, perbedaan endapan asam hialuronat yang diperoleh kecil sekali, yaitu 0.02 g/L. Hal ini diduga pada perbandingan supernatan : pelarut etanol 95 persen 1 : 2, jumlah pelarut etanol yang digunakan sudah optimum, sehingga hampir semua asam hialuronat dalam supernatan dapat diendapkan. Pada perbandingan supernatan dan pelarut etanol 95 persen 1 : 3, jumlah pelarut etanol 95 persen yang digunakan sudah berlebih sehingga tidak banyak berpengaruh terhadap penambahan perolehan endapan asam hialuronat.

Presipitasi pada perbandingan supernatan dan pelarut isopropanol 90 persen 1 : 1 memberikan kecenderungan yang sama dengan presipitasi menggunakan pelarut etanol 95 persen. Pada kondisi tersebut diperoleh endapan asam hialuronat 2.49 g/L, sedangkan pada perbandingan 1 : 2 diperoleh endapan asam hialuronat 6.90 g/L, dan untuk perbandingan 1 : 3 diperoleh hasil endapan asam hialuronat sebesar 7.06 g/L. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa antara perbandingan supernatan : pelarut isopropanol 90 persen sebesar 1 : 2 dengan 1 : 3 memberikan hasil yang tidak berbeda nyata. Sedangkan perbedaan perolehan endapan asam hialuronat pada presipitasi menggunakan etanol 95 persen dengan presipitasi menggunakan isopropanol 90 persen, diduga karena variasi kaldu kultivasi yang digunakan.

Dengan demikian untuk efisiensi jumlah pelarut pada presipitasi asam hialuronat dengan menggunakan pelarut etanol 95 persen ataupun isopropanol 90 persen sebaiknya digunakan pada perbandingan supernatan dan pelarut 1:2

Gambar 6 juga menggambarkan kecenderungan perolehan asam hialuronat yang sebanding dengan konsentrasi pelarut etanol yang digunakan dalam presipitasi. Perolehan endapan asam hialuronat ini dapat dibagi menjadi tiga bagian, yaitu (1) pada konsentrasi etanol antara 100 g/L sampai 350 g/L, perolehan endapan asam hialuronat mengalami peningkatan yang lambat. Hal ini karena pada konsentrasi etanol 100 g/L sampai 350 g/L diduga asam hialuronat yang terdapat dalam supernatan hanya sebagian kecil saja yang dapat terendapkan; (2) konsentrasi etanol 350 g/L sampai 500 g/L, perolehan endapan asam hialuronat pada selang ini mengalami peningkatan yang tinggi; (3) konsentrasi etanol 500 g/L sampai 600 g/L, terlihat bahwa perolehan asam hialuronat mulai lambat kembali (stasioner), hal ini diduga pada konsentrasi etanol 500 g/L yang setara dengan etanol konsentrasi 95 persen pada perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 2 sudah merupakan konsentrasi yang optimum untuk presipitasi asam hialuronat. Penggunaan pelarut etanol pada konsentrasi etanol 95 persen dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1: 2, memberikan hasil yang optimum.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi pelarut etanol terhadap perolehan endapan asam hialuronat.

Dari uji *uronic acid assay* diketahui nilai kemurnian dari perbandingan supernatan dan pelarut etanol 95 persen 1 : 2 dan 1 : 3 masing-masing adalah 54.6 persen, dan 56 persen. Dengan demikian, asam hialuronat murni yang dihasilkan adalah 3.22 g/L untuk perbandingan 1 : 2, dan 3.31 g/L untuk perbandingan 1 : 3. Hasil ini sebagai parameter bahwa untuk pelarut etanol, perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 2 akan lebih efisien daripada 1 : 3 untuk skala yang lebih besar.

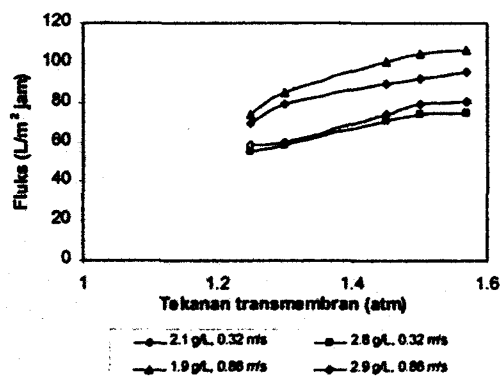
Penggunaan pelarut etanol 95 persen menghasilkan kemurnian yang paling tinggi, yaitu mencapai nilai kemurnian 60 persen. Sedangkan presipitasi isopropanol 60 persen menghasilkan kemurnian 46.3 persen, isopropanol 80 persen 58.1 persen, dan isopropanol 90 persen 63.2 persen.

Asam hialuronat murni yang dihasilkan pada beberapa perbandingan supernatan dan pelarut etanol (1 : 1, 1 : 2, 1 : 3) terbesar dihasilkan oleh etanol konsentrasi 95 persen yaitu 4.05 g/L, sedangkan etanol 80 persen menghasilkan asam hialuronat murni 1.24 g/L. Presipitasi dengan etanol 60 persen menghasilkan 0.06 g/L asam hialuronat murni. Presipitasi menggunakan pelarut isopropanol menghasilkan asam hialuronat murni terbesar pada konsentrasi 90 persen, yaitu 4.43 g/L.

Pelarut etanol memiliki harga lebih rendah daripada isopropanol sehingga untuk proses presipitasi asam hialuronat sebaiknya digunakan jenis pelarut etanol dengan konsentrasi 95 persen pada perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 2.

Mikrofiltrasi *Crossflow*

Pada mikrofiltrasi asam hialuronat ini, operasi dengan tekanan tinggi menghasilkan fluks yang relatif tidak dipengaruhi oleh perbedaan tekanan transmembran. Fluks yang dihasilkan oleh semua perlakuan yang diamati mengarah pada kondisi *limitting flux* yaitu kondisi saat fluks tidak lagi dipengaruhi oleh tekanan transmembran. Kurva hubungan antara fluks dengan tekanan transmembran dapat dilihat pada Gambar 7.



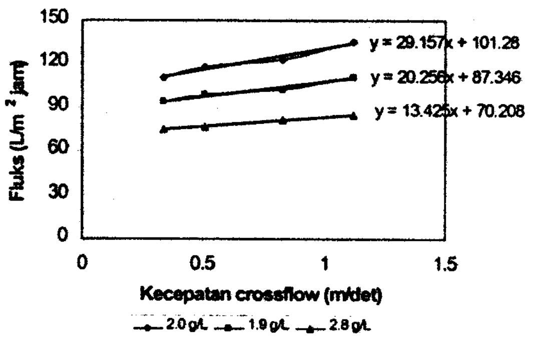
Gambar 7. Kurva hubungan antara fluks asam hialuronat dengan tekanan transmembran

Dari Gambar 7 dapat dilihat bahwa pada tekanan kurang dari 1.5 atm, fluks dipengaruhi oleh tekanan transmembran. Semakin besar tekanan transmembran semakin tinggi pula fluks yang diperoleh. Sedangkan pada tekanan lebih dari 1.5 atm, peningkatan tekanan transmembran relatif tidak mempengaruhi fluks dan fluks cenderung konstan. Wilayah tekanan dengan fluks tidak dipengaruhi lagi oleh tekanan transmembran disebut *pressure* *independent region*. Pada penelitian ini diperkirakan berada di atas 1.5 atm.

Pengamatan selanjutnya adalah pengaruh fluks terhadap kecepatan *crossflow*. Kurva hubungan antara fluks asam hialuronat terhadap kecepatan *crossflow* dapat dilihat pada Gambar 8.

Dari Gambar 8 terlihat bahwa fluks asam hialuronat meningkat dengan semakin tingginya kecepatan *crossflow*. Hal ini menunjukkan bahwa pada *pressure independent region* variabel kecepatan *crossflow* berperan penting dalam mengontrol ketebalan lapisan batas (*boundary layer*).

Kemiringan garis untuk perlakuan konsentrasi 1.9, 2.0 dan 2.8 g/L masing-masing adalah 88.0, 88.1 dan 85.6. Ini berarti bahwa pada selang konsentrasi rendah, pengaruh perbedaan kecepatan *crossflow* lebih besar dibandingkan pada selang konsentrasi tinggi.



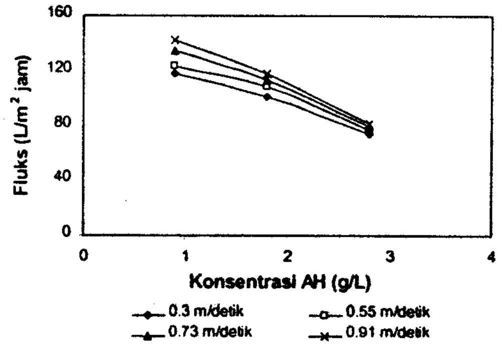
Gambar 8. Kurva hubungan antara fluks asam hialuronat terhadap kecepatan *crossflow*

Pengaruh kecepatan *crossflow* terhadap fluks juga dapat diberikan dalam bentuk nilai eksponen kecepatan *crossflow* seperti pada persamaan $J_v = kv^{\alpha}$. Tabel 2 menunjukkan nilai k dan α untuk berbagai konsentrasi asam hialuronat. Berdasarkan data pada Tabel ini, maka persamaan fluks menjadi $J_v = kv^{0.126}$.

Tabel 2. Nilai k dan α untuk berbagai konsentrasi asam hialuronat.

Konsentrasi HA (g/L)	k	α
1.9	130.20	0.150
2.0	107.45	0.120
2.8	83.56	0.110
Rata-rata		0.126

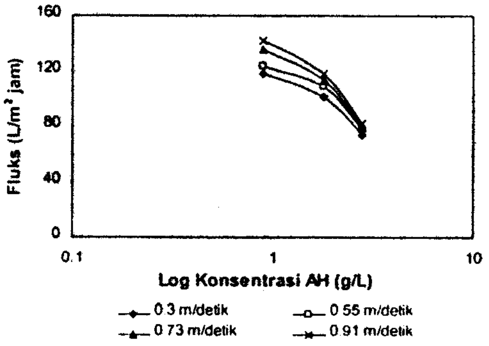
Variabel yang juga penting diamati adalah pengaruh konsentrasi asam hialuronat terhadap fluks. Kurva hubungan antara fluks dengan konsentrasi asam hialuronat dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Kurva hubungan antara fluks dengan konsentrasi asam hialuronat

Dari Gambar 9 secara umum dapat dilihat bahwa fluks asam hialuronat menurun dengan meningkatnya konsentrasi asam hialuronat. Penurunan fluks pada selang konsentrasi yang diamati yaitu 1.9 - 2.8 g/L bersifat linear.

Hubungan antara fluks dengan konsentrasi umpan juga dapat digambarkan dengan plot kurva antara *limiting flux* dengan logaritmik konsentrasi umpan. Dari kemiringan kurva didapatkan nilai k yaitu koefisien transfer massa, yang dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kurva hubungan antara fluks asam hialuronat dan logaritma konsentrasi.

Nilai k diperoleh dari hasil perhitungan untuk semua perlakuan kecepatan *crossflow*. Dari gambar tersebut juga dapat dilihat bahwa ekstrapolasi kurva linear hasil perlakuan semua kecepatan *crossflow* pada J=0 akan konvergen pada satu titik yaitu konsentrasi gel.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pelarut etanol dan isopropanol menghasilkan asam hialuronat yang sangat baik. Etanol menghasilkan asam hialuronat tertinggi 7.14 g/L pada perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 3 dengan nilai kemurnian 55.2 persen, sedangkan isopropanol pada perbandingan 1 : 3 menghasilkan endapan asam hialuronat tertinggi 7.06 g/L dengan nilai kemurnian 61.3 persen. Proses presipitasi yang disarankan adalah menggunakan jenis pelarut etanol dengan konsentrasi 95 persen pada perbandingan supernatan dan pelarut 1 : 2. Nilai pH dari supernatan yang telah ditambahkan dengan pelarut etanol yang mendekati nilai titik isoelektrik akan lebih mudah untuk diendapkan. Nilai pH 6,6 adalah yang paling mendekati titik isoelektrik. Perlu dilakukan pengujian menggunakan NaCl pada berbagai konsentrasi. dikaji faktor ekonomi/nilai ekonomis AH yang dihasilkan dari penggunaan 2 jenis pelarut diatas (etanol dan isopropanol).

Isolasi asam hialuronat juga dapat dilakukan dengan filtrasi membran. Fluks tertinggi yang diperoleh mencapai 142 L/m^2 jam. Pada operasi bertekanan tinggi, fluks relatif tidak dipengaruhi oleh tekanan transmembran. *Pressure independent region* dicapai pada tekanan transmembran di atas 1.45 atm. Kecepatan *crossflow* akan meningkatkan fluks dan nilai α rata-rata sebesar 0.126. Sedangkan konsentrasi asam hialuronat yang semakin tinggi akan menurunkan nilai fluks.

DAFTAR PUSTAKA

Bailey, F.E. and D.F. Ollis. 1986. Bio-chemical Engineering Fundamen-tals. McGraw-Hill Book Company, New York.

Belter, P.A., Cussler, E.L., Shou Hu-Wei. 1988. Bioseparations Downstream Processing for Biotechnology. Department of Chemical Engineering and Material Science. University of Minnesota. Minneapolis, Minnesota.

Gibbs, D.A., E.W. Merril dan K.A. Smith. 1968. Rheology of Hyaluronic Acid. Biopolimer, 6, 777-791.

Kastner, G.S. dan C. Golker. 1987. Product Recovery In Biotech-nology. Di dalam P. Prave, U. Faust, W. Sitting dan D.A. Sukatsch. Fundamentals Of Bio-technology. VCH Verlagsgelshaft mbH, Weinheim.

Morris, E.R., D.A. Rees dan E.J. Welsh. 1980. Conformational and Dyna-mic Interaction in Hyaluronate Solutions. J. Mol. Biol., 138-1400.

Van de Rijn, I. 1983. Streptococcal Hyaluronic Acid : Proposed Me-chanism of Degradation and Loss of Synthesis During Stasionary Phase. J. Bacteriol no.156, 1059-65.

Wankat, P. C. 1990. Rate Controlled Separation. Elsevier Applied Science, London