

PEMANFAATAN LIMBAH SERBUK GERGAJIAN KAYU JATI (*Tectona grandis*) dan KAYU MELINJO (*Gnetum gnemon*) untuk PRODUKSI XILITOL oleh KHAMIR *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

SKRIPSI

oleh:

CICILIA ARISTYA DYAH PUSPITA

0305030107



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2009**

PEMANFAATAN LIMBAH SERBUK GERGAJIAN KAYU JATI (*Tectona grandis*) dan KAYU MELINJO (*Gnetum gnemon*) untuk PRODUKSI XILITOL oleh KHAMIR *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

oleh:

CICILIA ARISTYA DYAH PUSPITA

0305030107



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan benar.

Nama : Cicilia Aristya Dyah Puspita

NPM : 0305030107

Tanda tangan :

Tanggal :

SKRIPSI : PEMANFAATAN LIMBAH SERBUK GERGAJIAN KAYU
JATI (*Tectona grandis*) dan KAYU MELINJO (*Gnetum
gnemon*) untuk PRODUKSI XILITOL oleh KHAMIR
Candida fukuyamaensis UICC Y-247
NAMA : CICILIA ARISTYA DYAH PUSPITA
NPM : 0305030107

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI
DEPOK, 3 JULI 2009



Dr. Endang Saepudin
PEMBIMBING

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana : 9 Juli 2009

Penguji I : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc.....

Penguji II : Dr. rer nat. Budiawan

Penguji III : Dra. Susilowati Hs., M.Sc

LIFE IS...

Life is an opportunity, benefit from it.

Life is beauty, admire it.

Life is a dream, realize it.

Life is a challenge, meet it.

Life is a duty, complete it.

Life is a game, play it.

Life is a promise, fulfill it.

Life is sorrow, overcome it.

Life is a song, sing it.

Life is a struggle, accept it.

Life is a tragedy, confront it.

Life is an adventure, dare it.

Life is luck, make it.

Life is too precious, don't destroy it.

Life is Life, Fight for It.

(Mother Theresa)

Skripsi ini kupersembahkan untuk : Jesus Christ my Savior, Bapak, Mama, Adik-adikku, dan semua orang yang kusayangi. Terimakasih atas segala cinta, doa, dan dukungan kalian. God Bless.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah, Bapa yang Mahakasih, atas segala berkat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Pemanfaatan Limbah Serbuk Gergajian Kayu Jati (*Tectona grandis*) dan Kayu Melinjo (*Gnetum gnemon*) untuk Produksi Xilitol oleh Khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247”, tepat pada waktunya. Karya utama sarjana ini disusun untuk melengkapi persyaratan akhir dalam menempuh ujian sarjana di Departemen Kimia FMIPA UI.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing skripsi dan pembimbing akademis, atas bimbingan, arahan, diskusi, dan bantuan yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan, penelitian, hingga tersusunnya skripsi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI, Dra. Tresye Utari, M.Si. selaku koordinator penelitian, Ir. Widyastuti Samadi, M.Si selaku koordinator pendidikan yang telah memberikan bantuan dalam penelitian, kepada seluruh dosen Departemen Kimia FMIPA UI atas ilmu dan pengajaran yang diberikan, serta kepada Pak Hedi S., Mbak Ema, Mbak Tri, Mbak Ina, Mbak Cucu, Pak Amin, Pak Kiri, Babeh perpus, dan seluruh staf departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

Rasa terimakasih yang begitu dalam, penulis sampaikan kepada orang-orang yang sangat berarti bagi penulis:

1. Mama, Bapak, kedua adikku Tion dan Venta, serta seluruh keluarga besar, yang dengan tulus memberikan kasih sayang, cinta, dan perhatian yang tak terhingga, yang terus mendoakan dan mendukung penulis di setiap waktu.
2. Ria Fatmawati, rekan seperjuangan dalam penelitian xilitol, atas bantuan dan kerja samanya selama 6 bulan ini, serta kepada Riki, Niezha, dan Isal atas arahan dan diskusi selama penelitian.
3. Sahabat-sahabatku seperjuangan mikim '05: Ana (TJ), Hani, Ely, Sepit, dan Siti, terima kasih karena telah memberikan warna-warni, canda-tawa dan persahabatan yang indah selama masa kuliah.
4. Sahabat dan keluargaku tercinta (KMK MIPA UI): Vani, Gaya, Thea, Gobel, dan Wuri serta seluruh teman-teman KMK MIPA yang lain, terima kasih telah menjadi sahabat penulis, dan juga atas dukungan dan doanya.
5. Ira, Winda, Kak Pipin, Via, Kak Ning, Tamara, Hotma, Vinne, Aline, serta seluruh teman-teman asrama St. Rosa, terima kasih atas bantuan dukungan, doa, serta penghiburannya selama penelitian.
6. Rekan-rekan seperjuangan di lantai 4 (Lusi, Angel, Purnama, Destya, Kak Ana, Kak Bibah, Kak Aji, Ratih, Yusni, dan Farouq), rekan-rekan seperjuangan di lantai 3 (Septiana, Lila, Norma, Lulu, Melina, Mutia, Alti, Santi, Susi, Rilian, Andri, dan Lumita), rekan-rekan seperjuangan lantai 1 (Samira, Ronggo, Ramdhan, dan Danang), serta teman-teman 2005 yang

- lainnya, terima kasih atas dukungan dan bantuan selama penelitian (terima kasih juga untuk pinjaman alat-alatnya ya).
7. Tim Lab Afiliasi, terima kasih atas bantuannya dalam penggunaan alat instrumen, khususnya HPLC, selama penelitian.
 8. Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UI, khususnya kepada Ibu Ariyanti, terima kasih atas bantuannya dalam pengadaan bahan penelitian.
 9. Teman-teman angkatan 2004, 2006, 2007, dan 2008, atas dukungannya selama ini.

Dengan sepenuhnya penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Maka dengan segala rendah hati penulis membuka diri bila ada saran dan pendapat untuk perbaikan.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Juni 2009

Penulis

ABSTRAK

Kayu merupakan salah satu hasil hutan di Indonesia yang jumlahnya cukup banyak dan beragam. Perkembangan dalam bidang pengolahan kayu, menimbulkan peningkatan limbah serbuk gergajian yang merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa dan dapat dihidrolisis menjadi xilosa untuk produksi xilitol. Serbuk gergajian kayu yang digunakan adalah serbuk kayu jati dan kayu melinjo. Karena kandungan lignin yang tinggi, sebelum dihidrolisis, dilakukan proses delignifikasi terhadap sampel serbuk kayu dengan menggunakan larutan NaOH 1%. Kondisi hidrolisis optimum didapatkan pada suhu 121 °C selama 60 menit, dengan konsentrasi asam H₂SO₄ 0,3 M. Pemekatan hidrolisat dilakukan untuk mendapatkan kadar xilosa yang lebih besar dengan penguapan pada suhu 70 °C. Hasil pengukuran kadar xilosa dalam hidrolisat pada kondisi optimum, sebelum dan sesudah penguapan adalah sebesar 4,31% dan 5,4% (w/w) untuk serbuk kayu jati yang tidak didelignifikasi; 3,18% dan 3,82% (w/w) untuk serbuk kayu jati didelignifikasi; 5,18% dan 6,16% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo yang tidak didelignifikasi; dan 4,26% dan 5,3% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo didelignifikasi. Hidrolisat kemudian digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi oleh khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247. Sebelum proses fermentasi, dilakukan proses detoksifikasi terhadap hidrolisat dengan menggunakan 1 % arang aktif (w/v) untuk menghilangkan inhibitor yang dapat

mengganggu proses fermentasi oleh khamir. Produk xilitol hasil fermentasi tertinggi, didapatkan pada waktu fermentasi 36 jam yaitu dengan persen konversi xilitol tertinggi sebesar 6,16% untuk sampel serbuk kayu jati yang didetoksifikasi dan 6,35% untuk sampel serbuk kayu melinjo yang didelignifikasi dan didetoksifikasi. Persen *yield* xilitol tertinggi untuk tiap gram sampel, pada kedua jenis sampel serbuk kayu, terdapat pada substrat yang didetoksifikasi, yaitu sebesar 0,32% untuk serbuk kayu jati dan 0,47% untuk serbuk kayu melinjo.

Kata kunci : lignoselulosa, hemiselulosa, xilosa, xilitol, serbuk kayu jati, serbuk kayu melinjo, lignin, delignifikasi, hidrolisis, fermentasi, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247, detoksifikasi.

xii + 109 hlm.;gbr.,lamp.,tab.

Bibliografi : 52 (1969-2009)

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Hipotesis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Xilitol	7
2.1.1 Sejarah Penemuan Xilitol	8
2.1.2 Sifat Fisik dan Kimia Xilitol	9
2.1.3 Proses Produksi Xilitol	10
2.1.4 Metabolisme Pembentukan Xilitol oleh Khamir	11
2.1.5 Perkembangan Pembentukan Xilitol secara Bioteknologi	13
2.2 Xilosa	16
Sifat Fisik dan Kimia Xilosa	16
2.3 Lignoselulosa	17
2.4 Hemiselulosa	20
2.4.1 Hemiselulosa Kayu Keras	20
2.4.1.1 Glukuronoxilan	20
2.3.1.2 Glukomanan	21
2.4.2 Hemiselulosa Kayu Lunak	22

2.4.2.1 Galaktoglukomanan	22
2.4.2.2 Arabinoglukuronoxilan	23
2.4.2.3 Arabinogalaktan	24
2.5 Jati	25
2.5.1 Taksonomi Jati	26
2.5.2 Pemanfaatan Kayu Jati	27
2.6 Melinjo	27
2.6.1 Taksonomi Melinjo	28
2.6.2 Pemanfaatan Melinjo	28
2.7 Hidrolisis Lignoselulosa	29
2.8 Fermentasi	31
2.8.1 Fermentasi Cair	32
2.8.2 Fermentasi Padat	33
2.9 Khamir	33
<i>Candida Fukuyamaensis</i>	34
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Alat dan Bahan	35
3.1.1 Alat-alat yang Digunakan.....	35
3.1.2 Bahan-bahan yang Digunakan	35
3.2 Prosedur Kerja	36
3.2.1 Persiapan Sampel Serbuk Gergajian Kayu	36
3.2.2 Delignifikasi Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Alkali ..	36
3.2.3 Hidrolisis Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Asam	37
3.2.4 Detoksifikasi Hidrolisat sebelum Fermentasi	37
3.2.5 Penyiapan Inokulum	37
3.2.6 Fermentasi	38
3.2.7 Penentuan Jumlah Sel Khamir	39
3.2.8 Variasi Kondisi	39
3.2.9 Larutan Standar	39

3.2.9.1 Larutan Standar Xilosa	40
3.2.9.2 Larutan Standar Xilitol	40
3.2.9.3 Larutan Standar Glukosa	41
3.2.9.4 Larutan Standar Arabinosa	41
3.2.10 Analisis Kimia Sampel	41
3.2.11 Diagram Kerja Secara Umum.....	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	43
4.1 <i>Sampling</i> Serbuk Gergajian Kayu	44
4.2 Persiapan Sampel Serbuk Gergajian Kayu	45
4.3 Delignifikasi Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Alkali	46
4.4 Hidrolisis Sampel Serbuk Kayu dengan Asam.....	49
4.5 Hasil Hidrolisis	51
4.6 Detoksifikasi Hidrolisat dengan Arang Aktif	58
4.7 Identifikasi Standar	59
4.8 Fermentasi oleh Khamir <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247	61
4.9 Hasil Fermentasi.....	63
4.9.1 Hasil Fermentasi Kontrol Xilosa.....	64
4.9.2 Hasil Fermentasi Substrat.....	68
4.9.3 Produk Hasil Samping Fermentasi Xilosa.....	75
4.10 Penghitungan Jumlah Sel Khamir.....	77
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	79
DAFTAR PUSTAKA.....	83
LAMPIRAN.....	89

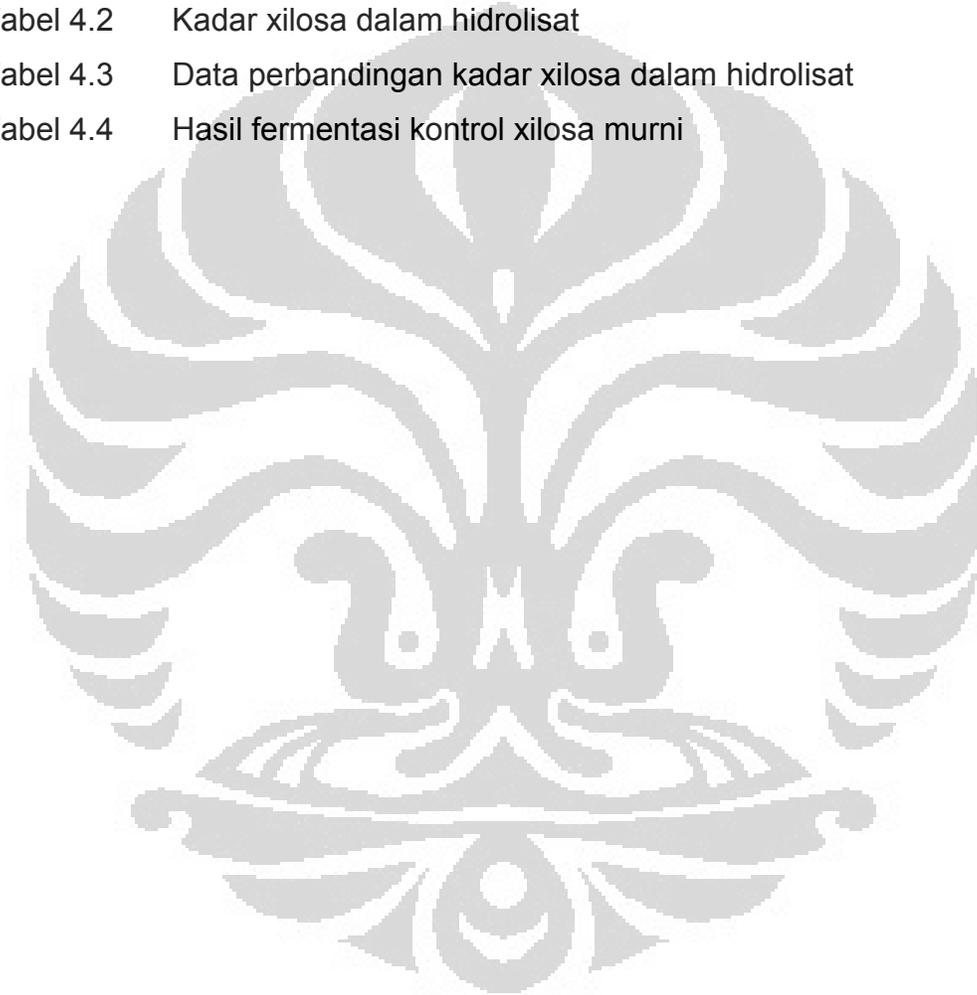
DAFTAR GAMBAR

- Gambar 2.1 Struktur xilitol
- Gambar 2.2 Reaksi reduksi xilosa menjadi xilitol
- Gambar 2.3 Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa
- Gambar 2.4 Struktur xilosa
- Gambar 2.5 Contoh senyawa lignin
- Gambar 2.6 Struktur selulosa sebagai polimer β -D Glukosa
- Gambar 2.7 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman
- Gambar 2.8 Struktur dasar glukuronoxilan
- Gambar 2.9 Struktur dasar glukomanan
- Gambar 2.10 Struktur dasar galaktoglukomanan
- Gambar 2.11 Struktur dasar arabinoglukuronoxilan
- Gambar 2.12 Struktur dasar arabinogalaktan
- Gambar 2.13 Tanaman jati
- Gambar 2.14 Tanaman melinjo
- Gambar 2.15 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida
- Gambar 4.1 Ekstraksi sampel serbuk kayu dengan sokhlet
- Gambar 4.2 Serbuk kayu jati dalam larutan NaOH 1%
- Gambar 4.3 Serbuk kayu melinjo dalam larutan NaOH 1%
- Gambar 4.4 Reaksi β -D-xilopiranososa menjadi furfural
- Gambar 4.5 Reaksi β -D-glukopiranososa menjadi HMF
- Gambar 4.6 Kurva perbandingan kadar xilosa dalam hidrolisat
- Gambar 4.7 Kurva perbandingan hidrolisat untuk kedua jenis sampel serbuk kayu
- Gambar 4.8 Kromatogram hidrolisat sampel serbuk kayu jati
- Gambar 4.9 Kromatogram hidrolisat serbuk kayu melinjo
- Gambar 4.10 Kromatogram perbandingan standar karbohidrat
- Gambar 4.11 Kromatogram standar xilitol 100 ppm
- Gambar 4.12 Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni

- Gambar 4.13 Kurva hasil fermentasi untuk kontrol xilosa murni
- Gambar 4.14 Kromatogram hasil fermentasi substrat jati didelignifikasi dan didetoksifikasi
- Gambar 4.15 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu jati
- Gambar 4.16 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu melinjo
- Gambar 4.17 Kurva % konversi xilosa menjadi xilitol untuk sampel serbuk kayu jati
- Gambar 4.18 Kurva % konversi xilosa menjadi xilitol untuk sampel serbuk kayu melinjo
- Gambar 4.19 Kromatogram hidrolisat substrat jati kontrol tanpa penambahan khamir pada waktu fermentasi 48 jam
- Gambar 4.20 Kurva kadar etanol dalam substrat jati control
- Gambar 4.21 Hasil TPC pada pengenceran 10^{-5}

DAFTAR TABEL

- Tabel 2.1 Perbandingan tingkat kemanisan dan nilai kalori antara xilitol dan pemanis lain
- Tabel 4.1 Konsentrasi xilosa yang dihasilkan pada berbagai variasi kondisi hidrolisis
- Tabel 4.2 Kadar xilosa dalam hidrolisat
- Tabel 4.3 Data perbandingan kadar xilosa dalam hidrolisat
- Tabel 4.4 Hasil fermentasi kontrol xilosa murni



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Diagram Kerja Secara Umum
- Lampiran 2 Kromatogram dan kurva standar xilosa
- Lampiran 3 Kromatogram dan kurva standar xilitol
- Lampiran 4 Kromatogram standar glukosa dan arabinosa
- Lampiran 5 Kromatogram hidrolisat sampel serbuk kayu pada kondisi hidrolisis optimum (121 °C,60')
- Lampiran 6 Data hasil perhitungan kadar xilosa pada hidrolisat
- Lampiran 7 Kromatogram dan tabel data hasil fermentasi kontrol xilosa
- Lampiran 8 Kromatogram hasil fermentasi substrat pada waktu optimum (36 jam)
- Lampiran 9 Data Perhitungan Hasil Fermentasi Substrat
- Lampiran 10 Contoh Cara Perhitungan
- Lampiran 11 Kurva Standar Etanol dan Data Kadar Etanol dalam Substrat Jati Kontrol

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki lahan hutan yang luas. Hutan di Indonesia ditumbuhi oleh berbagai macam jenis pohon. Kurang lebih 4000 jenis pohon tumbuh pada berbagai formasi dan tipe hutan dan sekitar 400 jenis pohon telah diketahui nilai komersial kayunya.¹ Kayu merupakan hasil hutan yang mudah diproses untuk dijadikan barang sesuai dengan kemajuan teknologi. Dengan meningkatnya kebutuhan masyarakat akan barang-barang dan peralatan rumah tangga berbahan dasar kayu, maka produksi pengolahan kayu berkembang dengan pesat. Di Indonesia, ada 3 macam industri kayu yang secara dominan mengkonsumsi kayu dalam jumlah relatif besar yaitu: penggergajian, vinir/ kayu lapis, dan pulp/ kertas. Perkembangan dalam bidang pengolahan kayu di Indonesia, menimbulkan peningkatan limbah yang sebagian besar merupakan limbah lignoselulosa.

Limbah industri pengolahan kayu terdiri dari limbah yang dihasilkan industri kayu lapis, penggergajian dan pengerjaan kayu yang berupa potongan ujung, sebetan, sisa kupasan, dan serbuk gergajian.² Salah satu limbah dari industri penggergajian kayu yang jumlahnya cukup banyak dan belum termanfaatkan secara optimal adalah serbuk gergajian kayu. Besar

limbah serbuk gergaji yang berasal dari industri penggergajian adalah 15%, yang terdiri dari 2,5% serbuk dari unit utama, 13% serbuk dari unit kedua dan 0,1% serbuk dari unit ketiga.³

Untuk industri besar dan terpadu, limbah serbuk kayu gergajian sudah dimanfaatkan menjadi bentuk briket arang dan arang aktif yang dijual secara komersial. Namun untuk industri penggergajian kayu skala industri kecil yang jumlahnya mencapai ribuan unit dan tersebar di pedesaan, limbah ini belum dimanfaatkan secara optimal. Kebanyakan dari limbah tersebut hanya dibiarkan membusuk, ditumpuk, dibakar secara langsung, yang kesemuanya berdampak negatif terhadap lingkungan.² Oleh karena itu, perlu dilakukan penanganan limbah yang benar agar dikemudian hari tidak menjadi masalah yang serius bagi lingkungan.

Limbah yang dihasilkan dari industri penggergajian kayu merupakan limbah yang mengandung bahan lignoselulosa. Lignoselulosa terutama tersusun atas lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Kandungannya bervariasi tergantung pada jenis dan umur tanaman. Limbah lignoselulosa ini dapat dioptimalkan pemanfaatannya sehingga mempunyai nilai ekonomi yang lebih tinggi. Salah satunya adalah dengan menjadikannya sebagai bahan baku untuk produksi xilitol.

Serbuk gergajian kayu merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa seperti D-xilosa dan L-arabinosa.⁴

Apabila hemiselulosa dihidrolisis, maka akan diperoleh D–xilosa dengan jumlah tertentu tergantung pada jenis kayu yang digunakan.

Xilosa ($C_5H_{10}O_5$) merupakan monosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa berupa xilan. Xilosa dikenal sebagai gula kayu, karena banyak terdapat dalam kayu yang kaya akan hemiselulosa.⁴ Xilosa dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol.

Xilitol dapat diproduksi dari xilosa baik secara enzimatik maupun kimiawi.⁵ Xilitol merupakan gula alkohol non kariogenik dan merupakan pemanis rendah kalori. Xilitol di alam, dapat ditemukan dalam jumlah yang kecil pada sayur–sayuran dan buah–buahan. Xilitol memberikan sensasi dingin dan menyejukkan saat berada dimulut, sehingga xilitol sering digunakan pada permen karet, permen, dan pasta gigi.⁶

Dalam skala industri, xilitol diproduksi secara kimiawi melalui reaksi reduksi xilosa dengan gas hidrogen, dengan bantuan katalis Raney nikel pada suhu 80-140°C dan tekanan 50 atm. Proses kimia ini akan menghasilkan limbah nikel yang berbahaya bagi lingkungan dan *yield* xilitol yang didapat relatif rendah yaitu 50-60% dari total xilan yang terdapat pada hemiselulosa. Oleh karena itu, proses pembentukan xilitol secara bioteknologi menggunakan khamir dari genus *Candida*, telah dipelajari sebagai alternatif produksi xilitol dalam skala industri.⁷

Berbagai keunggulan dan manfaat yang dimiliki oleh xilitol, menyebabkan penelitian tentang xilitol semakin berkembang. Penelitian terhadap pembentukan xilitol secara bioteknologi dari bahan baku yang

tersedia di alam, yaitu limbah lignoselulosa, telah banyak dilakukan. Melimpahnya jumlah limbah serbuk gergajian kayu yang merupakan limbah lignoselulosa, diharapkan dapat dijadikan sebagai salah satu substrat potensial untuk produksi xilitol.

1.2 Perumusan Masalah

Dalam penelitian ini akan dilakukan hidrolisis dengan katalis asam terhadap serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo untuk menghasilkan xilosa sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Pada penelitian yang terdahulu,⁸ didapatkan kondisi hidrolisis yang optimum pada konsentrasi H_2SO_4 0,3 M, waktu hidrolisis 25 menit, serta suhu 121 °C. Pada penelitian ini dilakukan variasi terhadap kondisi hidrolisis yaitu terhadap waktu dan suhu hidrolisis pada konsentrasi asam yang sama karena adanya perbedaan komposisi kimia sampel yang digunakan.

Serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung cukup banyak lignin. Lignin merupakan komponen kimia kompleks yang terdapat pada kayu dan merupakan pembentuk dinding sel yang kokoh. Lignin berikatan kovalen dengan hemiselulosa dan berikatan silang (*cross linking*) dengan polisakarida lain di tumbuhan, sehingga meningkatkan kekuatan mekanis dari dinding sel dan tumbuhan secara keseluruhan.⁴ Kandungan lignin yang tinggi dapat menghalangi proses hidrolisis hemiselulosa sehingga xilosa yang dihasilkan

sedikit. Selain itu, produk degradasi lignin yang berupa senyawa fenolik, dapat mengganggu proses fermentasi xilitol oleh khamir. Pada penelitian ini, dilakukan proses delignifikasi terhadap sampel sebelum dihidrolisis, dengan menggunakan larutan basa NaOH, untuk mengurangi kadar lignin dalam sampel serbuk kayu. Kadar xilosa hasil hidrolisis dan xilitol hasil fermentasi pada sampel yang didelignifikasi, dibandingkan dengan kontrol.

Hidrolisat yang dihasilkan dari proses hidrolisis dengan asam, kemudian digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi oleh khamir. Hidrolisat tersebut selain mengandung xilosa, juga mengandung senyawa lain yang merupakan inhibitor bagi khamir. Proses detoksifikasi terhadap hidrolisat dilakukan untuk menghilangkan komponen inhibitor yang dapat menghambat proses fermentasi oleh khamir. Pada penelitian ini, dilakukan proses detoksifikasi terhadap hidrolisat sebelum proses fermentasi dengan menggunakan arang aktif. Kadar xilitol hasil fermentasi pada sampel yang didetoksifikasi dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian ini, khamir yang digunakan adalah *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247. Penggunaan spesies khamir tersebut didasarkan pada hasil penelitian sebelumnya. Pada penelitian tersebut didapatkan data bahwa *Candida fukuyamaensis* merupakan spesies khamir yang dapat menghasilkan xilitol dengan kadar yang paling tinggi dan lebih berpotensi dalam menghasilkan xilitol dibandingkan dengan spesies khamir dalam genus *Candida* yang lain.⁹ Mikroorganisme ini didapat dari

laboratorium mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Collection).

Metode fermentasi yang digunakan adalah metode *batch*.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memanfaatkan limbah serbuk gergajian kayu untuk memproduksi xilitol dengan cara menghidrolisis serbuk kayu secara kimiawi, yang kemudian difermentasikan oleh khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247.
2. Mengetahui pengaruh proses delignifikasi dan detoksifikasi pada sampel serbuk gergajian kayu terhadap produk xilitol hasil fermentasi yang diperoleh.

1.4 Hipotesis

1. Serbuk gergajian kayu merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa yang dapat dihidrolisis menjadi xilosa. Fermentasi xilosa hasil hidrolisis oleh khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 akan menghasilkan xilitol.
2. Proses delignifikasi dan detoksifikasi yang dilakukan terhadap sampel serbuk kayu akan menghasilkan xilitol yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel serbuk kayu yang tidak menjalani proses delignifikasi maupun detoksifikasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilitol

Xilitol, yang memiliki rumus molekul $C_5H_{12}O_5$, terdapat pada sayur-sayuran dan buah-buahan dalam jumlah yang kecil. Senyawa ini merupakan gula alkohol yang non kariogenik dan berpotensi sebagai pemanis rendah kalori. Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa tapi memiliki tingkat energi lebih rendah, yaitu 2,4 kal/g, dibandingkan pada sukrosa sebesar 4 kal/g.⁶

Tabel 2.1 Perbandingan tingkat kemanisan dan nilai kalori antara xilitol dan pemanis lain¹⁰

Nama gula	Nilai kalori (kal/g)	Sifat kariogenik	Tingkat kemanisan*
Sukrosa	4	Ya	1,0
Glukosa	4	Ya	0,7
Fruktosa	4	Ya	1,5
Laktosa	4	Ya	0,2
Xilitol	2,4	Tidak	1,0
Sorbitol	2,6	Tidak	0,6
Mannitol	1,6	Tidak	0,5
Maltitol	2,1	Tidak	0,9
Aspartam	0,0	Tidak	180
Sakarín	0,0	Tidak	300

* tingkat kemanisan dibandingkan terhadap nilai sukrosa (sukrosa memiliki tingkat kemanisan = 1)

Berdasarkan penelitian, mikroorganisme kariogenik lebih menyukai struktur gula enam karbon seperti D–glukosa untuk mendukung pertumbuhannya. Xilitol memiliki jumlah atom karbon lima sehingga bakteri kariogenik seperti *Streptococcus mutans* yang ada di dalam mulut tidak dapat menggunakan atau mendegradasinya sebagai sumber energi. Oleh karenanya, xilitol banyak digunakan untuk mencegah karies pada gigi.¹¹ Xilitol juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dalam nasofaring, sehingga dapat mengurangi resiko infeksi telinga tengah dan sinusitis. Xilitol memberikan sensasi dingin dan menyejukkan saat berada di dalam mulut sehingga xilitol sering digunakan pada permen karet, permen, dan pasta gigi.⁶

2.1.1 Sejarah Penemuan Xilitol

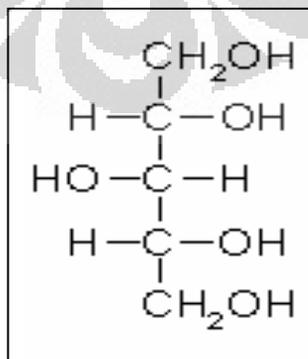
Xilitol ditemukan oleh kimiawan dari Jerman dan Prancis pada akhir abad ke 19 dan pertama kali diisolasi oleh ahli kimia Jerman Prof. Dr. Emil Herman Fischer (pemegang nobel kimia tahun 1902), dari serpihan kayu *birch* di Finlandia. Pada tahun 1930, kelangkaan pasokan gula mendorong para peneliti untuk mencari gula alternatif. Bersamaan dengan itu, peneliti menemukan bahwa metabolisme xilitol di dalam tubuh tidak membutuhkan insulin, sehingga di tahun 1960-an xilitol telah dikonsumsi sebagai pengganti gula bagi para penderita diabetes. Pada tahun 1963, xilitol telah mendapat persetujuan dari US Food and Drug Administration (FDA), bahwa xilitol tidak

mempunyai efek toksik.¹² Pada tahun 1990-an, produksi xilitol menjadi perhatian dan dilaporkan mencapai sekitar 5000 ton di seluruh dunia. Negara yang menghasilkan xilitol dalam skala besar adalah Jepang, China, dan Amerika. Salah satu produsen xilitol terbesar di Asia, hingga awal tahun 2008 telah memproduksi xilitol hingga 35.000 ton per tahun.¹³

2.1.2 Sifat Fisik dan Kimia Xylitol¹⁴

Sifat fisik dan kimia dari xilitol adalah sebagai berikut:

Rumus Molekul	: C ₅ H ₁₂ O ₅
Berat Molekul	: 152,15 g / mol
Wujud	: Kristal putih
Titik Leleh	: 92 – 96 °C
Titik Didih	: 126 °C
Jumlah Kalori	: 2,4 kal / g
Densitas	: 1,52 g / cm ³
Struktur xilitol	:



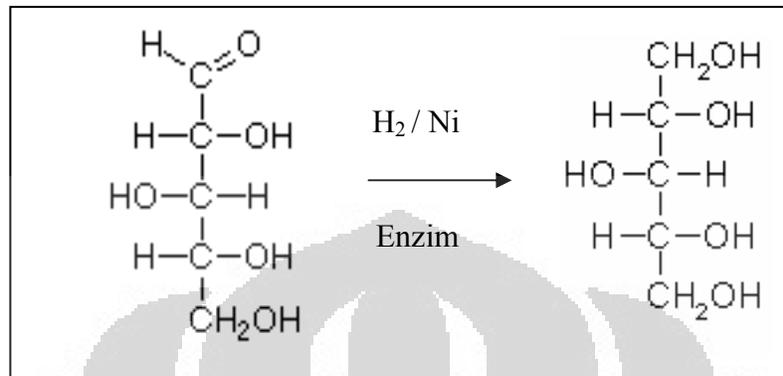
Gambar 2.1 Struktur xilitol

2.1.3 Proses Produksi Xilitol

Pembentukan xilitol dari xilosa secara umum dapat dilakukan dengan dua cara yakni secara kimiawi dan secara bioteknologi. Proses secara kimiawi dilakukan dengan mereduksi xilosa dengan gas hidrogen dan katalis Raney nikel pada suhu 80 °C – 140 °C dan tekanan yang tinggi. Proses kimia ini memiliki kelemahan yakni reaksinya berlangsung pada suhu dan tekanan tinggi, hanya didapat *yield* xilitol sekitar 50–60% total xilan yang terdapat pada hemiselulosa, dan dihasilkannya limbah nikel ke lingkungan sebagai hasil samping dari reaksi ini.⁷

Proses kedua yakni secara bioteknologi adalah dengan memanfaatkan mikroorganisme, yakni khamir, dalam mereduksi xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim *xylose reductase*. Proses secara bioteknologi ini memiliki beberapa keuntungan yakni reaksi reduksinya selektif terhadap xilosa apabila di dalam media terdapat sumber gula lain, reaksinya berlangsung pada suhu dan tekanan yang rendah, menggunakan katalis yang murah karena berasal dari sel khamir, dan *yield* yang didapat relatif tinggi (60-80%).¹⁵

Berikut merupakan reaksi reduksi secara umum pembentukan xilitol dari xilosa.



Gambar 2.2 Reaksi reduksi xilosa menjadi xilitol

2.1.4 Metabolisme pembentukan xilitol oleh khamir

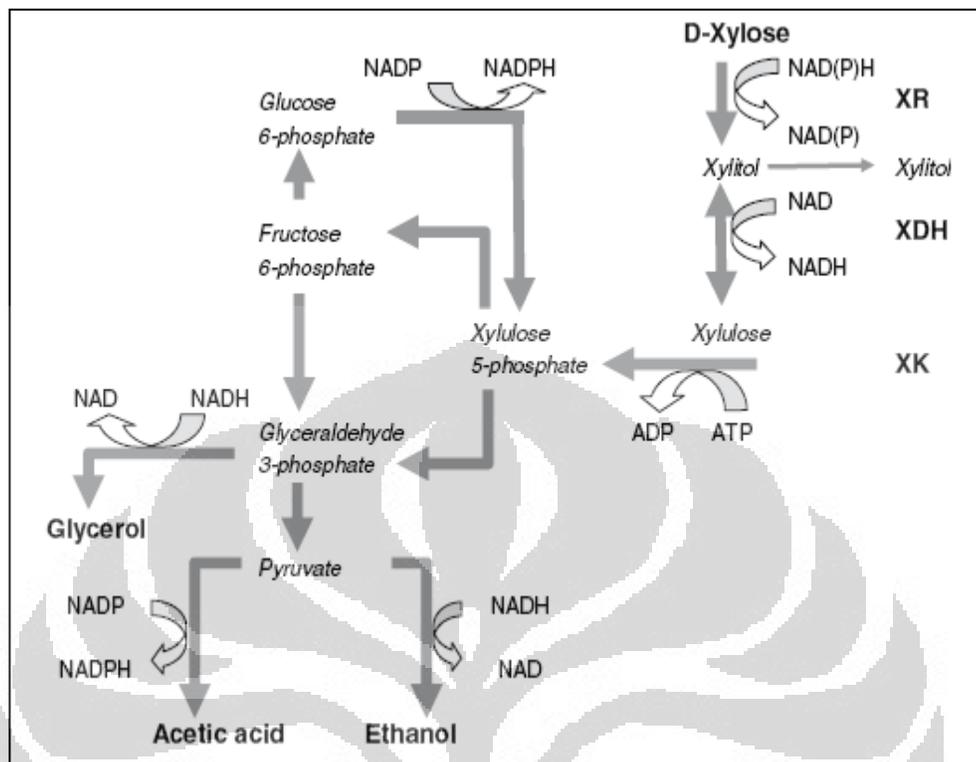
Pada umumnya, khamir yang menggunakan xilosa sebagai sumber karbon, menyerap xilosa melalui difusi terfasilitasi.^{15,16,17,18} Namun apabila pada medium terdapat sumber karbon berupa heksosa, maka heksosa akan dimanfaatkan terlebih dahulu sebagai sumber energi. Saat konsentrasi heksosa rendah, xilosa dimanfaatkan sebagai sumber energi.¹⁸

Jalur katabolisme D-xilosa melibatkan tiga buah enzim kunci yakni *xilose reductase* (XR), *xilitol dehidrogenase* (XDH), dan *xilulokinase* (XK). Pertama, D-xilosa direduksi menjadi xilitol oleh enzim XR. Xilitol yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi D-xilulosa oleh XDH. Akhirnya, D-xilulosa difosforilasi menjadi xilulosa-5-fosfat oleh XK yang kemudian masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP). Jalur ini menggunakan energi

berupa ATP. *Xilose reductase* memerlukan kofaktor baik NADH maupun NADPH, sedangkan *xilitol dehidrogenase* bergantung pada NAD^+ .^{6,19,20} Enzim *xilulokinase*, di lain pihak memerlukan ATP sebagai kofaktornya.⁶

Peran oksigen merupakan faktor yang penting untuk menghasilkan xilitol dari xilosa apabila menggunakan khamir dari golongan *Candida*. Pada kondisi oksigen terbatas, jalur oksidatif fosforilasi tidak dapat mengoksidasi kembali NADH yang terbentuk, sehingga konsentrasi NADH di dalam sel meningkat.⁶ Tingginya konsentrasi NADH dalam sel menaikkan aktivitas enzim *xilose reductase* dan menyebabkan akumulasi xilitol.

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktivitas enzim *xilose reductase* dan *xilitol dehidrogenase*. Substrat yang digunakan dalam industri berasal dari bahan baku yang dapat diperbaharui yaitu hidrolisat dari lignoselulosa yang mengandung berbagai jenis gula seperti glukosa, xilosa, mannosa, arabinosa, dan galaktosa. Pengaruh konsentrasi gula tersebut terhadap aktivitas enzim XR dan XDH perlu diperhatikan.



Gambar 2.3 Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa⁶

2.1.5 Perkembangan pembentukan xilitol secara bioteknologi

Pembentukan xilitol dengan menggunakan khamir, pertama kali diusulkan menggunakan glukosa sebagai bahan baku, karena glukosa harganya murah dan mudah didapat.⁷ Jalur metabolisme yang diusulkan adalah glukosa pertama kali diubah menjadi D-arabitol, kemudian membentuk D-xilulosa, dan selanjutnya D-xilulosa direduksi menjadi xilitol. *Yield* xilitol yang diperoleh rendah yakni sebesar 11,6% dari 77,5 g glukosa yang dikonsumsi. Dibandingkan dengan reaksi reduksi D-xilosa menjadi

xilitol yang hanya melalui satu tahap reaksi, pembentukan xilitol menggunakan glukosa menjadi kurang diminati.^{7,21}

Penelitian tentang pembentukan xilitol dilakukan dengan menggunakan D-xilosa dan hasil yang diperoleh adalah bahwa aktivitas enzim *xilose reductase* berperan dalam pembentukan xilitol.¹⁹ Seiring berjalannya waktu, penelitian pembentukan xilitol ini berkembang dari mencari jalur metabolisme pembentukan hingga bagaimana menaikkan *yield* dari xilitol yang didapat.²²

Pada tahun 1998, dilakukan penelitian untuk menaikkan *yield* xilitol dengan menambahkan glukosa sebagai kosubstrat. Diperoleh kenaikan *yield* xilitol dari 82% saat digunakan xilosa saja menjadi 93% saat menggunakan kedua gula dengan perbandingan glukosa:xilosa 15% untuk *Candida tropicalis*.²³ Penambahan glukosa dapat menaikkan *yield* xilitol namun hingga konsentrasi tertentu.²⁴ Penambahan glukosa di atas 10 g/L menunjukkan inhibisi terhadap aktivitas enzim *xilose reductase* sehingga xilitol yang dihasilkan berkurang. Inhibisi ini terjadi dengan dihasilkannya etanol sebagai metabolit samping.²¹

Penelitian kemudian berkembang kepada penggunaan bahan baku yang tersedia dari alam yakni tongkol jagung,²⁵ sekam padi,²⁶ ampas tebu,²⁷ dan batang gandum.²⁸ Kesemuanya menghasilkan *yield* yang berbeda-beda karena komposisi masing-masing hemiselulosa berbeda, namun secara keseluruhan memberikan *yield* yang berkisar antara 50-80%.

Penggunaan bahan baku yang berasal dari limbah lignoselulosa, menjumpai masalah dalam proses fermentasi xilosa menjadi xilitol yaitu adanya berbagai senyawa yang dapat menjadi inhibitor bagi mikroorganisme fermentor. Oleh karena itu, penelitian kemudian dilakukan untuk menghilangkan inhibitor-inhibitor tersebut dari hidrolisat melalui metode detoksifikasi. Penelitian dilakukan terhadap hidrolisat dari kayu ekaliptus yang difermentasi oleh khamir *Candida guilliermondii*. Metode detoksifikasi yang dilakukan adalah perlakuan dengan arang aktif dan perlakuan dengan empat resin yang berbeda (kation dan anion) dalam pemisahannya. Resin penukar ion lebih efisien daripada arang aktif untuk menghilangkan senyawa inhibitor tanpa adanya gula yang hilang.²⁹

Penelitian lain yang dilakukan untuk meningkatkan *yield* xilitol yang diproduksi dari bahan lignoselulosa adalah prosedur delignifikasi untuk mengurangi kadar lignin yang banyak terdapat pada bahan lignoselulosa. Penelitian ini dilakukan menggunakan substrat tongkol jagung, dengan menggunakan larutan alkali untuk memisahkan lignin yang terkandung dalam tongkol jagung. Alkali akan melarutkan dan memisahkan lignin serta gugus asetil dan mengekstrak senyawa-senyawa yang akan menghambat proses fermentasi dengan khamir sehingga *yield* xilitol yang didapat akan meningkat.³⁰

Akhir-akhir ini, penelitian diarahkan pada mutasi gen penyandi enzim kunci dalam fermentasi xilosa yakni *xilitol dehidrogenase* yang mengkatalisis oksidasi xilitol menjadi xilulosa pada *Candida tropicalis*. Adanya mutasi pada

gen penyandi *xilitol dehidrogenase* menyebabkan penggunaan xilosa sebagai sumber energi tidak dimungkinkan. Hal ini disebabkan karena tanpa adanya enzim *xilitol dehidrogenase*, xilosa yang telah direduksi menjadi xilitol, tidak dapat dioksidasi menjadi xilulosa, sehingga tidak dapat masuk ke dalam jalur glikolisis untuk pembentukan ATP sebagai sumber energi bagi sel. Jadi, xilosa hanya digunakan sebagai penghasil xilitol tanpa digunakan oleh sel sebagai sumber energi, sehingga perlu ditambahkan sumber karbon lain, seperti glukosa, sebagai sumber energi bagi sel. Diperoleh *yield* 98% dari 50 g/L xilosa dan 10 g/L glukosa sebagai kosubstrat.³¹

2.2 Xilosa

Xilosa merupakan gula pentosa yang dikenal sebagai gula kayu dan unit penyusun xilan, sebagai komponen utama dari hemiselulosa.⁴ Salah satu manfaat xilosa adalah sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Xilosa dapat diperoleh dari hidrolisis hemiselulosa dengan memanfaatkan limbah lignoselulosa.

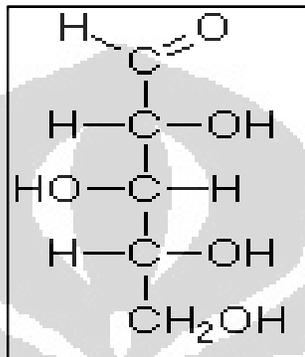
Sifat Fisik dan Kimia Xilosa³²

Sifat fisik dan kimia dari xilosa adalah sebagai berikut

Rumus molekul : $C_5H_{10}O_5$

Berat molekul : 150 g mol^{-1}

Wujud : Bubuk atau kristal putih
 Titik leleh : 146 °C
 Densitas : 1,52 g/cm³
 Struktur xilosa :



Gambar 2.4 Struktur xilosa

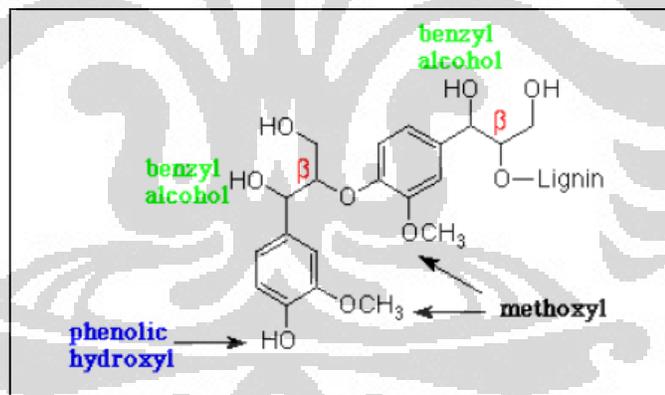
2.3 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan materi yang terdapat di dalam tanaman. Lignoselulosa tersusun atas tiga bagian utama, yakni lignin sekitar 15-25%, hemiselulosa sekitar 21-42%, dan selulosa sekitar 38-50%.

Lignin merupakan komponen kimia yang kompleks yang kebanyakan berada pada kayu. Lignin merupakan polimer dari unit-unit fenilpropana yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Lignin menempati tempat di dinding sel antara komponen selulosa, hemiselulosa, dan pektin, terutama di trakeid, sklereid, dan xylem. Lignin ini berikatan kovalen dengan hemiselulosa dan berikatan silang (*crosslinking*)

dengan polisakarida yang lain di tumbuhan, sehingga meningkatkan kekuatan mekanis dari dinding sel dan tumbuhan secara keseluruhan. Lignin merupakan makromolekul yang besar dengan berat molekul lebih dari 10 ribu unit. Lignin merupakan senyawa yang hidrofobik dan aromatik.

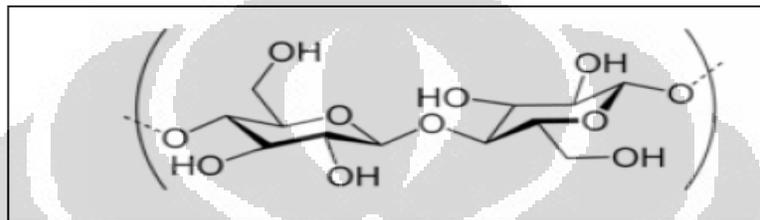
Struktur polimer lignin secara umum belum bisa digambarkan, akan tetapi ada 3 jenis monomer lignin (monolignol) yang umumnya menyusun lignin, yaitu *p-coumaryl alcohol*, *coniferyl alcohol*, dan *sinapyl alcohol*. *p-coumaryl alcohol* merupakan komponen lignin yang ada pada rumput, *coniferyl alcohol* merupakan monomer lignin yang banyak ditemukan di kayu lunak (softwood), sedangkan lignin pada kayu keras (*hardwood*) disusun oleh *coniferyl* dan *sinapyl alcohol*.⁴



Gambar 2.5 Contoh senyawa lignin

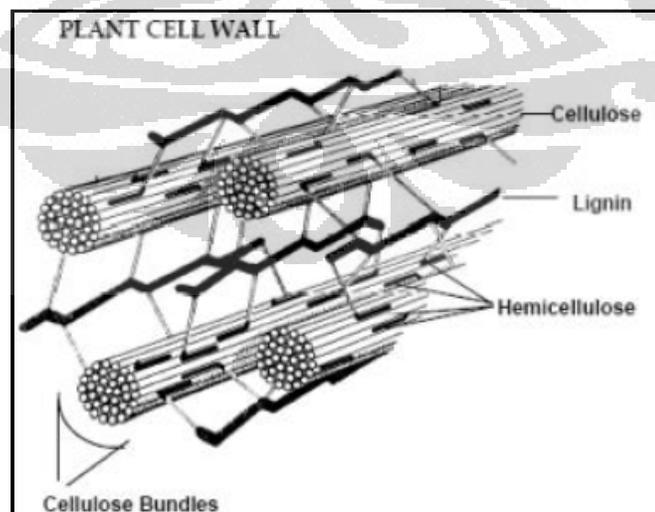
Selulosa merupakan senyawa polimer dari 100–1500 unit glukosa dengan ikatan β (1→4) linier dan merupakan komponen utama semua dinding sel tumbuhan. Bentuk ikatan dari selulosa ini berbeda dengan ikatan glikosidik α (1→4) yang terbentuk di tepung dan karbohidrat lainnya.

Selulosa merupakan polimer dengan rantai yang lurus, berbeda dengan tepung, tidak terbentuk *coil*. Gugus hidroksil di glukosa, yang ada pada selulosa, berikatan hidrogen satu dengan yang lainnya, yang berkontribusi terhadap kekuatan selulosa. Berbeda dengan tepung, selulosa lebih bersifat kristalin.⁴



Gambar 2.6 Struktur selulosa sebagai polimer β -D glukosa

Hemiselulosa ditemukan bersama dengan selulosa di dalam dinding sel tanaman. Berbeda dengan selulosa yang merupakan homopolisakarida, hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa seperti D-xilosa dan L-arabinosa.⁴



Gambar 2.7 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman³³

2.4 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan komponen kedua terbesar, yang keberadaannya bersama-sama dengan selulosa, berfungsi sebagai bahan pendukung dinding sel tanaman. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang bercabang, terdiri atas beberapa monomer gula yang berbeda, seperti xilosa, arabinosa, dan mannososa.

Rantai polimer hemiselulosa memiliki cabang yang pendek dan amorf.³⁴ Mayoritas hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi hanya sampai 200.⁴ Hemiselulosa mengikat fibril-fibril selulosa untuk membentuk mikrofibril, yang dapat meningkatkan stabilitas dinding sel.³³

2.4.1 Hemiselulosa Kayu Keras

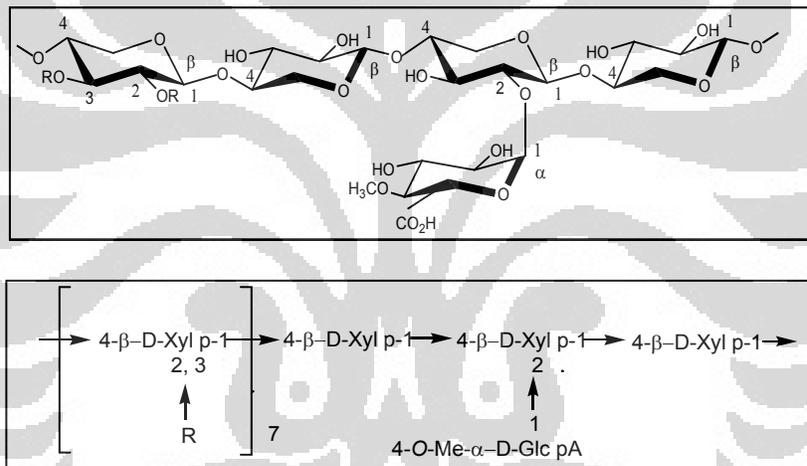
Hemiselulosa mengandung komposisi dan struktur penyusun yang berbeda-beda tergantung dari jenis kayunya. Pada kayu keras, komponen utama penyusun hemiselulosa terdiri dari xilan dan manan. Di samping xilan dan manan, terdapat polisakarida lain dalam jumlah yang sedikit.

2.4.1.1 Glukuronoxilan⁴

Komponen utama adalah O-asetil-4-O-metilglukurono- β -D xilan, kadang-kadang disebut glukuronoxilan, yang disebut secara sederhana

sebagai xilan. Kandungan xilan bervariasi yaitu sekitar 15-30% dari kayu kering.

Rantai utama xilan terdiri atas kerangka yang mengandung unit-unit β -D-xilopiranososa, terikat dengan ikatan (1 \rightarrow 4). Unit-unit xilosa mengandung gugus O-asetil pada C-2 atau C-3 (tujuh asetil setiap sepuluh unit xilosa). Unit-unit xilosa dalam rantai xilan juga mengandung sisa-sisa asam 4-O-metil- α -D-glukuronat yang terikat (1 \rightarrow 2), rata-rata satu asam uronat setiap sepuluh unit xilosa.



Gambar 2.8 Struktur dasar glukuronoxilan⁴

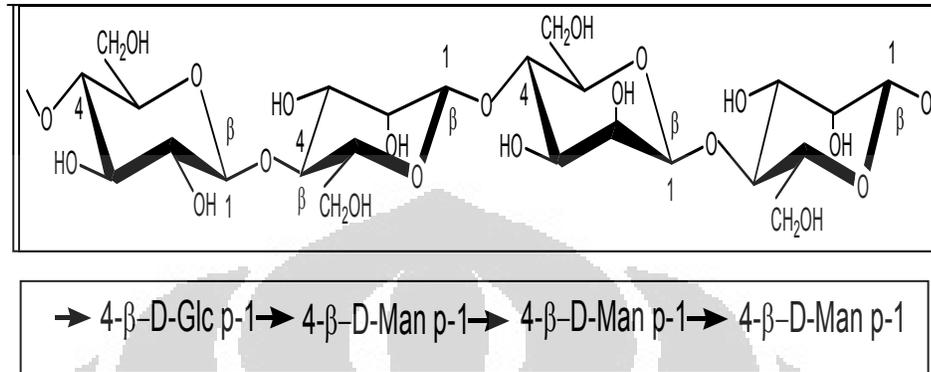
Unit-unit gula: β -D-xilopiranososa (Xyl p); asam 4-O-metil- α -D glukopiranosiluronat (Glc pA).

R = gugus asetil (CH_3CO)

2.4.1.2 Glukomanan⁴

Di samping xilan, kayu keras mengandung glukomanan 2-5%, yang tersusun atas unit-unit β -glukopiranososa β -D-manopiranososa yang terikat

dengan ikatan (1→4). Perbandingan glukosa : manosa bervariasi antara 1:2 dan 1:1, tergantung pada spesies kayu.



Gambar 2.9 Struktur dasar glukomanan⁴

Unit-unit gula: β-D-glukopiranososa (Glc p); β-D mannopiranososa (Man p)

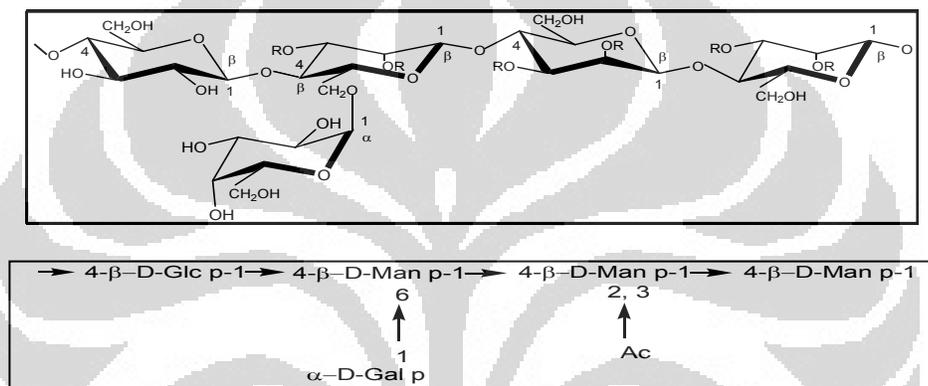
2.4.2 Hemiselulosa Kayu Lunak

Komposisi dan struktur hemiselulosa dalam kayu lunak secara khas berbeda dengan yang ada dalam kayu keras. Komponen utama hemiselulosa yang terdapat dalam kayu lunak terdiri dari galaktoglukomanan, arabinoglukuronoxilan, dan arabinogalaktan. Selain komponen utama tersebut, terdapat polisakarida lain dalam jumlah sedikit.

2.4.2.1 Galaktoglukomanan⁴

Galaktoglukomanan merupakan hemiselulosa pokok dalam kayu lunak (sekitar 20%). Rantai utamanya merupakan rantai lurus atau sedikit

bercabang yang terbentuk dari ikatan (1→4) unit-unit β-D-glukopiranososa dan unit-unit β-D-manopiranososa. α-D-galaktopiranososa terikat pada kerangka sebagai rantai sisi unit tunggal oleh ikatan-ikatan (1→6). Gugus-gugus hidroksil pada kedudukan C-2 dan C-3 dalam unit-unit rantai sebagian tersubstitusi oleh gugus-gugus O-asetil, rata-rata satu gugus setiap 3-4 unit heksosa.



Gambar 2.10 Struktur dasar galaktoglukomannan⁴

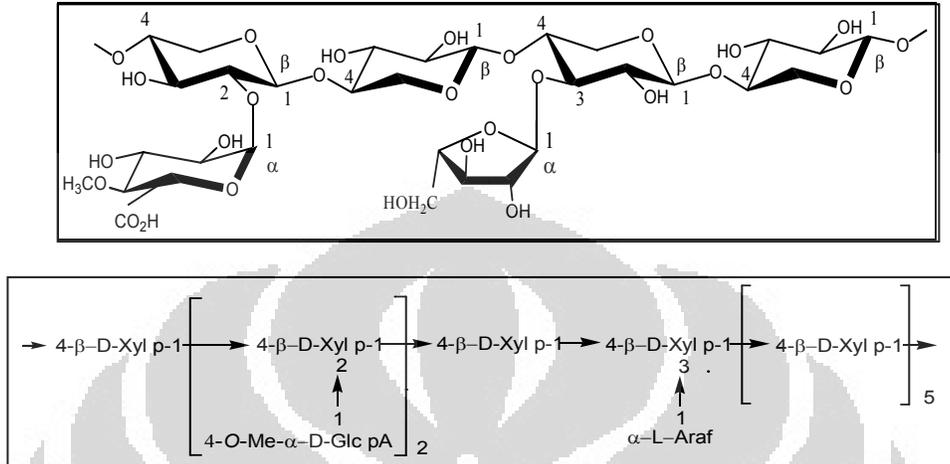
Unit-unit gula: β-D-glukopiranososa (Glc p);

β-D-mannopiranososa (Man p); β-D-galaktopiranososa (Gal p), R= CH₃CO atau H

2.4.2.2 Arabinoglukuronoxilan⁴

Selain galaktoglukomannan, kayu lunak mengandung arabinoglukuronoxilan (5-10%). Rantai utamanya mengandung unit-unit ikatan (1→4) β-D-xilopiranososa yang sebagian tersubstitusi pada C-2 oleh gugus-gugus asam 4-O-metil-α-D-glukuronat, rata-rata dua sisi setiap

sepuluh unit xilosa. Rantai utamanya juga mengandung unit-unit α -L-arabinofuranosa.

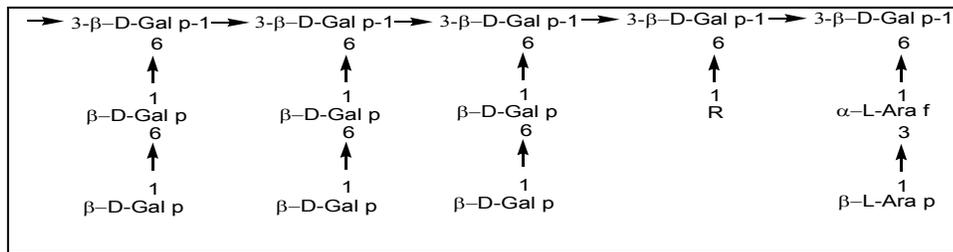


Gambar 2.11 Struktur dasar arabinoglucuronoxilan⁴

Unit-unit gula: β -D-xilopiranososa (Xyl p); asam 4-O-metil- α -D glukopiranosiluronat (Glc pA); α -L-arabinofuranosa (Araf)

2.4.2.3 Arabinogalaktan⁴

Kerangka utamanya disusun oleh unit-unit β -D-galaktopiranososa yang terikat (1 \rightarrow 3). Hampir setiap unit mengandung cabang yang terikat pada C-6, sebagian besar merupakan β -D-galaktopiranososa yang terikat (1 \rightarrow 6), dan juga L-arabinosa. Terdapat juga sedikit sisa-sisa asam glukuronat dalam molekul.



Gambar 2.12 Struktur dasar arabinogalaktan ⁴

Unit-unit gula: β-D-galaktopiranososa (Gal p),
β-L-arabinopiranososa (Ara p), α-L-arabinofuranosa
(Ara f), dan R = β-D-galaktopiranososa,
α-L-arabinofuranosa, atau β-D glukopiranosiluronat

2.5 Jati (*Tectona grandis* Linn.f)

Jati (*Tectona grandis* L.f.) terkenal sebagai kayu komersil bermutu tinggi, termasuk dalam famili Verbenaceae. Pohon Jati cocok tumbuh di daerah musim kering agak panjang yaitu berkisar 3-6 bulan pertahun. Besarnya curah hujan yang dibutuhkan rata-rata 1250-1300 mm/tahun dengan temperatur rata-rata tahunan 22-26 °C.³⁵

Kayu jati termasuk kelas kuat I dan kelas awet II. Penyebab keawetan dalam kayu teras Jati adalah tectoquinon (2-methylantraquinone). Kayu jati mengandung 47,5% selulosa, 30% lignin, 14,5% pentosan, 1,4 % abu dan 0,4-1,5% silika.³⁵

2.5.1 Taksonomi Jati

Taksonomi dari tumbuhan jati adalah sebagai berikut.³⁶

Kerajaan : Plantae
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Asteridae
Ordo : Lamiales
Famili : Verbenaceae
Genus : *Tectona*
Species : *Tectona grandis*



Gambar 2.13 Tanaman jati

2.5.2 Pemanfaatan Kayu Jati^{35,37,38}

Kayu jati banyak digunakan untuk berbagai keperluan, antara lain:

- sebagai tanaman sela pada sistem agroforestry
- bahan bangunan rumah
- kayu pertukangan
- ukiran
- berbagai konstruksi ringan dan berat, seperti: bantalan rel kereta api, tiang jembatan, balok dan gelagar rumah, kusen pintu dan jendela, papan kapal
- sebagai vinir muka pada industri kayu lapis

2.6 Melinjo (*Gnetum Gnemon*)

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) adalah suatu spesies tanaman berbiji terbuka (*Gymnospermae*) berbentuk pohon yang berasal dari Asia tropik dan Pasifik Barat. Berbeda dengan anggota *Gnetum* lainnya yang biasanya merupakan liana, melinjo berbentuk pohon.

Melinjo merupakan tumbuhan tahunan berbentuk pohon yang berumah dua (*dioecious*, ada individu jantan dan betina). Batangnya kokoh dan bisa dimanfaatkan sebagai bahan bangunan.³⁹

2.6.1 Taksonomi Melinjo

Taksonomi dari tumbuhan melinjo adalah sebagai berikut:³⁹

Kerajaan : Plantae
Divisi : Gnetophyta
Kelas : Gnetopsida
Ordo : Gnetales
Famili : Gnetaceae
Genus : *Gnetum*
Spesies : *Gnetum gnemon*



Gambar 2.14 Tanaman melinjo

2.6.2 Pemanfaatan Melinjo

Melinjo jarang dibudidayakan secara intensif. Kayunya dapat dipakai sebagai bahan papan. Selain itu, kayu melinjo juga sering digunakan sebagai bahan untuk membuat berbagai peralatan rumah tangga, misalnya

untuk membuat parut dan peralatan dapur lainnya. Daun mudanya digunakan sebagai bahan sayuran (misalnya pada sayur asem). "Bunga" (jantan maupun betina) dan bijinya yang masih kecil-kecil (*pentil*) maupun yang sudah masak dijadikan juga sebagai sayuran. Biji melinjo juga menjadi bahan baku emping.

2.7 Hidrolisis Lignoselulosa

Hidrolisis adalah peristiwa pemecahan molekul besar menjadi bagian-bagian yang lebih kecil yang merupakan komponen monomer dari senyawa itu sendiri, melalui adisi oleh air.⁴⁰ Reaksi hidrolisis dapat dipercepat dengan menggunakan enzim atau asam sebagai katalis.

Hidrolisis lignoselulosa dapat dilakukan secara enzimatik maupun kimiawi. Hidrolisis dengan enzim menghasilkan produk hidrolisis yang lebih spesifik. Akan tetapi monomer gula yang dihasilkan dengan cara ini sedikit, karena enzim sulit menembus bagian lignin yang merupakan pembentuk dinding sel yang kokoh. Hidrolisis secara kimiawi dengan asam, selain menghidrolisis hemiselulosa, dapat pula menghidrolisis selulosa. Akibatnya akan dihasilkan produk hidrolisis yang berupa campuran. Selain itu, hidrolisis dengan asam dapat pula mengakibatkan monosakarida yang dihasilkan terdegradasi menjadi senyawa bentuk lain.⁴¹

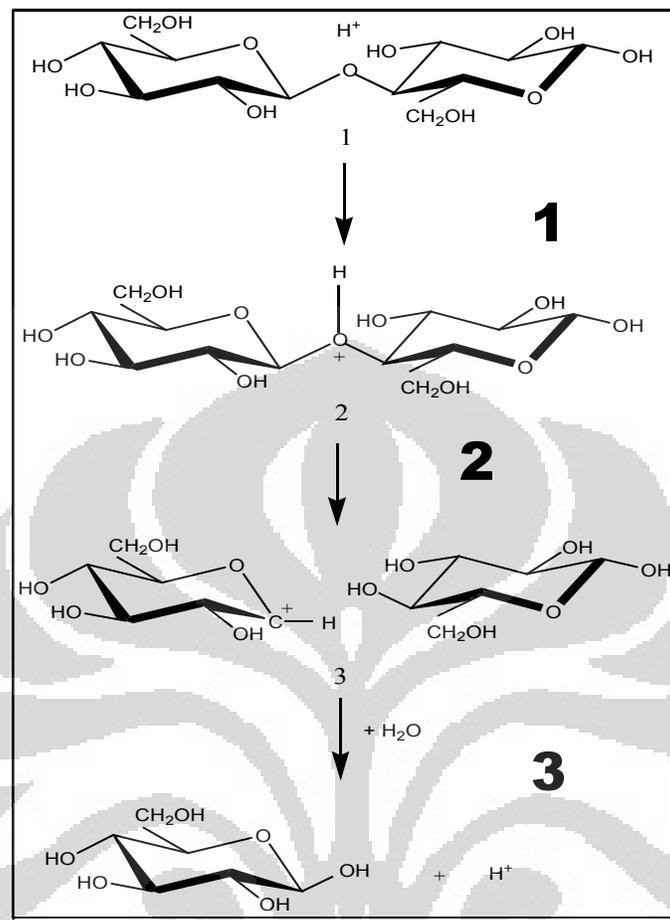
H_2SO_4 , HCl , HF , atau CH_3COOH adalah asam yang biasa digunakan sebagai katalis dalam proses hidrolisis. Asam-asam tersebut melepaskan

proton yang memecahkan ikatan eter heterosiklik antara monomer gula dalam rantai polimer yang dibentuk oleh hemiselulosa dan selulosa. Pemecahan ikatan ini menghasilkan berbagai senyawa, terutama gula seperti xilosa, glukosa, dan arabinosa. Senyawa lain yang dihasilkan adalah oligomer, furfural, dan asam asetat.⁹

Hemiselulosa yang merupakan polimer bercabang, tidak membentuk mikrofibril yang kristalin dan rigid seperti selulosa, sehingga relatif lebih mudah dihidrolisis.⁵ Hemiselulosa relatif lebih mudah dihidrolisis oleh asam melalui pemutusan ikatan-ikatan glikosida menjadi komponen-komponen monomernya.

Hidrolisis selulosa pada hakikatnya adalah pemutusan ikatan β (1 \rightarrow 4) glikosida antara satuan-satuan glukosa dalam molekul glukosa. Selulosa lebih sulit dihidrolisis daripada hemiselulosa karena memiliki derajat kristalinitas yang tinggi.⁵

Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida yang terdiri atas tiga tahap (Gambar 2.15). Pada tahap pertama, proton sebagai katalis asam, berinteraksi dengan oksigen pada ikatan eter heterosiklik antara monomer-monomer gula dan membentuk asam konjugat (1). Langkah ini diikuti oleh pemecahan secara lambat ikatan C-O-C menghasilkan intermediet kation karbonium siklik (2). Setelah mengalami adisi yang cepat, maka terbentuklah gula bebas(3).



Gambar 2.15 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida⁴²

2.8 Fermentasi⁴³

Fermentasi berasal dari kata *ferment* yang berarti mendidih. Pada awalnya fermentasi didefinisikan sebagai anggur yang mendidih, kemudian pengertiannya berkembang secara luas menjadi penggunaan mikroorganisme untuk bahan pangan. Oleh Louis Pasteur, fermentasi didefinisikan sebagai proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO_2) oleh khamir yang terdapat pada cairan

ekstrak buah anggur tersebut. Dari definisi ini, arti fermentasi kemudian berkembang menjadi suatu kultur mikroorganisme dalam proses optimum untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim, atau produk lain. Proses fermentasi secara umum digolongkan menjadi fermentasi cair dan fermentasi padat.

2.8.1 Fermentasi Cair

A. *Submerged fermentation* (fermentasi bawah permukaan), dapat dibagi menjadi 3 macam:

- *Batch process*, yaitu fermentasi dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi.
- *Fed-batch* (gabungan sistem *batch* dengan kontinyu), yaitu fermentasi dengan cara memasukkan sebagian sumber nutrisi ke dalam bioreaktor dengan volume tertentu hingga diperoleh produk yang mendekati maksimal, tetapi konsentrasi sumber nutrisi dibuat konstan.
- *Continuous process* (proses sinambung/ kontinyu), yaitu fermentasi yang dilakukan dengan cara pengaliran substrat dan pengambilan produk dilakukan secara terus-menerus (sinambung) setiap saat

setelah diperoleh konsentrasi produk maksimal atau substrat pembatasnya mencapai konsentrasi yang hampir tetap.

B. *Surface fermentation* (fermentasi permukaan), misal pada pembuatan *nata de coco*.

2.8.2 Fermentasi Padat

Pada fermentasi ini, medium yang digunakan memiliki kadar air rendah (padat), seperti pada pembuatan tape dan oncom.

2.9 Khamir

Khamir merupakan bentuk pertumbuhan dari mikroorganisme eukariotik yang berada dalam kingdom fungi. Khamir merupakan golongan fungi yang merupakan fakultatif anaerob atau dapat hidup dalam kondisi anaerob. Khamir ini bersel satu, kebanyakan berbentuk oval dan bereproduksi secara aseksual dengan cara *budding* atau pertunasan walau ada sebagian dengan cara pembelahan biner. Dalam *budding*, bentuk gelembung terbentuk pada permukaan sel, tumbuh, memuat keluar dan kemudian memisahkan diri. Kadang gelembung ini tetap berada pada sel induk membentuk rantai sel yang disebut pseudohifa.^{44,45}

Candida fukuyamaensis

Genus *Candida* sering kali digunakan untuk memfermentasikan xilosa menjadi xilitol. *Candida fukuyamaensis* merupakan salah satu spesies khamir dari genus *Candida* yang menghasilkan xilitol dengan kadar paling tinggi.^{9,46}

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA. Koloninya berwarna putih agak krem; permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap seperti mentega; profil dan tepi koloni menggunung, lurus. Diketahui mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa, galaktosa dan sukrosa. Mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, D-xilosa, dan L-arabinosa. Khamir ini mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37 °C.⁴⁶

Klasifikasi dari *Candida fukuyamaensis*:⁴⁷

Kerajaan : Fungi
Divisi : Ascomycota
Sub divisi : Saccharomycotina
Kelas : Saccharomycetes
Ordo : Saccharomycetales
Famili : Saccharomycetaceae
Genus : *Candida*
Spesies : *Candida fukuyamaensis*

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: labu erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, pipet volumetrik, pipet tetes, *beaker glass*, batang pengaduk, corong gelas, tabung *centrifuge*, cawan petri, jarum ose, botol semprot, pipet tetes, pipet mikro, propipet (bulb), dan tabung reaksi. Instrumentasi yang digunakan yaitu: *blender*, autoklaf, alat *sentrifuge*, timbangan analitis, alat *degassing*, *heating mantel*, penangas air, *shaker incubator*, *syringe*, HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C dengan detektor Refraktif Indeks (RID-10A), pompa LC-20AB, dan pH meter.

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : glukosa, xilosa, arabinosa, xilitol, aquades, aquabides, HCl, H₂SO₄, NaOH, KMNO₄ (kalium permanganat), MgSO₄ (magnesium sulfat), (NH₄)₂SO₄ (ammonium

sulfat), KH_2PO_4 (kalium dihidrogen fosfat), arang aktif, resin penukar kation dan anion, kertas lakmus, kertas pH indikator universal, kertas saring biasa, filter membran nitroselulosa nitrat 0,2 μm , ekstrak malt, dan ekstrak khamir.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Persiapan Sampel Serbuk Gergajian Kayu

Serbuk gergajian kayu yang masih kasar dihaluskan agar didapatkan bentuk yang lebih halus dengan menggunakan *blender*. Setelah itu, sampel serbuk kayu dihomogenisasikan dengan cara disaring dengan menggunakan penyaring ayakan. Serbuk kayu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C selama 6 jam. Sampel serbuk halus kayu ini selanjutnya digunakan untuk proses berikutnya.

3.2.2 Delignifikasi Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Alkali

Serbuk halus gergajian kayu (35 g) dihilangkan kandungan ekstraktifnya dengan pelarut benzena-etanol (2:1,v/v), dengan menggunakan sokslet selama 8 jam kemudian dikeringkan. Setelah itu, serbuk kayu dituangkan ke dalam larutan NaOH 1% dengan perbandingan antara serbuk dan larutan adalah 1:25 pada suhu 55 °C selama 2 jam, disaring, kemudian dikeringkan.

3.2.3 Hidrolisis Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Asam

Serbuk halus kayu jati (1 g) dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan 30 mL H₂SO₄ 0,3 M. Selanjutnya sampel ditutup dengan aluminium foil, lalu dimasukkan ke dalam autoklaf untuk dihidrolisis. Variasi kondisi hidrolisis dilakukan pada suhu 121 °C dan 126 °C, dan waktu hidrolisis 20, 25, 45, dan 60 menit. Setelah itu hidrolisat dinetralkan dengan NaOH 0,5 M dan disaring menggunakan kertas saring biasa.

3.2.4 Detoksifikasi Hidrolisat sebelum Fermentasi

Hidrolisat (50 mL) ditambahkan 1% arang aktif (w/v) kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 30 menit. Setelah 30 menit, hidrolisat kemudian disaring, dan filtratnya siap digunakan untuk fermentasi.

3.2.5 Penyiapan Inokulum

Sel mikroorganisme yang berupa khamir dari genus *Candida*, didapat dari laboratorium mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Collection). Khamir yang digunakan adalah *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247. Medium agar yang digunakan untuk pertumbuhan adalah medium YMA dengan komposisi glukosa 10 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L, pepton 5 g/L dan agar 15 g/L.

Kultur yang didapat dimurnikan dengan metode cawan gores dan diinkubasi selama 2 hari. Setelah hari kedua, biakan dalam petri dilakukan pengamatan. Secara aseptis, biakan yang dianggap berasal dari sel tunggal diambil dan dipindahkan kedalam agar miring yang telah disiapkan. Biakan dalam agar miring tadi diinkubasi selama 2 hari untuk dilakukan fermentasi. Sebelum fermentasi, dilakukan pembuatan suspensi sel dengan menambahkan 10 mL air steril ke dalam agar miring berisi biakan sel, kemudian digores dengan jarum ose.

3.2.6 Fermentasi

Hidrolisat (50 mL) yang akan digunakan sebagai medium fermentasi ditambahkan dengan mineral-mineral $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 g), KH_2PO_4 (0,25 g), dan MgSO_4 (0,02 g), serta ekstrak khamir (0,1 g). Kemudian dilakukan penyesuaian pH hingga didapat pH 6, yang merupakan pH optimum untuk pertumbuhan khamir. Setelah itu medium disterilisasi. Sebanyak 2 mL suspensi khamir dimasukkan ke dalam medium. Setelah itu, dilakukan inkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 2 hari pada suhu 30 °C, 110 rpm.

3.2.7 Penentuan Jumlah Sel Khamir

Jumlah sel khamir selama proses fermentasi didapatkan dari perhitungan TPC (*Total Plate Count*). Hal ini dilakukan dengan cara mengambil suspensi khamir dengan volume yang diketahui pengencerannya dan dibiakkan dalam cawan petri selama 2 hari.

3.2.8 Variasi Kondisi

Variasi kondisi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

- Variasi kondisi hidrolisis
- Variasi substrat yang difermentasi
- Variasi waktu pada saat fermentasi

3.2.9 Larutan Standar

Larutan standar digunakan sebagai acuan untuk uji kualitatif dan kuantitatif komposisi kimia sampel. Larutan standar yang dipakai pada percobaan ini adalah larutan standar xilosa, larutan standar xilitol, larutan standar glukosa, dan larutan standar arabinosa. Larutan-larutan standar ini dibuat pada berbagai macam konsentrasi. Deret larutan standar ini dianalisis menggunakan HPLC dengan kondisi kecepatan alir 1 mL/menit, suhu kolom

80 °C, dan fase gerak yang digunakan adalah aquabides. Nilai waktu retensi yang diperoleh, digunakan untuk uji kualitatif, sedangkan nilai luas area, untuk uji kuantitatif. Dari nilai luas area dan konsentrasi masing-masing larutan standar, dibuat persamaan regresi linier.

3.2.9.1 Larutan Standar Xilosa

Larutan induk xilosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg xilosa, dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat deret larutan standar xilosa berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 50, 100, 250, dan 500 ppm.

3.2.9.2 Larutan Standar Xilitol

Larutan induk xilitol 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg xilitol, dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar xilitol berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 25, 50, 100, dan 500 ppm.

3.2.9.3 Larutan Standar Glukosa

Larutan induk glukosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg glukosa, dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar glukosa berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 25, 50, dan 100 ppm.

3.2.9.4 Larutan Standar Arabinosa

Larutan induk arabinosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg arabinosa, dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar arabinosa berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 25, 50, dan 100 ppm.

3.2.10 Analisis Kimia Sampel

Untuk pengujian kadar xilosa dalam sampel maupun produk hasil fermentasi diukur dengan alat HPLC Shimadzu Prominence-20 dengan kolom karbohidrat dengan detektor Refraktif Indeks (RID-10A). Fasa gerak yang digunakan adalah fasa gerak air akuabides dengan laju alir 1 mL/menit dengan suhu kolom 80 °C. Fasa diam yang terdapat pada kolom karbohidrat

ini adalah ion kalsium (Ca^{2+}), yang diikatkan pada zat padat pendukung yaitu kopolimer stiren-divinilbenzena.

Sebelum dilakukan pengukuran terhadap kadar xilosa dalam hidrolisat maupun produk hasil fermentasi, dilakukan persiapan sampel terlebih dahulu. Pada pengujian kadar hidrolisat dalam sampel, ke dalam hidrolisat ditambahkan 1 gram karbon aktif dan didiamkan selama 15 menit, lalu disaring dengan kertas saring biasa. Filtrat yang didapat, dideionisasi dengan menggunakan resin penukar kation dan anion. Filtrat diberi resin penukar kation, kemudian filtrat diukur pH – nya setelah 30 menit. Setelah menunjukkan pH asam, dilakukan pemisahan dengan cara penyaringan atau dekantasi. Filtrat hasil pemisahan, diberikan resin penukar anion, kira – kira satu sendok teh sambil diaduk selama sekitar 30 menit dan diukur pH –nya. Bila pH mendekati netral, dilakukan penyaringan. Filtrat kemudian disaring menggunakan membran nitroselulosa. Untuk sampel hasil fermentasi, terlebih dahulu disentrifugasi selama 20 menit, dengan kecepatan putar 3000 rpm. Supernatan yang didapatkan dari hasil sentrifugasi dideionisasi, kemudian disaring dengan menggunakan membran nitroselulosa. Sebanyak 20 μL larutan tersebut dianalisis dengan HPLC dan hasilnya diamati dengan membandingkan waktu retensinya dengan standar (xilitol dan D-xilosa).

3.2.11 Diagram Kerja Secara Umum

Bagan kerja penelitian terdapat pada Lampiran 1.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, kandungan xilan pada serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo dihidrolisis secara kimiawi dengan menggunakan asam sulfat sebagai katalis untuk menghasilkan xilosa sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Xilosa yang dihasilkan, difermentasikan oleh khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR) dari genus *Candida* yaitu *Candida fukuyamaensis*. Spesies khamir yang digunakan dalam penelitian ini, merupakan khamir yang dapat menghasilkan xilitol dengan kadar paling tinggi, berdasarkan hasil penelitian sebelumnya.⁹

Sampel serbuk kayu merupakan limbah lignoselulosa yang kaya akan kandungan lignin. Kandungan lignin yang tinggi dapat mengganggu proses produksi xilitol oleh khamir. Oleh karena itu, dilakukan proses delignifikasi dan detoksifikasi terhadap sampel yang akan difermentasi oleh khamir untuk produksi xilitol. Pengaruh dari proses delignifikasi dan detoksifikasi dapat dilihat dengan membandingkan produk hasil fermentasi dari kedua jenis perlakuan tersebut dengan kontrol yaitu sampel yang tidak diberi perlakuan.

Kontrol yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari 3 macam, yaitu kontrol substrat tanpa perlakuan, kontrol xilosa murni, dan kontrol substrat tanpa penambahan khamir. Kontrol substrat tanpa perlakuan adalah substrat yang tidak mendapat perlakuan delignifikasi maupun detoksifikasi. Kontrol ini

digunakan untuk melihat pengaruh proses delignifikasi dan detoksifikasi terhadap substrat yang difermentasi. Kontrol xilosa murni digunakan untuk melihat kemampuan khamir dalam memfermentasi substrat. Untuk kontrol xilosa murni ini, konsentrasinya dibuat mendekati konsentrasi xilosa yang terkandung dalam sampel agar dapat dibandingkan. Kontrol substrat tanpa penambahan khamir adalah substrat yang mendapat perlakuan yang sama dengan sampel, hanya saja tidak ditambahkan khamir ke dalamnya. Kontrol ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi dari mikroorganisme lain.

4.1 *Sampling* Serbuk Gergajian Kayu

Serbuk gergajian kayu yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari tempat penggergajian kayu di daerah Bantul, Yogyakarta. Daerah Bantul, Yogyakarta, merupakan daerah industri penggergajian kayu skala industri kecil yang menghasilkan limbah serbuk gergajian kayu dalam jumlah besar dari berbagai macam jenis kayu, terutama kayu Jawa. Dalam penelitian ini, serbuk gergajian kayu yang digunakan adalah serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo.

Alasan pemilihan serbuk kayu jati dan kayu melinjo sebagai substrat adalah sebagai berikut:

- Limbah serbuk gergajian kayu jati jumlahnya sangat berlimpah.

Hal ini disebabkan karena jati merupakan kayu komersil yang

bermutu tinggi sehingga permintaan akan jenis kayu ini untuk berbagai keperluan, sangat banyak.

- Kayu melinjo walaupun kualitas kayunya kurang baik bila dibandingkan dengan kayu jati, namun kayu ini juga sering digunakan untuk papan bangunan dan bahan dasar perlengkapan dapur. Di daerah Bantul, terdapat sentra industri kecil pembuatan parut berbahan dasar kayu melinjo, yang menyebabkan limbah serbuk gergajian kayu melinjo juga cukup melimpah.
- Perbedaan karakter (fisika dan kimia) kedua jenis kayu tersebut dapat digunakan sebagai dasar untuk *screening* jenis kayu terbaik yang dapat digunakan untuk produksi xilitol.

4.2 Persiapan Sampel Serbuk Gergajian Kayu

Sampel serbuk gergajian kayu yang didapatkan masih berupa serbuk kayu kasar. Oleh karena itu, serbuk kayu kasar dihaluskan terlebih dahulu untuk mendapatkan serbuk kayu halus dengan menggunakan blender. Penghalusan sampel bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan kontak sampel serbuk kayu sehingga akan mempermudah reaksi hidrolisis dengan asam. Setelah dihaluskan, serbuk kayu kemudian disaring dengan

menggunakan penyaring ayakan. Penyaringan yang dilakukan, bertujuan untuk mendapatkan sampel serbuk kayu yang homogen.

Setelah dihaluskan dan disaring, sampel serbuk kayu kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C selama 6 jam. Hal ini dilakukan untuk tujuan penyimpanan. Pengeringan dengan oven pada suhu tersebut bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada, sehingga sampel dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama dan tidak ditumbuhi jamur.

4.3 Delignifikasi Sampel Serbuk Gergajian Kayu dengan Alkali

Sebagian sampel serbuk kayu dari masing-masing jenis, didelignifikasi dengan menggunakan alkali. Sebelum proses delignifikasi, sampel serbuk kayu terlebih dahulu diekstrak di dalam sokslet dengan menggunakan campuran pelarut benzena-etanol 2:1 (Gambar 4.1). Hal ini dilakukan untuk menghilangkan kandungan ekstraktif yang terdapat pada kayu.

Ekstraktif merupakan salah satu penyusun komponen kayu, meskipun biasanya merupakan bagian kecil, larut dalam pelarut-pelarut organik netral atau air. Sebagian besar ekstraktif terdiri atas senyawa-senyawa tunggal tipe lipofil maupun hidrofil. Bagian lipofil yang dapat diekstraksi dengan pelarut-pelarut nonpolar (dietil eter, heksana, benzena, diklorometana, dan sebagainya), terutama terdiri atas lemak, lilin, terpenoid, dan alkohol-alkohol alifatik. Sedangkan bagian hidrofil yang hanya dapat diekstraksi dengan air

atau pelarut-pelarut organik polar (aseton, etanol, dan sebagainya), mengandung sejumlah besar konstituen-konstituen fenol.



Gambar 4.1 Ekstraksi sampel serbuk kayu dalam sokslet

Setelah dihilangkan kandungan ekstraktifnya, sampel serbuk kayu kemudian diberi perlakuan dengan alkali untuk proses delignifikasi. Sampel serbuk kayu didelignifikasi dengan menggunakan larutan NaOH 1%. Natrium hidroksida (sodium hidroksida; NaOH) merupakan basa alkali, yang membentuk larutan alkali yang kuat saat dilarutkan dalam pelarut seperti air. Larutan basa kuat dapat digunakan untuk memisahkan lignin dari kayu.



Gambar 4.2 Serbuk kayu jati dalam larutan NaOH 1%



Gambar 4.3 Serbuk kayu melinjo dalam larutan NaOH 1%

Lignin merupakan senyawa polimer dari unit-unit fenil propanoid yang bersifat asam. Larutan NaOH 1% mengekstrak lignin yang terkandung dalam sampel serbuk kayu dengan memutus ikatan–ikatan eter antara unit-unit fenil propanoid menjadi monomer-monomernya, menurunkan berat molekul, dan menghasilkan gugus-gugus hidroksil fenol bebas. Dengan demikian, reaksi dengan alkali akan menaikkan hidrofilitas lignin, sehingga lebih mudah larut. Bersamaan dengan pelarutan lignin, sedikit atau banyak karbohidrat juga ikut larut. Namun, pemecahan ikatan-ikatan glikosida oleh alkali biasanya sangat lambat bila dibandingkan dengan hidrolisis yang dikatalisis oleh asam.⁴

Sampel serbuk kayu yang telah didelignifikasi dengan larutan alkali kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Residu dari proses delignifikasi ini selanjutnya disebut sebagai sampel serbuk kayu yang didelignifikasi. Massa yang hilang setelah proses delignifikasi, diakibatkan karena adanya beberapa komponen dari sampel yang terlarut dalam larutan alkali dan juga dalam pelarut benzena-etanol (pada *treatment* sebelumnya).

4.4 Hidrolisis Sampel Serbuk Kayu dengan Asam

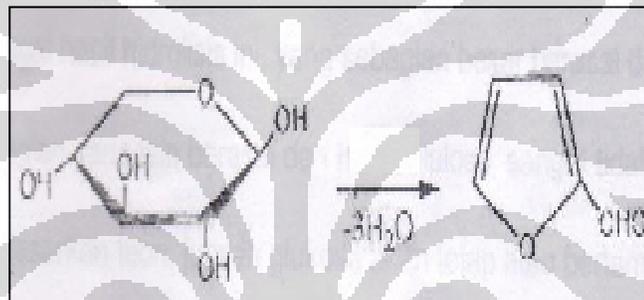
Pada penelitian ini, dicari kondisi hidrolisis optimum untuk menghidrolisis sampel serbuk kayu yang digunakan. Kondisi hidrolisis optimum yang digunakan pada penelitian terdahulu,^{8,9} tidak dapat dipakai dalam penelitian ini karena adanya perbedaan komposisi kimia sampel. Oleh karena itu, dilakukan variasi kondisi hidrolisis pada suhu dan waktu hidrolisis yang berbeda-beda pada konsentrasi asam yang sama untuk mendapatkan komposisi xilosa terbanyak. Konsentrasi asam dibuat tetap (0,3 M) dengan tujuan agar hanya hemiselulosa yang terhidrolisis. Hal ini disebabkan karena struktur hemiselulosa yang berbentuk amorf sehingga lebih mudah dihidrolisis. Hemiselulosa yang merupakan polimer bercabang, tidak membentuk mikrofibril yang kristalin dan rigid seperti selulosa, sehingga relatif lebih mudah dihidrolisis. Selulosa lebih sulit dihidrolisis daripada hemiselulosa karena memiliki derajat kristalinitas yang tinggi, sehingga dibutuhkan konsentrasi asam yang lebih tinggi untuk memutuskan ikatan-ikatan antar monomernya.

Pada penelitian ini, larutan asam yang digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis hemiselulosa dalam serbuk gergajian kayu adalah asam sulfat. Asam sulfat merupakan salah satu asam yang biasa digunakan sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis.

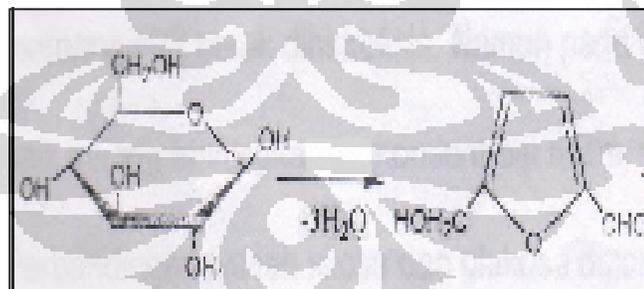
Hidrolisis hemiselulosa menggunakan asam akan menghasilkan produk campuran, karena asam memecah polisakarida secara acak,

sehingga tidak hanya produk xilosa saja yang didapat, tetapi juga monomer gula yang lain. Monosakarida-monosakarida yang terbentuk selama hidrolisis oleh asam, meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam dan waktu hidrolisis. Akan tetapi, pentosa dan heksosa cenderung mengalami degradasi menjadi furfural dan 5-hidroksimetil furfural jika konsentrasi asam, waktu, dan suhu reaksi hidrolisis ditingkatkan.⁴¹

Degradasi xilosa menjadi furfural dan glukosa menjadi hidroksimetil furfural dapat dilihat pada gambar 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.4 Reaksi β -D-xilopiranososa menjadi furfural



Gambar 4.5 Reaksi β -D-glukopiranososa menjadi HMF

Setelah melalui proses hidrolisis dengan asam, hidrolisat yang dihasilkan, dinetralkan dengan NaOH hingga pH-nya berkisar antara 5,0-7,0. Penetralkan dimaksudkan agar hidrolisat tidak terhidrolisis terus-menerus,

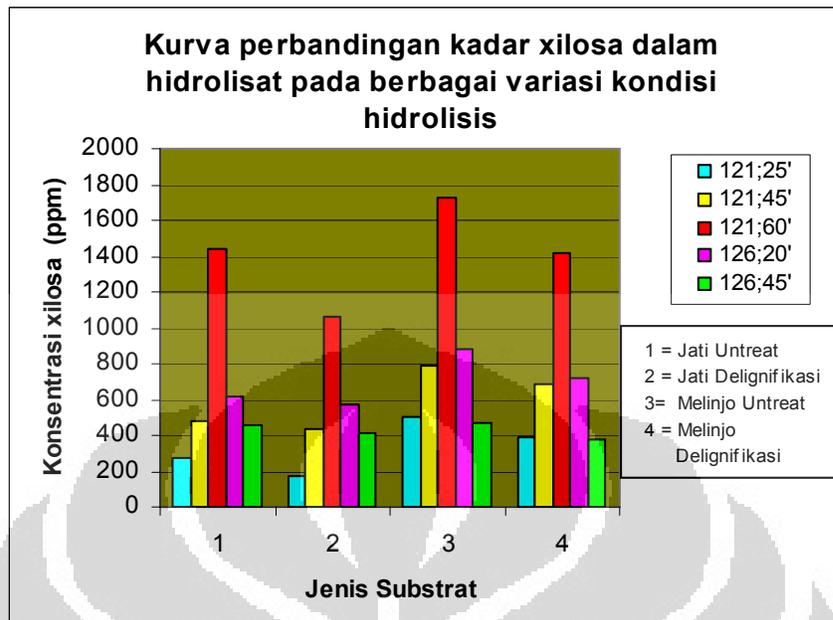
sedangkan pH penetralan berkisar antara 5,0-7,0. Apabila pH lebih dari 7,0 (hidrolisat bersifat basa), dikhawatirkan cincin karbohidrat yang ada akan rusak.

4.4 Hasil Hidrolisis

Hidrolisis terhadap sampel dilakukan pada kondisi optimum. Hidrolisis pada kondisi optimum bertujuan untuk mendapatkan xilosa dalam jumlah yang besar. Kondisi hidrolisis optimum yang didapatkan pada penelitian ini adalah hidrolisis pada suhu 121°C selama 60 menit dengan konsentrasi asam 0,3 M. Tabel 4.1 menunjukkan data konsentrasi xilosa pada berbagai variasi kondisi hidrolisis.

Tabel 4.1 Konsentrasi xilosa yang dihasilkan pada berbagai variasi kondisi hidrolisis.

Substrat	Variasi kondisi	121 °C, 0.3 M, 25'	121 °C, 0.3 M, 45'	121 °C, 0.3 M, 60'	126 °C, 0.3 M, 20'	126 °C, 0.3 M, 45'
		C xilosa (ppm)				
Jati untreat		278,32	476,60	1437,2	618,70	456,47
Jati delignifikasi		167,63	436,90	1059,7	567,13	406,99
Melinjo untreat		498,02	794,10	1726,7	875,72	472,48
Melinjo delignifikasi		388,26	680,37	1419,1	721,85	379,22



Gambar 4.6 Kurva perbandingan kadar xilosa dalam hidrolisat

Data konsentrasi xilosa hasil hidrolisis (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa semakin lama waktu berlangsungnya proses hidrolisis kimiawi, maka semakin banyak ikatan-ikatan glikosida pada polisakarida yang terputus membentuk monomer-monomernya. Hal ini dapat dilihat dari kadar xilosa yang meningkat seiring dengan meningkatnya waktu hidrolisis pada suhu hidrolisis 121 °C. Pada suhu hidrolisis yang lebih tinggi (126 °C), semakin lama waktu hidrolisis, konsentrasi xilosa menjadi berkurang. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi suhu dan semakin lama waktu hidrolisis, furfural dan hidroksimetil furfural (HMF) yang terbentuk semakin bertambah seiring dengan meningkatnya waktu hidrolisis, sehingga jumlah xilosa yang terdegradasi akan jauh lebih banyak, dibandingkan dengan penambahan dari masing-masing xilosa baru yang terbentuk. Hal ini dapat dilihat dari

pengamatan warna hidrolisat yang semakin berwarna coklat gelap, karena adanya proses karamelisasi yang melibatkan degradasi gula. Semakin lama waktu dan semakin tinggi suhu hidrolisis, maka intensitas warna coklat pada hidrolisat akan semakin pekat dan kehitaman. Warna coklat pada hidrolisat merupakan indikasi dari senyawa furfural dan HMF yang terbentuk.⁴⁸

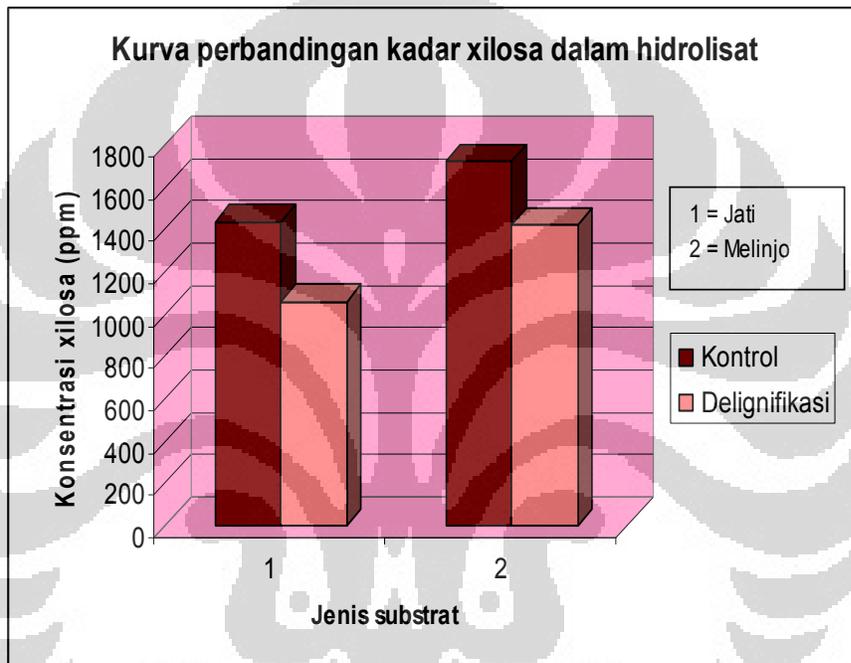
Pada umumnya, proses pencoklatan atau *browning* dibagi menjadi dua jenis, yaitu pencoklatan enzimatik dan non enzimatik. Pencoklatan enzimatik biasanya terjadi pada buah-buahan yang banyak mengandung substrat senyawa fenolik, sedangkan salah satu pencoklatan non enzimatik adalah karamelisasi yang melibatkan degradasi gula. Bila pemanasan dilakukan terus-menerus, akan dihasilkan warna yang lebih gelap dan mengarah ke pembentukan warna coklat gelap sampai hitam. Jika reaksi ini tidak dikontrol, maka dapat memberikan hasil yang tidak menyenangkan, hangus, dan produk-produk yang pahit.⁴⁹

Tabel 4.2 Kadar xilosa dalam hidrolisat

Jenis Substrat	% kadar xilosa (w/w)
Jati untreat	4,31%
Jati delignifikasi	3,18%
Melinjo untreat	5,18%
Melinjo delignifikasi	4,26%

Tabel 4.2 menunjukkan persen kadar xilosa dalam 1 gram sampel serbuk kayu pada kondisi hidrolisis optimum. Konsentrasi xilosa pada serbuk

kayu melinjo lebih banyak daripada konsentrasi xilosa pada serbuk kayu jati. Hal ini berkaitan dengan komposisi hemiselulosa awal yang terdapat pada kedua jenis kayu tersebut. Pada sampel serbuk kayu yang didelignifikasi, kadar xilosa yang terdapat dalam hidrolisat lebih rendah daripada sampel serbuk kayu yang tidak didelignifikasi.



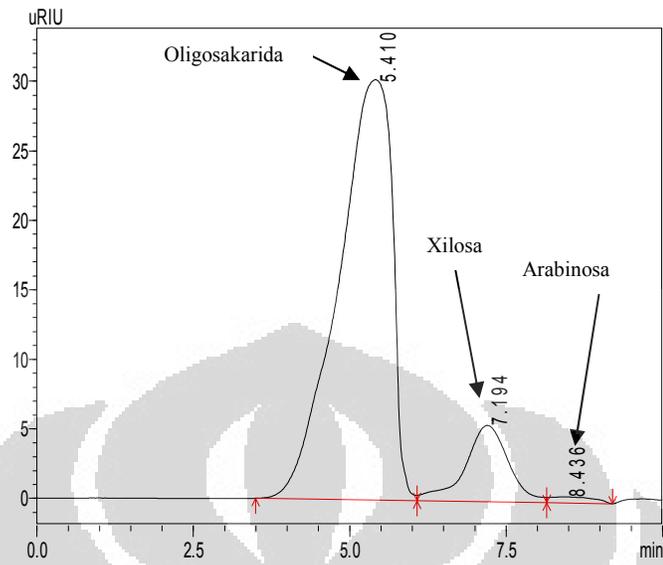
Gambar 4.7 Kurva perbandingan hidrolisat untuk kedua jenis sampel serbuk kayu

Pada serbuk kayu yang didelignifikasi, konsentrasi xilosa yang terdapat pada hidrolisat lebih sedikit daripada konsentrasi xilosa pada serbuk kayu yang tidak diberi perlakuan delignifikasi. Hal ini disebabkan karena adanya hemiselulosa yang ikut larut saat proses delignifikasi sampel. Menurut literatur dan penelitian terdahulu, alkali dapat digunakan untuk

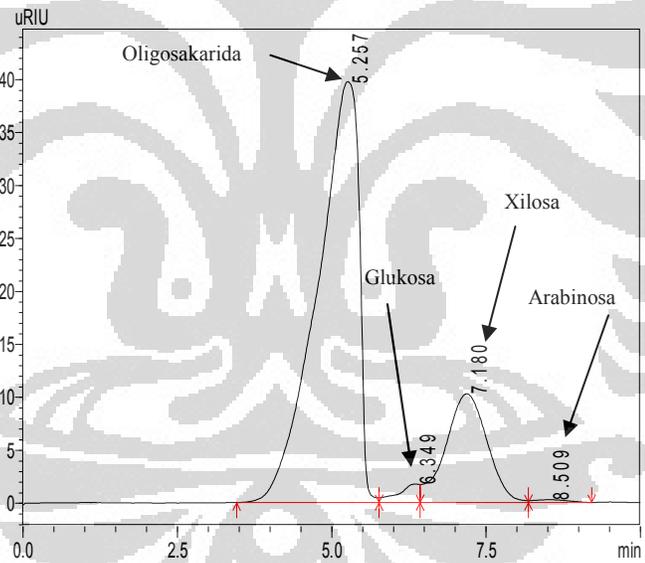
mengisolasi hemiselulosa dari kayu atau limbah lignoselulosa.^{4,50} Namun, untuk dapat mengisolasi hemiselulosa dari kayu, dibutuhkan konsentrasi alkali yang lebih kuat daripada konsentrasi alkali yang digunakan dalam penelitian ini (lebih dari 1%).

Ikatan-ikatan kimia yang terjadi di antara lignin dan karbohidrat merupakan tipe ikatan kovalen dan membentuk kompleks lignin karbohidrat (LCC). Ikatan-ikatan kimia terjadi antara lignin dan semua konstituen hemiselulosa. Bahkan ada indikasi adanya ikatan-ikatan antara lignin dan selulosa. Ikatan-ikatan tersebut dapat berupa tipe ester atau eter dan bahkan mungkin ikatan-ikatan glikosida. Ikatan-ikatan ester mudah dipecah oleh alkali sedangkan ikatan-ikatan eter lebih stabil daripada ikatan-ikatan ester.⁴ Ikatan yang terjadi antara lignin dan karbohidrat ini, merupakan salah satu alasan ikut terekstraknya hemiselulosa ke dalam larutan alkali selain karena struktur hemiselulosa yang amorf.

Gambar 4.8 dan 4.9 merupakan gambar kromatogram hidrolisat sampel serbuk kayu jati dan kayu melinjo yang tidak didelignifikasi pada kondisi hidrolisis optimum.



Gambar 4.8 Kromatogram hidrolisat sampel serbuk kayu jati



Gambar 4.9 Kromatogram hidrolisat serbuk kayu melinjo

Kromatogram hidrolisat menunjukkan bahwa dalam sampel serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo, terdapat produk utama berupa monomer xilosa dan produk samping berupa arabinosa serta adanya oligosakarida

yang merupakan sisa dari hemiselulosa atau selulosa yang belum terhidrolisis sempurna. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa berupa xilan, sedangkan arabinosa dihasilkan dari hidrolisis cabang rantai induk xilan.

Selain arabinosa, produk samping monosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa serbuk kayu adalah glukosa yang terdapat dalam jumlah sedikit. Mengingat bahwa D-glukosa juga merupakan salah satu monomer penyusun hemiselulosa, maka glukosa yang terdapat pada hidrolisat kemungkinan bukan berasal dari hidrolisis selulosa tetapi dari hidrolisis hemiselulosa, karena untuk memutus ikatan glikosida pada selulosa dibutuhkan konsentrasi asam yang lebih tinggi (1M).⁸

Hidrolisat yang mengandung xilosa kemudian dipekatkan dengan cara menguapkannya pada suhu 70 °C dengan tujuan mendapatkan kadar xilosa yang cukup banyak untuk dapat dikonversi menjadi xilitol. Pemekatan hidrolisat dilakukan selama 2 jam dengan menggunakan *waterbath*. Hidrolisat yang telah dipekatkan, kemudian digunakan untuk medium fermentasi, untuk proses biokonversi xilosa menjadi xilitol. Dari hasil pemekatan hidrolisat, didapatkan kadar xilosa yang lebih tinggi dalam hidrolisat dibandingkan dengan kadar xilosa dalam hidrolisat mula-mula. Tabel 4.3 menunjukkan data perbandingan kadar xilosa sebelum dan sesudah pemekatan.

Tabel 4.3 Data perbandingan kadar xilosa dalam hidrolisat

Jenis Substrat	% kadar xilosa sebelum pemekatan	% kadar xilosa sesudah pemekatan
Jati kontrol	4,31%	5,4%
Jati delignifikasi	3,18%	3,82%
Melinjo kontrol	5,18%	6,16%
Melinjo delignifikasi	4,26%	5,3%

4.5 Detoksifikasi Hidrolisat dengan Arang Aktif

Selama proses hidrolisis dengan menggunakan larutan H_2SO_4 , senyawa-senyawa yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme juga terbentuk. Masalah yang berhubungan dengan fermentasi terhadap gula hemiselulosa untuk menghasilkan xilitol adalah adanya berbagai macam komponen yang akan menghambat mikroorganisme fermentor. Bila senyawa-senyawa tersebut tidak dihilangkan, pertumbuhan mikroorganisme akan terganggu dan proses fermentasi tidak dapat berjalan dengan baik.²⁹

Inhibitor yang dihasilkan selama proses hidrolisis, dibagi dalam 4 kelompok utama yaitu hasil samping turunan gula (furfural dan hidroksimetil furfural), asam asetat, produk degradasi lignin (beberapa senyawa aromatik dan fenolik), dan inhibitor yang berasal dari logam atau mineral dalam kayu. Inhibitor tersebut dapat dihilangkan dari hidrolisat untuk meningkatkan produksi xilitol, melalui metode detoksifikasi, salah satunya adalah dengan

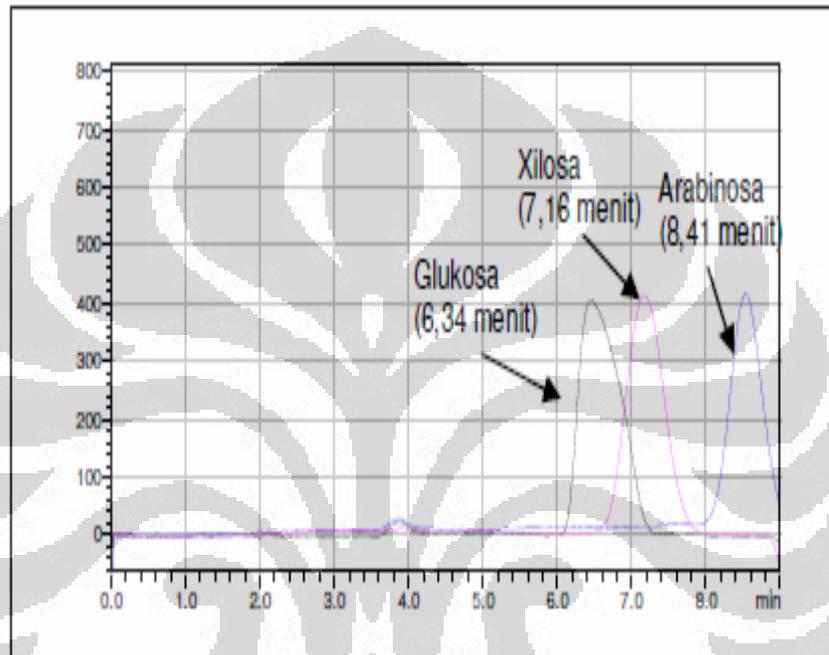
metode adsorpsi menggunakan arang aktif. Adsorpsi dengan arang aktif adalah metode detoksifikasi yang cukup baik untuk hidrolisat kayu.²⁹

Proses detoksifikasi dilakukan dengan menambahkan 1% arang aktif (w/v) ke dalam hidrolisat sampel serbuk kayu dan dikocok dengan *shaker* selama 30 menit. Arang yang dipakai dalam penelitian ini, adalah arang dari kayu gelam, yang diaktifkan melalui pemanasan pada suhu 140 °C, selama 45 menit. Arang tersebut mempunyai gugus-gugus aktif yang dapat menyerap senyawa berwarna, seperti furfural dan HMF, yang mempunyai ikatan rangkap. Menurut penelitian terdahulu,²⁹ metode detoksifikasi dengan 1 % arang aktif (w/v) dapat mengadsorpsi sebagian besar komponen toksik pada hidrolisat, khususnya senyawa furfural dan HMF, tanpa adanya xilosa yang hilang. Hasil fermentasi sampel yang didetoksifikasi dibandingkan dengan hasil fermentasi sampel yang tidak didetoksifikasi.

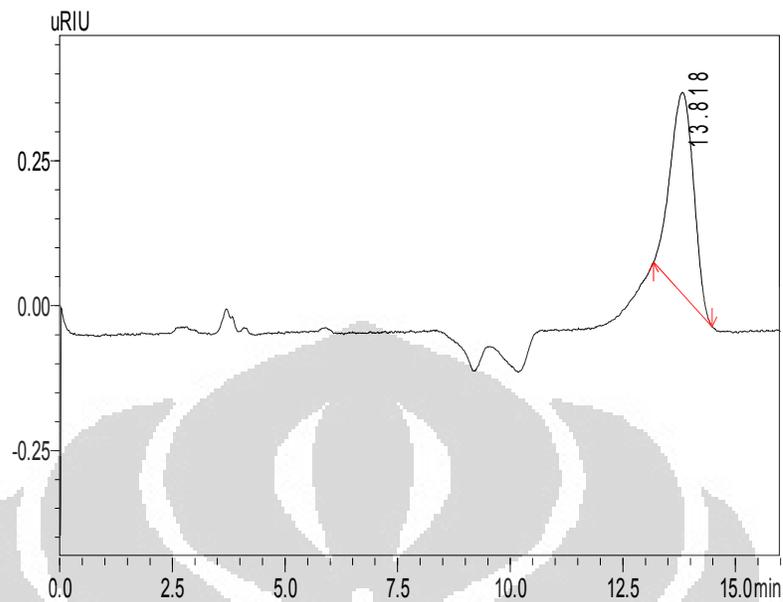
4.6 Identifikasi Standar

Identifikasi standar dilakukan sebagai dasar untuk uji kualitatif dan kuantitatif. Larutan standar yang diidentifikasi adalah larutan standar karbohidrat (glukosa, arabinosa, dan xilosa) dan larutan standar xilitol. Masing-masing standar diukur dengan HPLC Shimadzu Prominence-20, dengan kolom karbohidrat, dengan detektor Refraktif Indeks (RID-10A). Dari pengukuran ini, dapat diketahui nilai waktu retensi dari masing-masing standar yang digunakan untuk uji kualitatif. Sedangkan luas peak dari

masing-masing deret larutan standar yang diukur, dibuat persamaan regresi linearnya untuk uji kuantitatif. Hasil pengukuran HPLC yang berupa kromatogram HPLC dan grafik deret masing-masing standar tertera dalam Lampiran 2, 3, dan 4.



Gambar 4.10 Kromatogram perbandingan standar karbohidrat



Gambar 4.11 Kromatogram standar xilitol 100 ppm

4.7 Fermentasi dengan Khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

Semua peralatan dan media yang digunakan dalam proses fermentasi, disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme lain. Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 160 °C selama 2 jam untuk peralatan gelas, dan sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit untuk media dan *tip* pipet mikro.

Sebelum dilakukan fermentasi, isolat khamir yang didapat, dimurnikan terlebih dahulu melalui purifikasi dengan metode cawan gores. Metode cawan gores ini merupakan metode yang paling umum dan mudah untuk

pemurnian mikroorganisme dari kontaminasi mikroorganisme lain. Setelah dilakukan inkubasi, diperoleh sejumlah sel khamir yang murni. Hasil pemurnian tersebut kemudian dipindahkan dan diinkubasi dalam media agar miring dan digunakan sebagai *stock culture*. Media yang digunakan sebagai media tumbuh khamir ini adalah YMA (*Yeast Malt Agar*) yang terdiri dari: ekstrak khamir (3 g/L), ekstrak malt (3 g/L), pepton (5 g/L), glukosa (10 g/L), dan agar (15 g/L). Inkubasi dilakukan selama 2 hari, disesuaikan dengan umur khamir.

Untuk proses fermentasi, dilakukan pembuatan suspensi sel khamir dengan cara menambahkan 10 mL air steril ke dalam media agar miring yang mengandung biakan sel khamir. Hidrolisat sampel serbuk gergajian kayu jati dan kayu melinjo, yang merupakan media fermentasi, yang mengandung xilosa sebagai sumber karbon, diberi ekstrak khamir sebagai sumber nutrisi (sumber vitamin B serta sumber C dan N), KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber mineral. pH media diatur pada pH 6, yang merupakan pH optimal untuk pertumbuhan khamir secara umum.

Fermentasi dilakukan secara *batch process*, yaitu fermentasi yang dilakukan dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi. Sebelum inokulum dimasukkan ke dalam media fermentasi, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi terhadap media fermentasi. Pada waktu sterilisasi media fermentasi, dilakukan sterilisasi terpisah untuk garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Hal ini dilakukan untuk mencegah reaksi antara ion ammonium

dengan gula pada medium, yang disebut reaksi Maillard.⁵¹ Reaksi ini biasa terjadi pada makanan yang mengandung asam amino dan karbohidrat, yang dipanaskan pada suhu tinggi, misalkan pada pemanggangan roti, dan disebut juga *browning reaction* karena menyebabkan perubahan warna menjadi kecokelatan (*browning*) dan rasa agak pahit pada makanan.

Media yang telah disterilisasi, siap digunakan untuk fermentasi. Sebanyak 2 mL inokulum, dimasukkan ke dalam media fermentasi dan diinkubasi dalam *incubator shaker*. Fermentasi dilakukan pada *incubator shaker* agar suhu fermentasi tetap terjaga. Penggunaan *shaker* ditujukan untuk memaksimalkan penggunaan media oleh mikroorganisme. Pengambilan produk dilakukan setiap 12 jam untuk mendapatkan kurva produk sehingga dapat diketahui waktu optimum pembentukan produk hasil fermentasi.

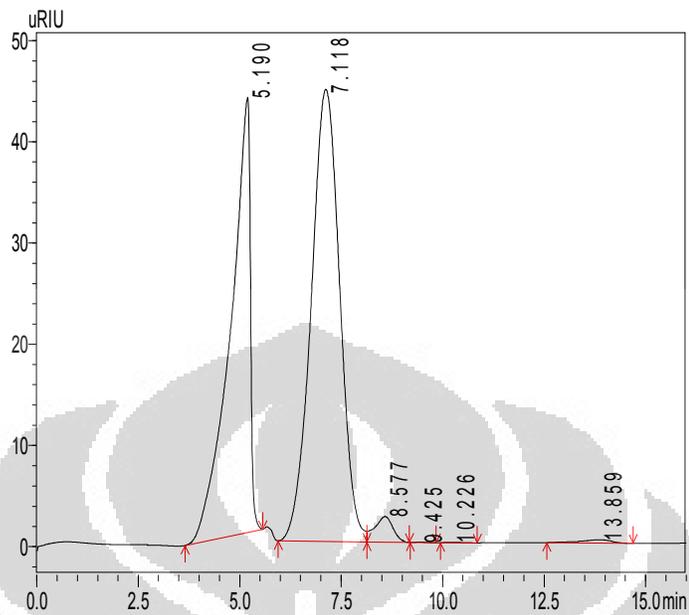
4.8 Hasil Fermentasi

Proses fermentasi dihentikan dengan memanaskan tabung berisi cuplikan sampel di penangas air yang bersuhu 80°C selama 10 menit. Hal ini bertujuan untuk mengurangi aktivitas khamir tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada. Setelah itu dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan mikroorganisme dengan larutan hasil fermentasi dengan kecepatan putaran 3000 rpm selama 20 menit. Setelah proses sentrifugasi selesai, dilakukan dekantasi untuk memperoleh supernatannya.

Untuk mengetahui kadar xilosa dan xilitol dalam sampel, dilakukan analisis dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Sebelum dilakukan analisis dengan HPLC, ke dalam sampel dilakukan deionisasi untuk menghilangkan ion-ion yang ada agar tidak merusak kolom kromatografi. Hasil kromatogram yang didapat dari pengukuran, ditentukan luas areanya dan besarnya dibandingkan dengan luas area standar xilosa dan xilitol yang sebelumnya telah diketahui.

4.8.1 Hasil fermentasi kontrol xilosa

Pada penelitian ini, digunakan kontrol xilosa murni yang berfungsi untuk mengetahui kemampuan khamir dalam mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Konsentrasi xilosa yang digunakan, yaitu sebesar 0,3 g/L (3000 ppm). Besarnya konsentrasi xilosa murni yang digunakan, dibuat mendekati konsentrasi xilosa dalam sampel, agar dapat dipakai sebagai acuan dan dibuat perbandingannya. Sebelum difermentasi, kontrol xilosa murni ditambahkan nutrisi dan garam-garam untuk pertumbuhan khamir, kemudian disterilisasi. Pengambilan hasil fermentasi dilakukan setiap 12 jam, sampai jam ke-72.

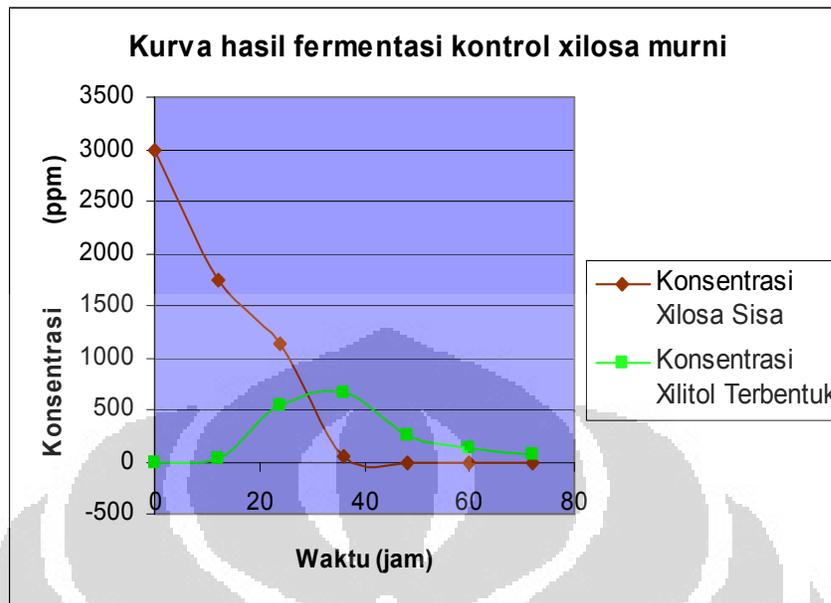


Gambar 4.12 Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni

Berikut adalah tabel data dan kurva hasil fermentasi kontrol xilosa murni.

Tabel 4.4 Hasil fermentasi kontrol xilosa murni

Waktu	Xilosa Sisa	Xilitol	% konversi xilosa menjadi xilitol
0	3000	0	0
12	1740	38,56	1,92
24	1130	547,68	18,02
36	56,2	654,36	21,53
48	-----	253,47	8,34
60	-----	133,89	4,40
72	-----	71,25	2,34



Gambar 4.13 Kurva hasil fermentasi untuk kontrol xilosa murni

Telah dilakukan penelitian terhadap penentuan kurva pertumbuhan khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247.⁴⁶ Didapatkan data bahwa pada jam ke-0 hingga jam ke-6, *C. fukuyamaensis* mengalami fase lag. Selama jam ke-12 hingga ke 24, khamir memasuki fase logaritma. Pada jam ke-30 pertumbuhan khamir berjalan lambat karena pada tahap ini jumlah sel khamir tetap atau jumlah sel yang hidup sebanding dengan yang mati.

Data yang diperoleh adalah produk xilitol mulai terbentuk pada jam ke-12. Hal ini disebabkan karena pada jam ke-12, khamir telah memasuki fasa logaritma. Pada fase ini, khamir membelah dengan cepat, dengan laju konstan, dan mulai terdapat aktivitas enzim untuk metabolisme. Adanya aktivitas enzim untuk metabolisme menyebabkan mulai terbentuknya xilitol

sebagai hasil metabolisme xilosa. Produk xilitol bertambah pada jam ke-24, dan mencapai konsentrasi tertinggi pada jam ke-36.

Pada fase logaritma, mulai terbentuk metabolit seperti xilitol karena kandungan NADH dalam sel mengalami akumulasi. Terakumulasinya NADH, menyebabkan aktivitas dari enzim *xilose reductase* lebih dominan dibandingkan enzim *xilitol dehidrogenase*. Enzim *xilose reductase* merupakan enzim yang berperan dalam reaksi reduksi xilosa menjadi xilitol. Tingginya aktivitas enzim *xilose reductase*, menyebabkan produksi xilitol oleh khamir meningkat.

Peran oksigen merupakan faktor yang penting untuk menghasilkan xilitol dari xilosa, apabila menggunakan khamir dari golongan *Candida*. Pada kondisi oksigen yang terbatas, jalur oksidatif fosforilasi tidak dapat mengoksidasi kembali NADH yang terbentuk, sehingga konsentrasi NADH dalam sel meningkat. Tingginya konsentrasi NADH dalam sel, menaikkan aktivitas enzim *xilose reductase*, dan menyebabkan akumulasi xilitol.

Pada jam ke-30, saat khamir memasuki fase pertumbuhan diperlambat dan kemudian memasuki fase stasioner, produksi xilitol mengalami peningkatan dan mencapai konsentrasi tertinggi yaitu pada jam ke-36, dengan persen konversi sebesar 21,53%. Hal ini disebabkan karena konsumsi xilosa sebagian besar ditujukan untuk produksi xilitol dan hanya sedikit yang digunakan untuk pertumbuhan, sebab khamir telah memasuki fase statis.⁵² Setelah jam ke-36, terjadi penurunan konsentrasi xilitol mulai jam ke-48.

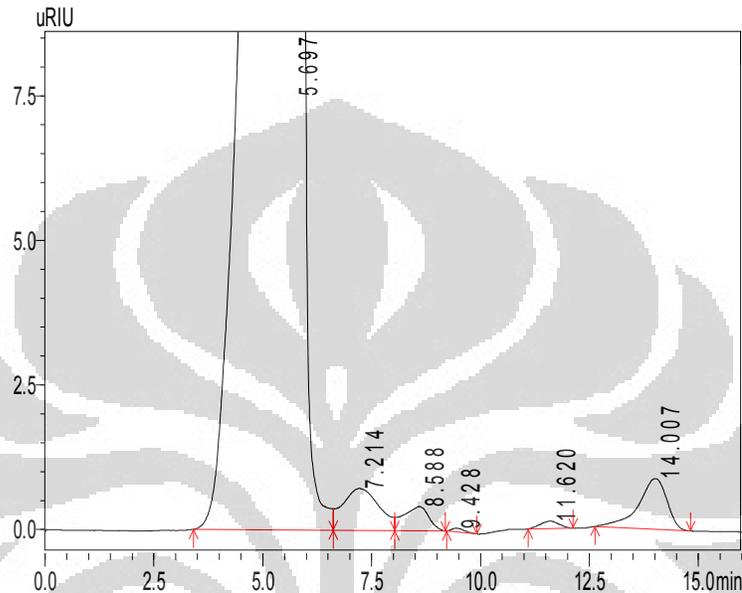
Penurunan konsentrasi xilitol, disebabkan karena sumber karbon yang berupa xilosa telah habis, sehingga xilitol dipakai sebagai sumber karbon oleh khamir. Penggunaan xilitol sebagai sumber karbon didukung oleh adanya aktivitas enzim *xilitol dehidrogenase* dan *xilulokinase* yang dimiliki oleh khamir. Pada kondisi ini, aktivitas enzim *xilitol dehidrogenase* meningkat, yang menyebabkan penurunan produk xilitol yang terbentuk. Xilitol akan dioksidasi menjadi xilulosa oleh enzim *xilitol dehidrogenase*, yang kemudian difosforilasi oleh enzim xilulokinase, dan masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP).

4.8.2 Hasil Fermentasi Substrat

Pada penelitian ini, serbuk kayu jati dan kayu melinjo digunakan sebagai bahan baku untuk produksi xilitol. Dilakukan variasi terhadap substrat yang digunakan sebagai medium fermentasi untuk proses biokonversi xilosa menjadi xilitol. Substrat yang difermentasi adalah sampel serbuk kayu tanpa perlakuan (kontrol substrat), sampel serbuk kayu didelignifikasi, sampel serbuk kayu didetoksifikasi, dan sampel serbuk kayu didelignifikasi dan didetoksifikasi.

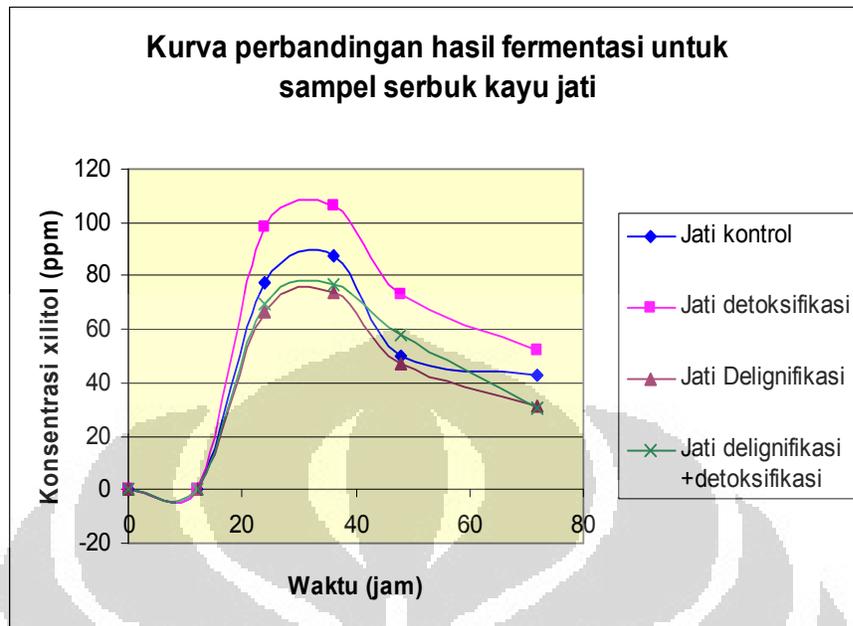
Kontrol substrat adalah hidrolisat sampel serbuk kayu yang tidak diberi perlakuan delignifikasi dengan alkali, maupun detoksifikasi dengan arang aktif. Kontrol ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh proses delignifikasi dan detoksifikasi terhadap substrat yang difermentasi, terhadap produk hasil

fermentasi. Pengambilan produk dilakukan setiap 12 jam dan didapatkan % konversi produk xilitol tertinggi pada jam ke-36 untuk masing-masing substrat, sama seperti yang terjadi pada fermentasi kontrol xilosa murni.

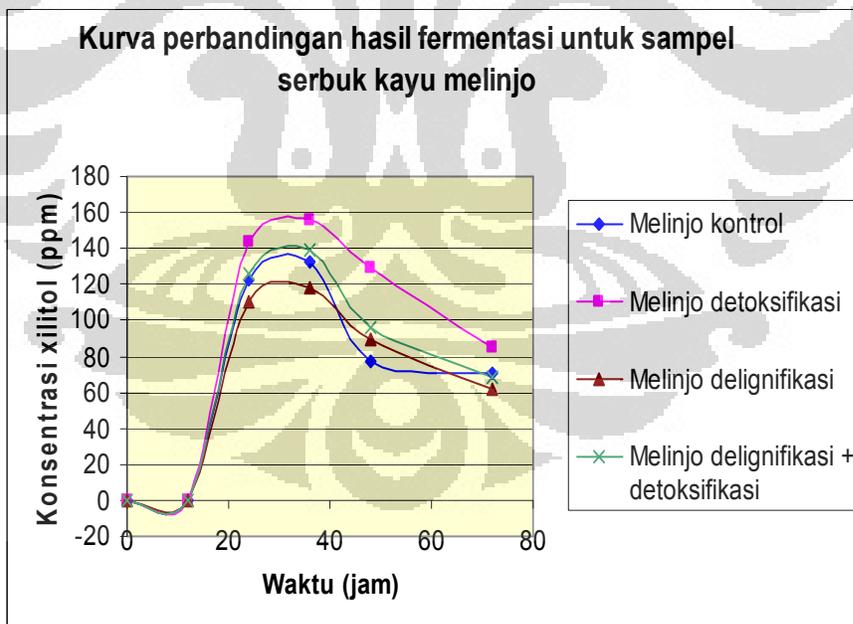


Gambar 4.14 Kromatogram hasil fermentasi substrat jati didelignifikasi dan didetoksifikasi

Berikut adalah kurva perbandingan hasil fermentasi untuk keempat variasi substrat. Gambar 4.15 merupakan kurva hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu jati, sedangkan gambar 4.16 merupakan kurva hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu melinjo.



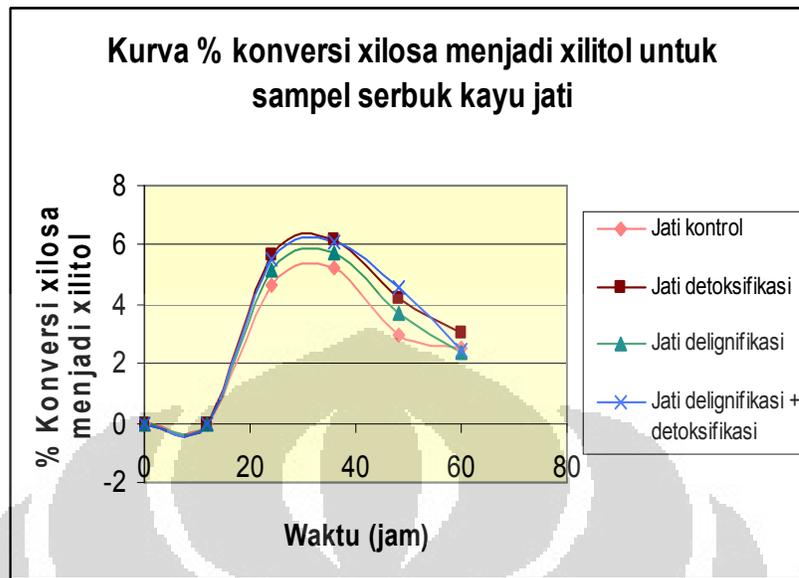
Gambar 4.15 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu jati



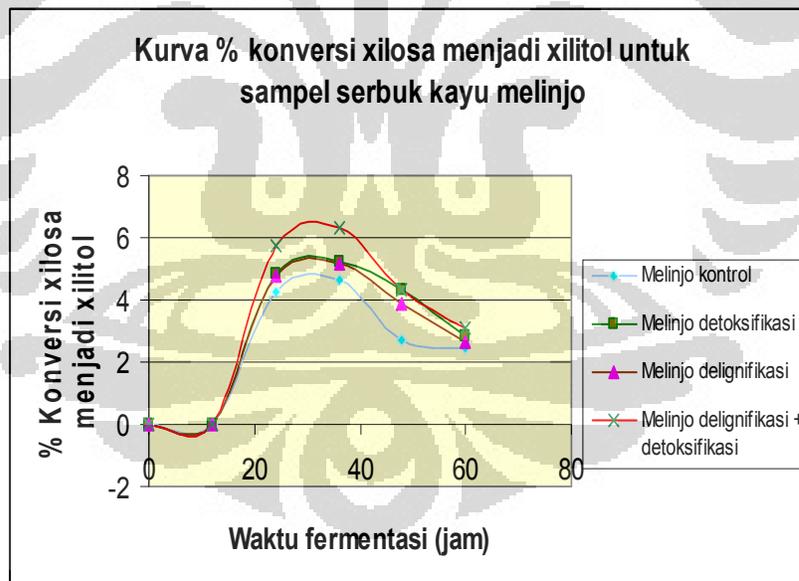
Gambar 4.16 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk sampel serbuk kayu melinjo

Masing-masing kurva hasil fermentasi (Gambar 4.15 dan 4.16), menunjukkan bahwa konsentrasi xilitol terbesar terdapat pada substrat serbuk kayu didetoksifikasi, dengan persen *yield* xilitol pada waktu fermentasi optimum (36 jam), yaitu sebesar 0,32% untuk sampel serbuk kayu jati, dan 0,47% untuk sampel serbuk kayu melinjo. Pada substrat yang didetoksifikasi, komponen inhibitor yang terdapat pada hidrolisat, diadsorpsi oleh arang aktif, sehingga proses biokonversi xilosa menjadi xilitol berjalan dengan baik, dan menghasilkan *yield* xilitol yang lebih tinggi dibandingkan substrat yang lain. Kadar xilitol yang dihasilkan pada substrat yang didelignifikasi, lebih rendah daripada substrat yang tidak didelignifikasi, karena adanya xilosa yang hilang saat proses delignifikasi.

Persen konversi produk xilitol tertinggi untuk sampel serbuk kayu jati, terdapat pada substrat yang didetoksifikasi. Sedangkan, untuk sampel serbuk kayu melinjo, persen konversi tertinggi dihasilkan oleh substrat yang didelignifikasi dan didetoksifikasi. Hal ini dipengaruhi oleh kadar xilosa dalam hidrolisat, masing-masing substrat yang difermentasi. Gambar 4.17 dan 4.18, merupakan kurva perbandingan % konversi xilosa menjadi xilitol untuk kedua jenis sampel serbuk kayu.



Gambar 4.17 Kurva % konversi xilosa menjadi xilitol untuk sampel serbuk kayu jati



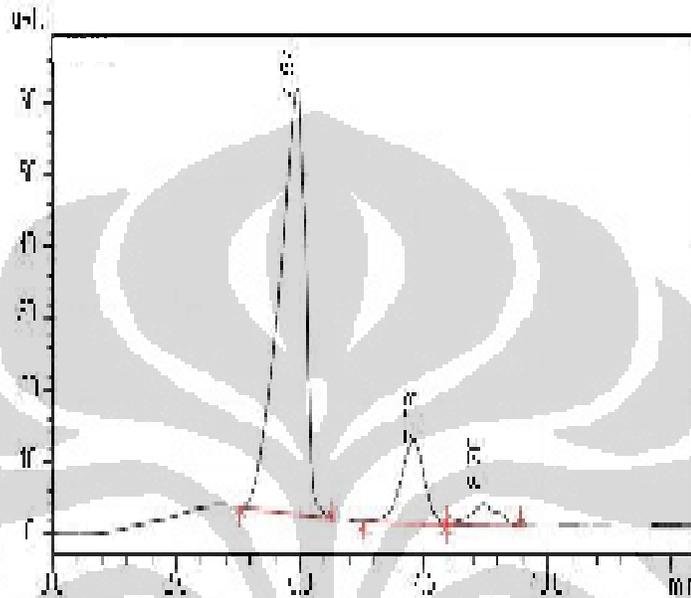
Gambar 4.18 Kurva % konversi xilosa menjadi xilitol untuk sampel serbuk kayu melinjo

Kurva persen konversi xilosa menjadi xilitol (Gambar 4.17 dan 4.18) menunjukkan bahwa substrat yang tidak diberi perlakuan delignifikasi maupun detoksifikasi (substrat kontrol), mempunyai persen konversi yang paling rendah dibandingkan dengan substrat lain yang telah diberi perlakuan delignifikasi, detoksifikasi, dan juga kedua perlakuan (delignifikasi dan detoksifikasi). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan-perlakuan yang diberikan terhadap sampel sebelum proses fermentasi tersebut, berpengaruh positif pada proses biokonversi xilosa menjadi xilitol oleh khamir. Dengan adanya perlakuan delignifikasi dan detoksifikasi terhadap substrat, sebagian besar komponen inhibitor yang dapat menghambat proses fermentasi oleh khamir dapat dihilangkan.

Pada proses delignifikasi sampel, terjadi pengurangan lignin dalam sampel, sehingga produk degradasi lignin yang berupa senyawa fenolik, juga dapat dikurangi. Senyawa fenol merupakan salah satu zat desinfektan, yang dapat mendenaturasi protein dan merusak sistem membran dari sel mikroba, sehingga senyawa hasil degradasi lignin tersebut, bersifat inhibitor bagi khamir. Selain senyawa fenolik, komponen inhibitor yang terdapat dalam substrat hidrolisat adalah senyawa furfural dan hidroksimetilfurfural, yang merupakan hasil dari degradasi monosakarida. Proses detoksifikasi dengan menggunakan arang aktif terhadap substrat dapat menghilangkan komponen-komponen inhibitor tersebut dengan cara adsorpsi.

Pada penelitian ini dilakukan kontrol dengan menggunakan hidrolisat tanpa penambahan khamir. Untuk kelompok kontrol ini, diberikan perlakuan

yang sama dengan kelompok sampel, hanya saja tidak ditambahkan khamir ke dalamnya. Pembuatan kontrol ini dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi dari mikroorganisme lain.



Gambar 4.19 Kromatogram hidrolisat substrat jati kontrol tanpa penambahan khamir pada waktu fermentasi 48 jam

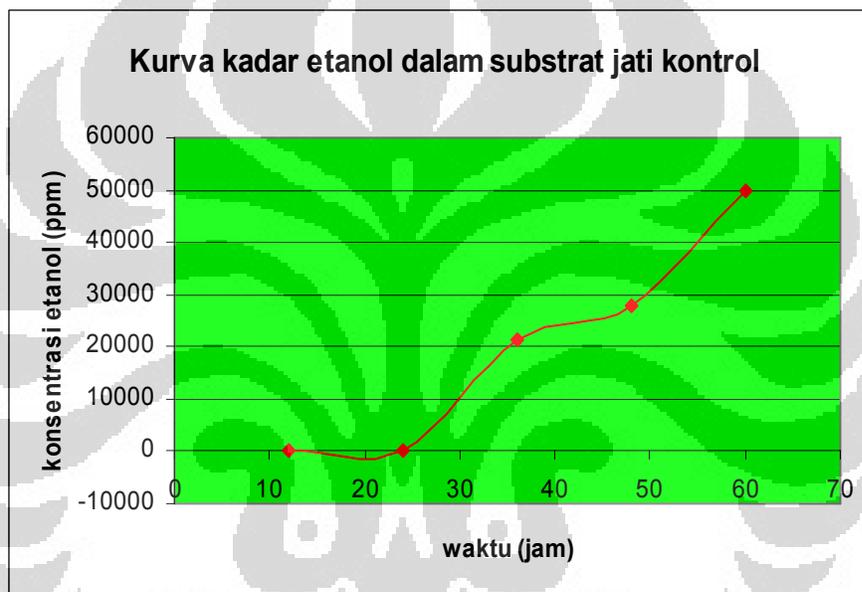
Hasil kromatogram hidrolisat menunjukkan tidak ada perbedaan antara hidrolisat awal (Gambar 4.5) dengan hidrolisat tanpa penambahan khamir yang diberi perlakuan yang sama dengan sampel (Gambar 4.19), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terjadi kontaminasi dari mikroorganisme lain.

4.8.3 Produk Hasil Samping Fermentasi Xilosa

Pada jalur katabolisme D-xilosa, terdapat tiga enzim yang berperan yaitu *xilose reductase*, *xilitol dehidrogenase*, dan *xilulokinase*. Jalur metabolismenya dapat dilihat pada Gambar 2.15. Pertama, D-xilosa direduksi menjadi xilitol oleh *xilose reductase* dan kemudian dioksidasi menjadi D-xilulosa oleh *xilitol dehidrogenase*. Lalu selanjutnya, D-xilulosa difosforilasi menjadi D-xilulosa-5-fosfat oleh *xilulokinase*, dan kemudian masuk ke dalam jalur *Penthose Phosphate Pathway* (PPP). D-xilulosa-5-fosfat pada jalur PPP, kemudian diubah menjadi piruvat dan menghasilkan asam asetat dan etanol. *Xilose reductase* memerlukan kofaktor baik NADH maupun NADPH, sedangkan *xilitol dehidrogenase* bergantung pada NAD. Pembentukan asam asetat dan etanol ini, pada metabolisme khamir merupakan hasil dari aktivitas khamir dalam meregenerasi NADPH dan NAD.⁷

Penggunaan xilitol sebagai sumber karbon, menyebabkan berkurangnya produk xilitol hasil fermentasi. Penurunan hasil xilitol tersebut karena terbentuknya produk samping yakni etanol.²⁵ Penurunan konsentrasi xilitol seiring dengan peningkatan produk etanol sebagai akibat metabolisme khamir melalui jalur (PPP). Untuk membuktikan telah terbentuknya produk etanol pada proses fermentasi xilosa menjadi xilitol, dilakukan pengecekan terhadap kadar etanol dalam substrat dengan menggunakan GC (Gas Chromathography).

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran terhadap kadar etanol dalam sampel untuk mengetahui adanya produk samping hasil metabolisme xilosa menjadi xilitol, yang mempengaruhi jumlah xilitol yang terbentuk. Pengukuran kadar etanol dilakukan terhadap salah satu jenis substrat, pada produk jam ke-36 hingga jam ke-60. Didapatkan data bahwa semakin lama waktu fermentasi, kadar etanol yang didapatkan juga semakin banyak.



Gambar 4.20 Kurva kadar etanol dalam substrat jati kontrol

Gambar 4.20 menunjukkan bahwa terdapat produk etanol dengan konsentrasi yang cukup tinggi dan konsentrasinya semakin tinggi sebanding dengan penambahan waktu. Hal ini membuktikan bahwa, penurunan produk xilitol seiring dengan penambahan produk etanol yang terbentuk. Produk etanol yang dihasilkan mempunyai konsentrasi yang cukup tinggi, bahkan lebih tinggi bila dibandingkan produk xilitol yang terbentuk. Hal ini mungkin

disebabkan karena enzim yang berperan dalam pembentukan etanol, yaitu *alcohol dehidrogenase*, lebih aktif daripada enzim *xilose reductase*.

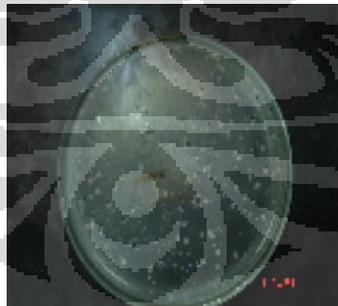
4.9 Penghitungan Jumlah Sel Khamir

Pada proses fermentasi diperlukan pengukuran terhadap jumlah sel yang akan digunakan untuk fermentasi. Hal ini disebabkan karena jumlah sel yang terdapat dalam proses fermentasi, dapat mempengaruhi biokonversi substrat menjadi produk. Pada penelitian ini, dilakukan penentuan jumlah sel khamir dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Pada penentuan jumlah sel dengan metode TPC, suspensi sel yang akan diperiksa, diencerkan sampai konsentrasi tertentu dengan air steril, kemudian diambil sejumlah volume tertentu dari pengenceran ini dan ditanam secara cawan tuang di atas medium yang sesuai. Jumlah mikroorganisme per 1 mL suspensi, dapat diperoleh dengan membagi jumlah koloni terhitung dengan volume suspensi yang diinokulasikan, dibagi dengan pengenceran yang digunakan. Perhitungan jumlah sel dilakukan secara duplo untuk mendapatkan data yang akurat.

Pada penelitian ini, suspensi sel khamir *Candida fukuyamaensis* diambil sebanyak 1 mL dan dituangkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL air steril. Tabung tersebut merupakan tabung yang berisi suspensi sel khamir dengan pengenceran 10^{-1} kali. Kemudian selanjutnya dari tabung tersebut, dilakukan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-5} kali. Dari tiap tabung hasil pengenceran

10^{-3} dan 10^{-5} suspensi sel khamir tersebut, diambil masing-masing sebanyak 1 mL dan 0,1 mL dan diinkubasi dalam cawan petri yang mengandung medium YMA selama 2 hari. Pengambilan volume suspensi 0,1 mL dari pengenceran 10^{-3} merupakan pengenceran 10^{-4} kali, sedangkan pengambilan volume suspensi 0,1 mL dari pengenceran 10^{-5} merupakan pengenceran suspensi sel 10^{-6} kali.

Perhitungan terhadap jumlah sel khamir dilakukan setelah 2 hari inkubasi. Diperoleh jumlah sel khamir dari perhitungan jumlah sel pada pengenceran 10^{-5} kali yaitu sebanyak 275 dan 261 (menjadi 268 setelah dirata-ratakan). Jumlah sel khamir yang dapat dihitung adalah yang mempunyai pertumbuhan koloni antara 30-300. Dengan adanya perhitungan jumlah koloni sel khamir tersebut, maka dapat diketahui jumlah sel yang terdapat dalam 1 mL suspensi khamir adalah sebanyak $2,68 \times 10^7$ sel. Berikut adalah gambar hasil inkubasi selama 2 hari untuk TPC.



Gambar 4.21 Hasil TPC pada pengenceran 10^{-5}

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Kondisi hidrolisis optimum untuk sampel serbuk kayu jati dan kayu melinjo secara kimiawi dengan asam pada penelitian ini adalah pada suhu 121 °C selama 60 menit, dan konsentrasi asam sebesar 0,3 M, dengan kadar xilosa yang dihasilkan sebesar 4,31% (w/w) untuk serbuk kayu jati yang tidak didelignifikasi; 3,18% (w/w) untuk serbuk kayu jati didelignifikasi; 5,18% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo yang tidak didelignifikasi; dan 4,26% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo didelignifikasi.
2. Kadar xilosa pada sampel serbuk kayu yang didelignifikasi lebih rendah daripada kadar xilosa pada sampel serbuk kayu yang tidak diberi perlakuan delignifikasi. Hal ini disebabkan karena adanya xilosa yang ikut larut saat proses delignifikasi dengan alkali.
3. Pemekatan hidrolisat dengan penguapan pada suhu 70 °C sebelum proses fermentasi, dapat meningkatkan kadar xilosa dalam hidrolisat. Kadar xilosa dalam hidrolisat setelah proses penguapan sampel adalah 5,4% (w/w) untuk serbuk kayu jati yang tidak didelignifikasi; 3,82% (w/w)

untuk serbuk kayu jati didelignifikasi; 6,16% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo yang tidak didelignifikasi; dan 5,3% (w/w) untuk serbuk kayu melinjo didelignifikasi.

4. Produk xilitol hasil fermentasi tertinggi didapatkan pada waktu fermentasi 36 jam, dengan persen konversi xilosa menjadi xilitol tertinggi, yaitu sebesar 6,16% untuk sampel serbuk kayu jati yang didetoksifikasi, dan 6,35% untuk sampel serbuk kayu melinjo yang didelignifikasi dan didetoksifikasi.
5. Persen *yield* xilitol tertinggi, untuk kedua jenis sampel serbuk kayu, terdapat pada substrat yang didetoksifikasi, yaitu sebesar 0,32% untuk sampel serbuk kayu jati, dan 0,47% untuk sampel serbuk kayu melinjo.
6. Fermentasi pada substrat yang mendapat perlakuan delignifikasi, detoksifikasi, dan juga kedua perlakuan (delignifikasi dan detoksifikasi), menghasilkan produk xilitol dengan persen konversi yang lebih tinggi daripada substrat yang tidak mendapat perlakuan tersebut (substrat kontrol).
7. Rendahnya kadar xilitol yang terbentuk disebabkan karena penggunaan xilitol sebagai sumber karbon oleh khamir dan terbentuknya produk samping yakni etanol pada proses metabolisme xilosa oleh khamir.
8. Limbah serbuk kayu jati dan kayu melinjo kurang baik digunakan sebagai substrat untuk produksi xilitol karena hanya dihasilkan xilitol dalam konsentrasi dan persen *yield* yang rendah.

5.2 SARAN

1. Untuk memproduksi xilitol dari bahan baku limbah serbuk kayu, dibutuhkan limbah serbuk kayu dalam jumlah yang besar, agar dapat menghasilkan xilitol dengan persen yield yang tinggi.
2. Untuk produksi xilitol dengan menggunakan limbah serbuk kayu sebagai bahan baku, masih perlu dilakukan penentuan kondisi hidrolisis optimum untuk mendapatkan kadar xilosa yang tinggi, yaitu terutama dengan memvariasikan berat substrat yang akan dihidrolisis dan juga lama waktu hidrolisis. Hal ini berkaitan dengan struktur dan komposisi kayu yang digunakan.
3. Perlu dilakukan seleksi beberapa jenis limbah serbuk kayu lainnya yang mempunyai kandungan hemiselulosa yang tinggi dan jumlahnya melimpah sehingga berpotensi untuk produksi xilitol.
4. Perlu dilakukan usaha-usaha untuk meningkatkan *yield* xilitol dan mengurangi produk hasil samping etanol yang terbentuk, misalnya dengan variasi penambahan kosubstrat lainnya (seperti glukosa dan arabinosa).

DAFTAR PUSTAKA

1. <http://www.indonesianforest.com/hutan.htm> 8 Januari 2009 Pukul 11.09.
2. Pari, G. 2002. Teknologi Alternatif Pemanfaatan Limbah Industri Pengolahan Kayu. *Makalah Falsafah Sains* (PPs 702), Institut Pertanian Bogor.
3. Zulnely dan D. Martono. 2003. Pemanfaatan Kulit Gemor (*Alseodaphne* sp) Sebagai Bahan Untuk Pembuatan Anti Nyamuk Bakar. *J. Ilmu & Teknologi Kayu Tropis* Vol. 1, No. 1: 12-19.
4. Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu, dasar-dasar dan penggunaan*, terjemahan dari *Wood chemistry, fundamentals and applications*, oleh Sastrohamidjoyo, H. Gajah Mada University Press, Yogyakarta: viii + 390 halaman.
5. Saha, C. B. 2003. Hemicellulose Biocoverison. *J Ind, Microbial Biotech*, (30): 279-291.
6. Granstrom, T.B., Ken I. & Matti L. 2007. A Rare Sugar Xylitol. Part I: The Biochemistry and Biosynthesis of Xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74: 227-281.
7. Granstrom, T.B., Ken I. & Matti L. 2007. A Rare Sugar Xylitol. Part II: Biotechnological Production and Future Applications of Xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74: 273-276.
8. Nurmalia. 2007. *Studi Optimasi Hidrolisis Kimiawi Ampas Tebu untuk Menghasilkan D-Xilosa sebagai Bahan Pembuatan Xylitol*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.

9. Putri, N.E. 2008. *Produksi Xilitol Dari Hidrolisat Tongkol Jagung Oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reductase (XR)*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
10. Kiet, L. A., Peter, M., Marilyn, R. 2006. *Xylitol, Sweeteners, and Dental Caries*. *Pediatric Dentistry*. (28):154-163.
11. <http://www.xilitol.org/drmakinen.htm> 3 Januari 2009 Pkl. 11.00.
12. <http://www.confectionerynews.com/news/ng.asp?id=82727-futaste-xylitol-danisco> 8 Maret 2009 pkl 10.53.
13. Sellman, S. *Xylitol – Our Sweet Salvation?* 9 halaman. <http://www.laleva.cc/food/xylitol.html>. 11 Januari 2009, pukul 10.50.
14. "Xylitol." 3 halaman. <http://en.wikipedia.org/wiki/Xylitol>. 29 Januari 2009, pukul 14.33.
15. Granstrom, T.B. 2002. *Biotechnological Production of Xylose with Candida yeast*. *Technical Biochemistry Report*.
16. Ingraham, J. L. & C.A. Ingraham. 2000. *Introduction of Microbiology 2nd Ed*. Brooks/Cole – Thomson learning. California. USA.
17. Salohemo, A., Jenita R., Oleh V.S., Andrei A.S., Merja P. & Laura R. 2007. *Xylose Transport Studies with Xylose Utilizing Saccharomyces cerevisiae strains expressing Heterologous and Homologous Permeases*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74: 1041-1052.
18. Nelson, D. L. & Michael M. C. 1999. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publisher. USA.

19. Bruinberg, P. M., Peter H.M., Johannes P. & Alexander S. 1984. NADH – linked *Aldose Reductase*: The Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 19: 256-260.
20. Karhuman, Kaisa, Romain F. & Marie F. 2007. High Activity of Xylose *Reductase* and *Xylitol Dehydrogenase* Improves Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 1039 – 1046 .
21. Onishi, H. & Suzuki T. 1969. Microbial Production of Xylitol from Glucose. *Appl Microbiol.* 72:1031 – 1035.
22. Girio, F, Amalia P. & Amarai M.T. 1989. Enzymatic and Physiological Study of D – Xylose Metabolism by *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32: 199 – 204.
23. Kim, S. Y. & Kim S.Y. 1998. Increase of Xylitol yield by Feeding Xylose and Glucose in *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 419 – 425.
24. Kastner, James R., Mark A. E. & Sarah A.L. 2001. Glucose Repression of Xylitol Production in *Candida tropicalis* Mixed Sugar Fermentation. *Biotechnol letters.* 23: 1663 – 1667.
25. Kim, S. Y., Oh D.K. & Kim D.H. 1999. Evaluation of Xylitol Production from Corn Cob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida parapsilosis*. *Biotechnol letters.* 21: 891 – 895.
26. Mayerhoff, Z. D. V. L., Inez C. R. & Silvio S. S. 1997. Xylitol Production from Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate Using Different Yeast Strain. *Biotechnol letters.* 19 : 407 – 409.

27. Carvalho, W., Santos J. C., Canilha J., Silva S.S., Perego P. & Converti A. 2005. Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Metabolic Behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Calcium alginate. *Biochem Engineering*. 25: 25 – 31.
28. Canilha, L., Carvalho W. & Silva J.B. 2005. Influence of Medium Composition in Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *World J. Microbiol Biotechnol*. 21: 1087 – 1093.
29. Villareal, M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A. & Silva J.B. 2005. Detoxification procedure of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006) 17-24.
30. Dominguez, Jose M., dkk. 1997. Dilute Acid Hemicellulose Hydrolysates from Corn Cobs for Xylitol Production by Yeast. *Bioresource Technology*. (61): 85-90.
31. Ko, B.S., Kim J. & Kim J.H. 2006. Production of Xylitol from D – xylose by a *Xylitol Dehydrogenase* Gene – Disrupted Mutant of *Candida tropicalis*. *Appl and Environment Microbiol*. 72: 4207 – 4213.
32. “Safety data for d-(+)-xylose.” [http://www.psychem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-\(+\)-xylose.html](http://www.psychem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-(+)-xylose.html). 28 Januari 2009, pukul 14.50.
33. Denmark’s Technical University. 2007. Ethanol Potential for Empty Fruit Bunches Pre-treated by Wet-Explosion. *Bio Centrum-DTU*. hlm.5.
34. Palonen, H. 2004. Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. *VTT Biotechnology*. Espoo.

35. Irwanto. 2006. Usaha Pengembangan Jati (*Tectona grandis* L.f).
<http://www.irwantoshut.com/Jati.htm>. 14 Januari 2009, pukul 14.33.
36. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=TEGR>. 16 Januari 2009, pukul 11.46.
37. “Teak/ Jati (*Tectona Grandis*)”.
http://www.dephut.go.id/INFORMASI/RRL/IFSP/Tectona_grandis.pdf.
14 Januari 2009, pukul 14.51
38. Rachmawati, H., Djoko I, Christian P. Hansen, IFSP. 2002. *Tectona grandis* Linn. F. Informasi Singkat Benih, No.15, Direktorat Perbenihan Tanaman Hutan.
39. “Melinjo”. <http://www.wikipedia.org/wiki/Melinjo>. 17 April 2009, pukul 14.39.
40. Aditya, A. 2004. *Studi Pendahuluan Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisis Sekam Padi (*Oryza sativa* L.) dengan Menggunakan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viridae* untuk Menghasilkan D-Xilosa sebagai Bahan Dasar Xilitol*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
41. Pessoa, JR. A., Mancilha, I. M., Sato, S. 1997. Acid Hydrolysis Of Hemicellulose from Sugarcane Bagasse. *Braz. J. Chem. Eng.* 14 (3)
42. Xiang, Q., Yong, Y. L., Robert, W. T. 2004. Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *App. Biochem. Biotech.* 113-116.

43. Setiasih, Siswati dan Endang Saepudin. 2005. *Handout Kuliah: Bioteknologi*. Depok: Kimia UI
44. Ingraham, J. L. & C.A. Ingraham. 2000. *Introduction of Microbiology 2nd Ed.* Brooks/Cole – Thomson learning. California. USA.
45. Pelczar, M. Chan, E, C, S. 1986. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
46. Riki. 2008. *Seleksi Berbagai Spesies Khamir Untuk Menghasilkan Xilitol Menggunakan Bahan Dasar D – Xilosa*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
47. ["Candida \(Genus\)." http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_\(genus\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_(genus)). 28 Januari 2009, pukul 14.24.
48. Wijanarko, A., Witono, J. A., Wiguna, M. S. 2006. Tinjauan Komprehensif Perancangan Awal Pabrik Furfural Berbasis Ampas Tebu di Indonesia. *J. Indo. Oil. Gas. Community. Komunitas Migas Indonesia*. 1-10.
49. Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia
50. Sun, R.C., Tomkinson, J. 2000. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydrate Polymers* 42 : 111-122.
51. www.Food-info.net/uk/color/Maillard.htm 5 Mei 2009 pkl 10.00
52. Sampaio, C. Fabio, Mantovani C. Hilario. 2005. Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. *Process Biochemistry* 40: 3600-3606.

LAMPIRAN 1

Diagram Kerja Secara Umum

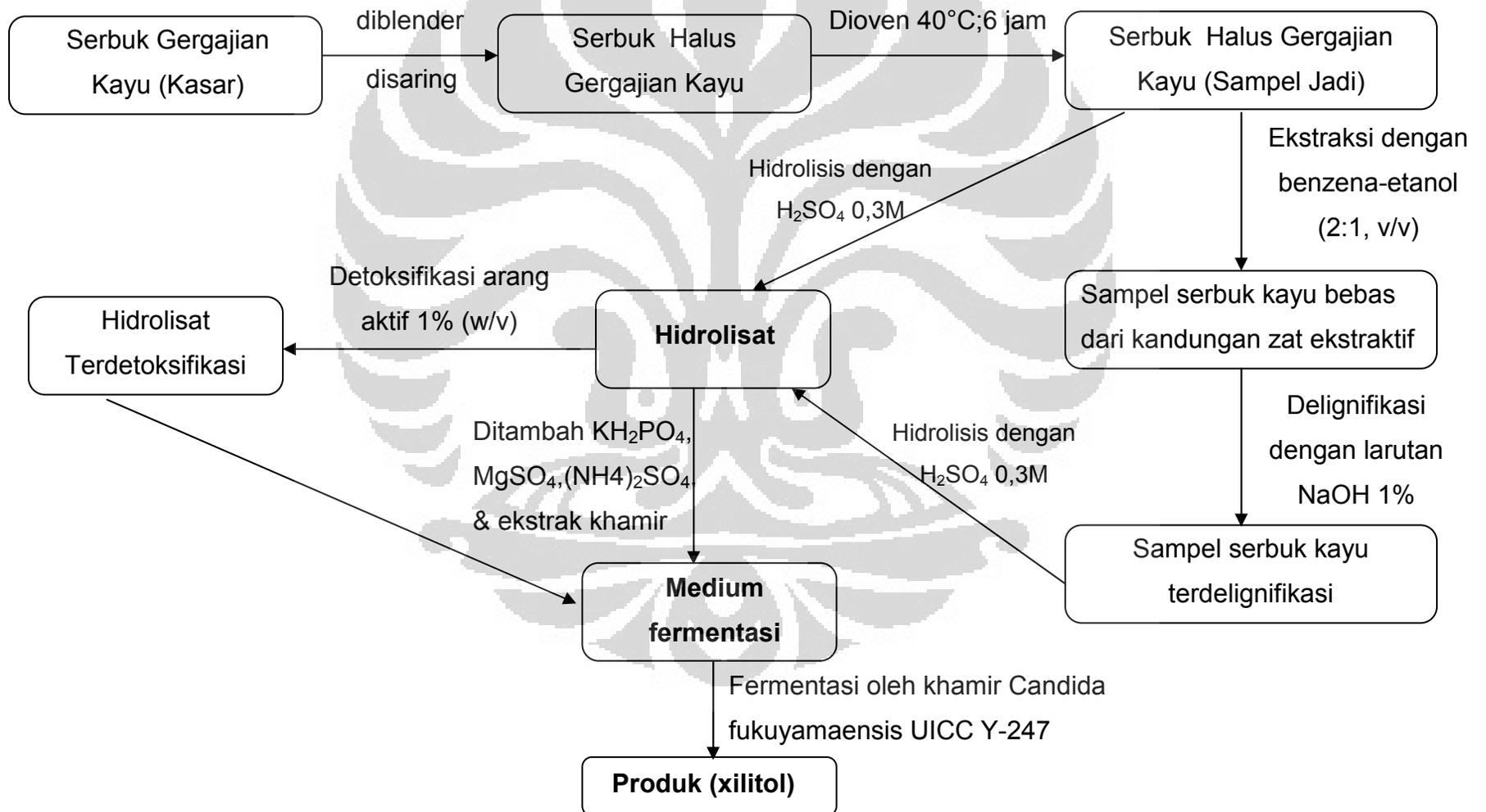
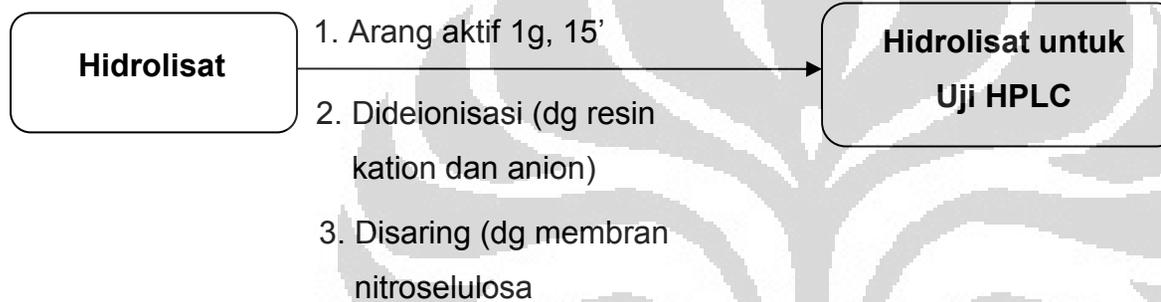
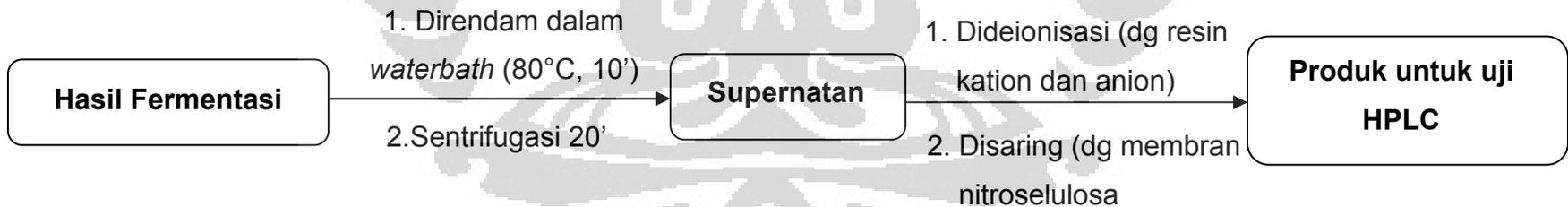


Diagram Kerja Persiapan Analisis Kimia Sampel

1. Pengujian Kadar Xilosa Dalam Sampel



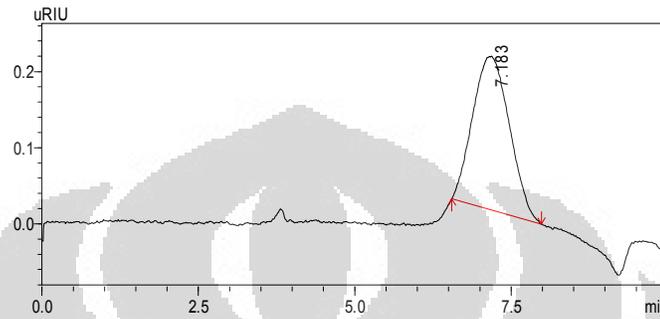
2. Pengujian Produk Hasil Fermentasi



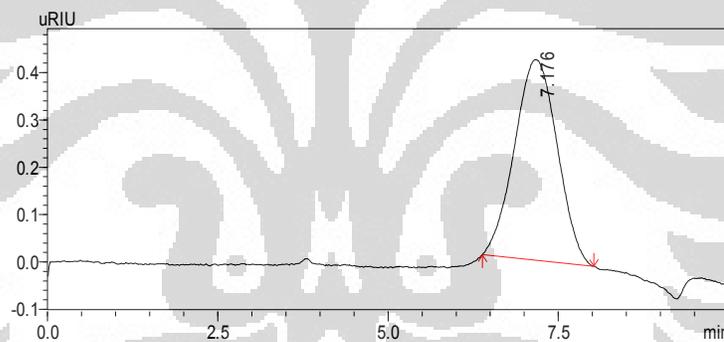
LAMPIRAN 2

Kromatogram dan Kurva Standar Xilosa

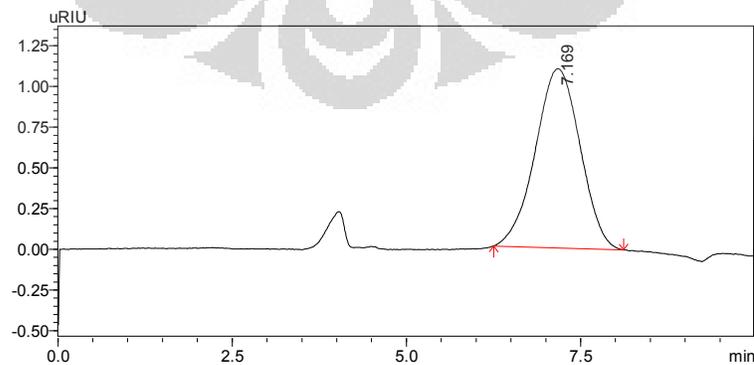
50 ppm



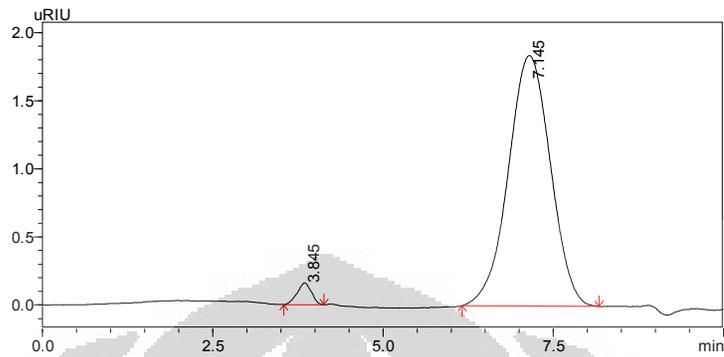
100 ppm



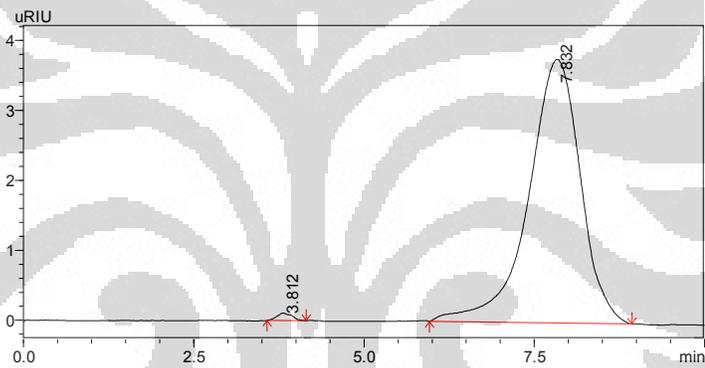
250 ppm



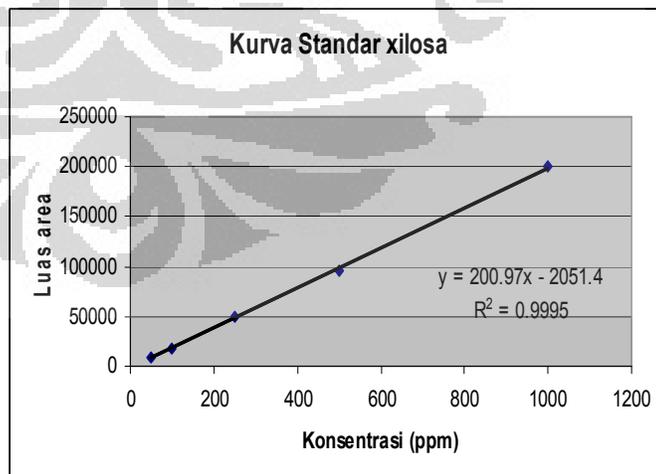
500 ppm



1000 ppm



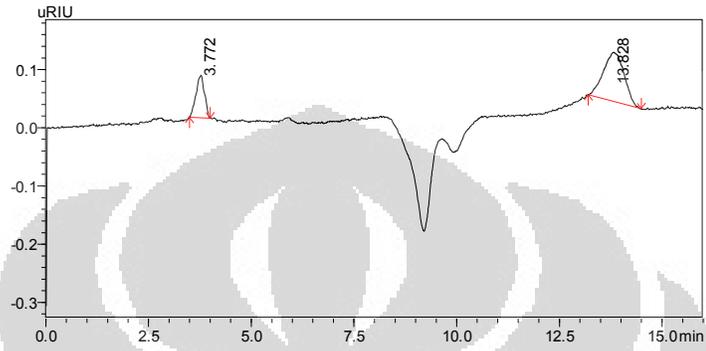
Konsentrasi (ppm)	Luas area
50	8238
100	18547
250	49216
500	95536
1000	200049



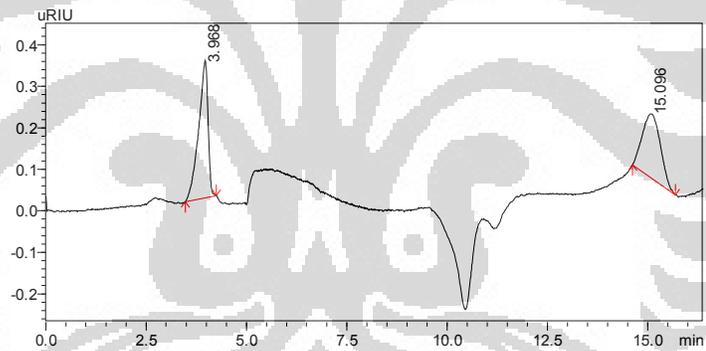
LAMPIRAN 3

Kromatogram dan Kurva Standar Xilitol

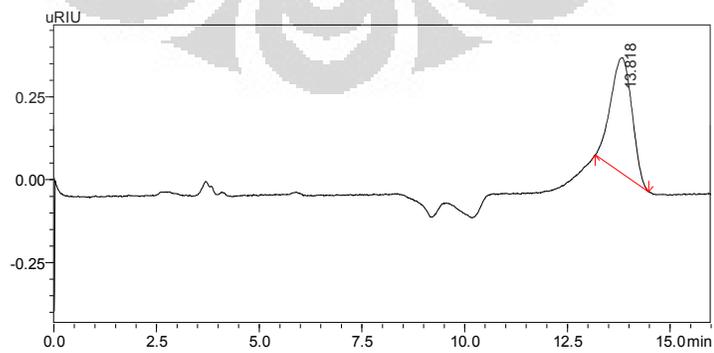
25 ppm



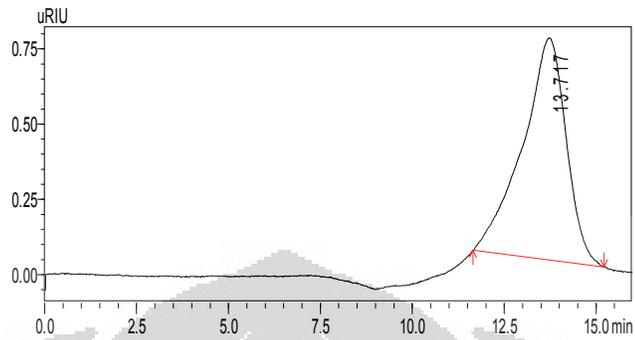
50 ppm



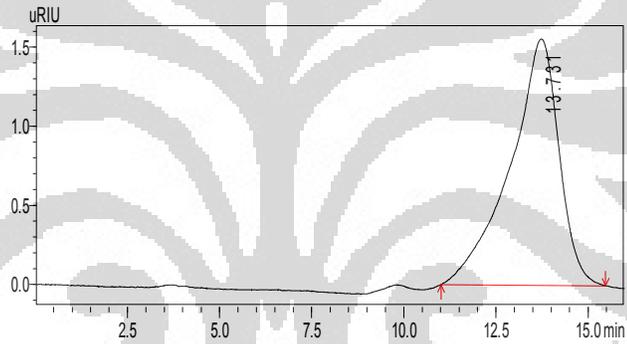
100 ppm



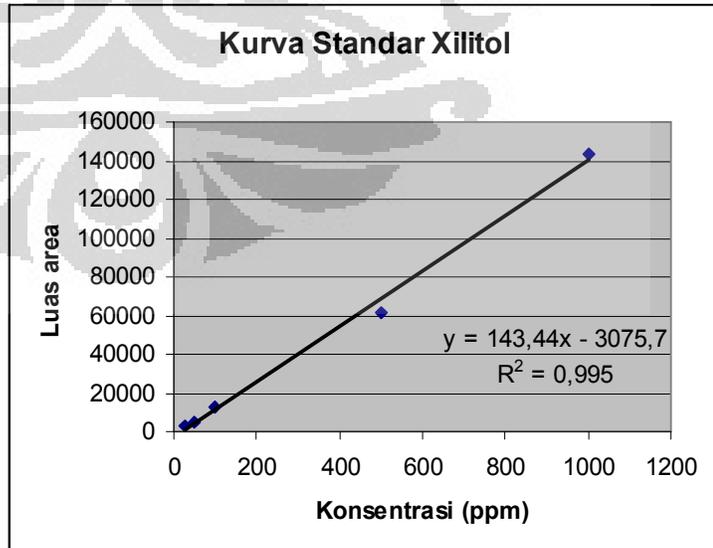
500 ppm



1000 ppm



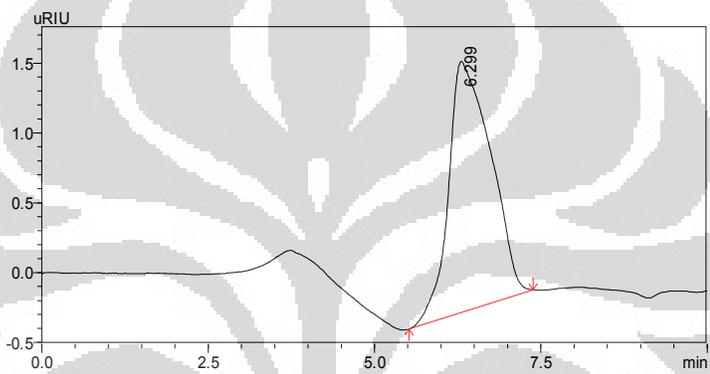
Konsentrasi (ppm)	Luas area
25	2509
50	4803
100	12471
500	61238
1000	143860



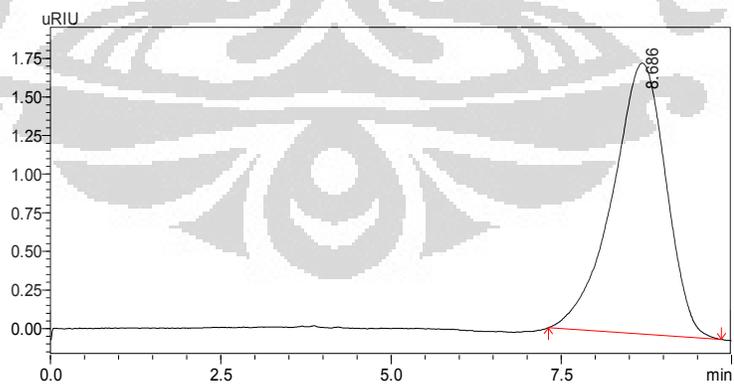
LAMPIRAN 4

Kromatogram Standar Glukosa dan Arabinosa

Kromatogram Standar Glukosa 500 ppm



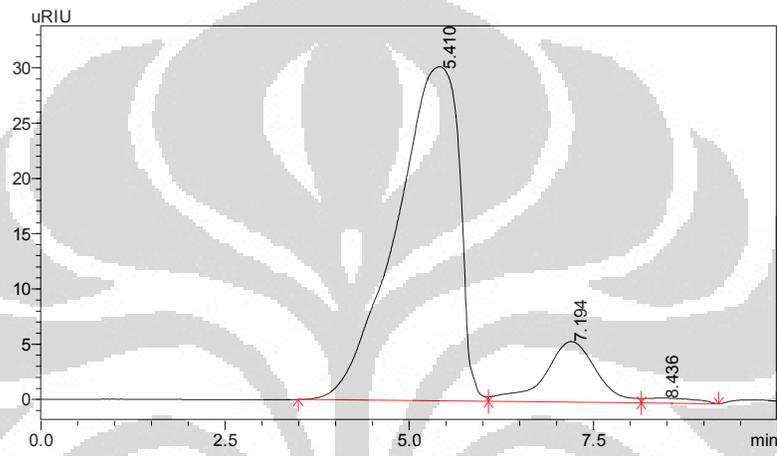
Kromatogram Standar Arabinosa 500 ppm



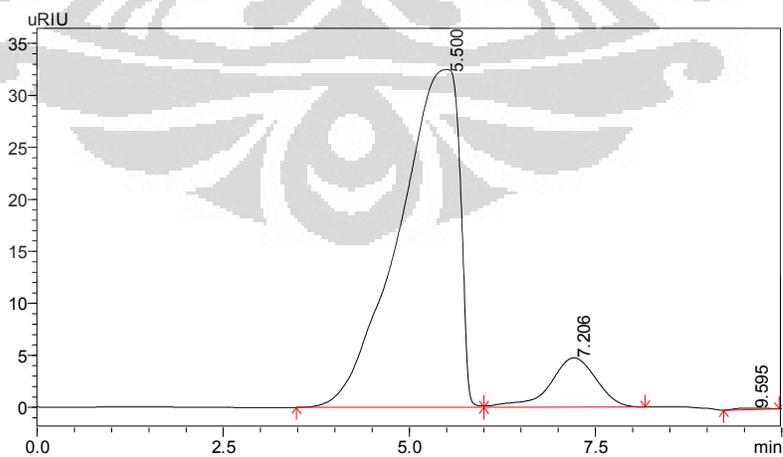
LAMPIRAN 5

Kromatogram hidrolisat sampel serbuk kayu pada
kondisi hidrolisis optimum (121 °C, 60')

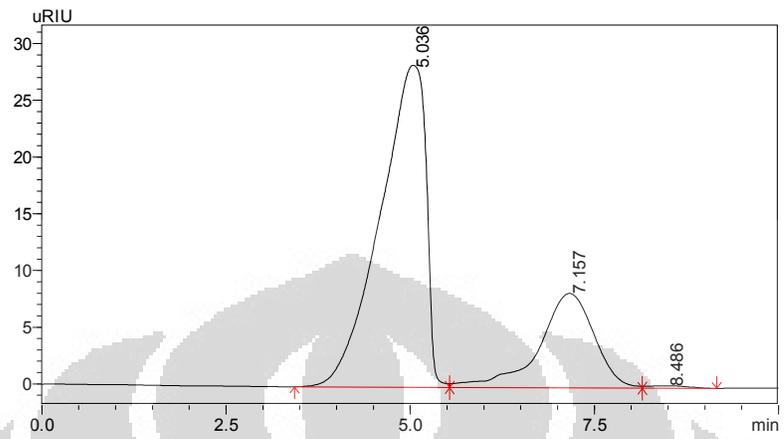
Jati untreated



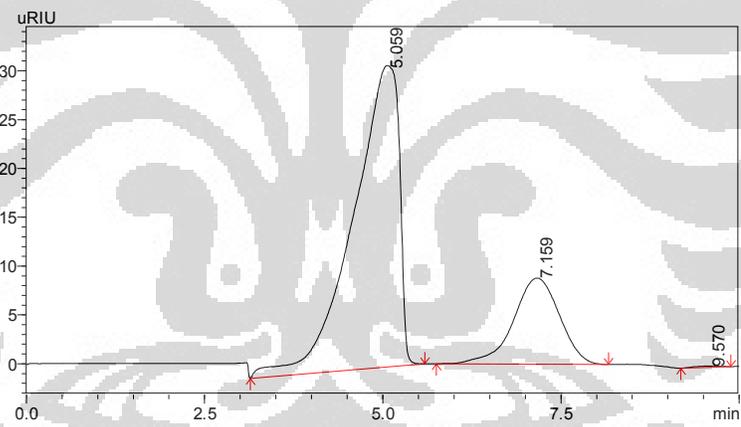
Jati delignifikasi



Melinjo untreat



Melinjo delignifikasi



LAMPIRAN 6

Data hasil perhitungan kadar xilosa pada hidrolisat

1. Hidrolisis pada suhu 121 °C selama 25 menit

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	53879	278,3	0,2783	$2,783 \times 10^{-4}$	$8,35 \times 10^{-3}$	0,84
Jati delignifikasi	31631	167,6	0,1676	$1,676 \times 10^{-4}$	$5,03 \times 10^{-3}$	0,5
Melinjo untreat	98032	498	0,498	$4,98 \times 10^{-4}$	$14,94 \times 10^{-3}$	1,49
Melinjo delignifikasi	75985	388,3	0,3883	$3,883 \times 10^{-4}$	$11,65 \times 10^{-3}$	1,17

2. Hidrolisis pada suhu 126 °C selama 20 menit

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	122289	618,7	0,6187	$6,19 \times 10^{-4}$	0,0186	1,86
Jati delignifikasi	111919	567,1	0,5671	$5,67 \times 10^{-4}$	0,0170	1,7
Melinjo untreat	173938	875,7	0,8757	$8,76 \times 10^{-4}$	0,0263	2,63
Melinjo delignifikasi	143029	721,9	0,7219	$7,22 \times 10^{-4}$	0,0217	2,17

3. Hidrolisis pada suhu 121 °C selama 45 menit

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	93731	476,6	0,477	$4,77 \times 10^{-4}$	0,0143	1,43
Jati delignifikasi	85752	436,9	0,437	$4,37 \times 10^{-4}$	0,0131	1,31
Melinjo untreat	157539	794,1	0,794	$7,94 \times 10^{-4}$	0,0238	2,38
Melinjo delignifikasi	134689	680,4	0,680	$6,8 \times 10^{-4}$	0,0204	2,04

4. Hidrolisis pada suhu 126 °C selama 45 menit

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	89691	456,5	0,457	4,57	0,0137	1,37
Jati delignifikasi	79743	407	0,407	4,07	0,122	1,22
Melinjo untreat	92907	472,5	0,473	4,73	0,142	1,42
Melinjo delignifikasi	74156	379,2	0,379	3,79	0,114	1,14

5. Hidrolisis pada suhu 121 °C selama 60 menit

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	286783	1437,2	1,4372	$1,4372 \times 10^{-3}$	0,0431	4,31
Jati delignifikasi	210917	1059,7	1,0597	$1,0597 \times 10^{-3}$	0,0318	3,18
Melinjo untreat	344964	1726,7	1,7267	$1,7267 \times 10^{-3}$	0,0518	5,18
Melinjo delignifikasi	283145	1419,1	1,4191	$1,4191 \times 10^{-3}$	0,0426	4,26

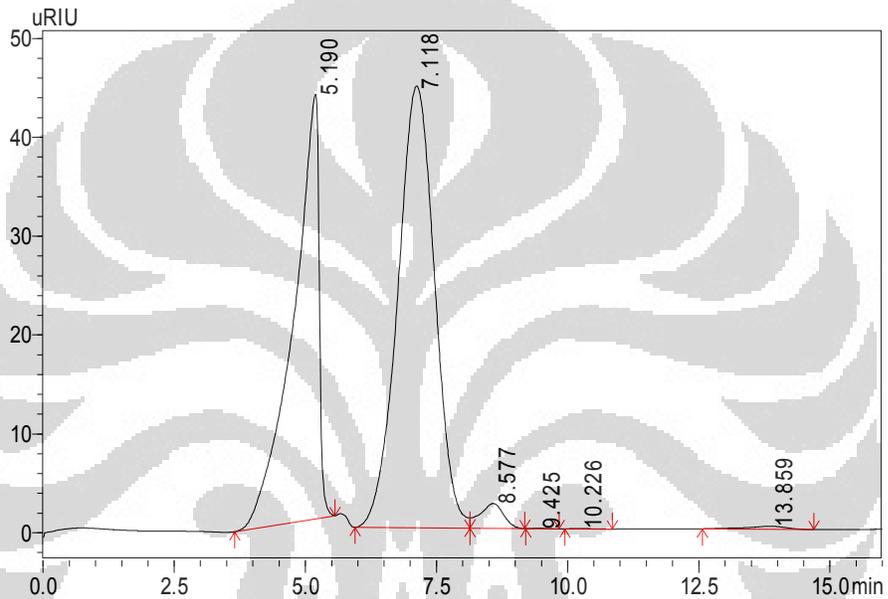
6. Kadar xilosa pada hidrolisat untuk kondisi hidrolisis pada suhu 121 °C selama 60 menit sesudah penguapan

Bentuk Substrat	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/mL)	Xilosa (g/30 mL)	% Yield (w/w)
Jati untreat	361182	1807,4	1,8074	$1,8074 \times 10^{-3}$	0,0542	5,42
Jati delignifikasi	253542	1271,8	1,2718	$1,2718 \times 10^{-3}$	0,0382	3,82
Melinjo untreat	410399	2052,3	2,0523	$2,0523 \times 10^{-3}$	0,0616	6,16
Melinjo delignifikasi	354188	1772,6	1,7726	$1,7726 \times 10^{-3}$	0,0532	5,32

LAMPIRAN 7

Kromatogram dan Tabel Data Hasil Fermentasi Kontrol Xilosa

1. Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni pada waktu optimum (jam ke-36)



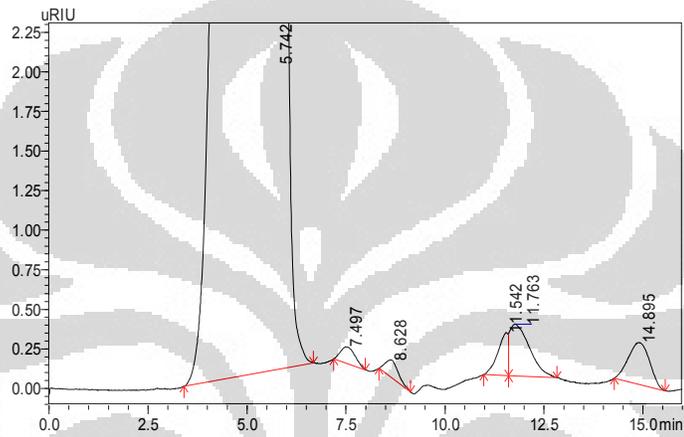
2. Tabel data hasil fermentasi xilosa murni

Waktu	Xilosa Sisa		Xilitol		% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Luas Area	Kadar Xilitol (ppm)	
0	600860	3000	0	0	0
12	347636	1740	5316	58,5	1,92
24	225045	1130	75486	547,7	18,02
36	9243	56,2	90791	654,4	21,53
48	0	0	33286	253,5	8,34
60	0	0	16131	133,9	4,40
72	0	0	7152	71,3	2,34

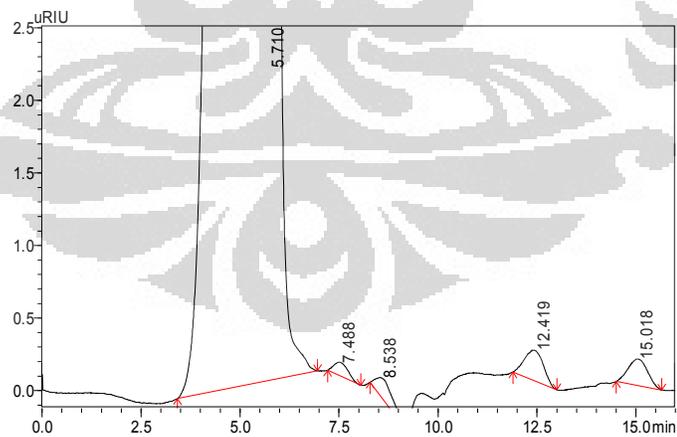
LAMPIRAN 8

Kromatogram Hasil Fermentasi Substrat pada Waktu Optimum (36 jam)

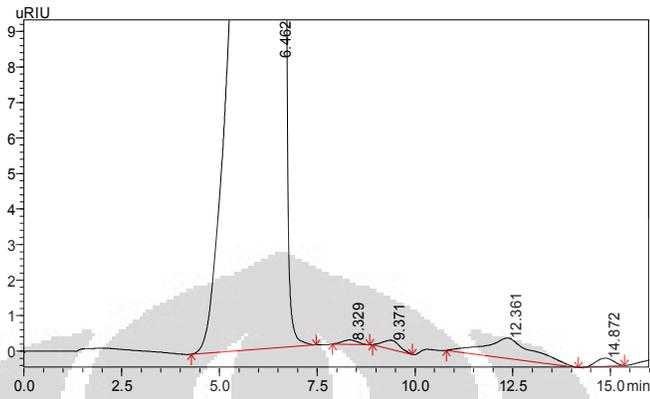
1. Jati untreat



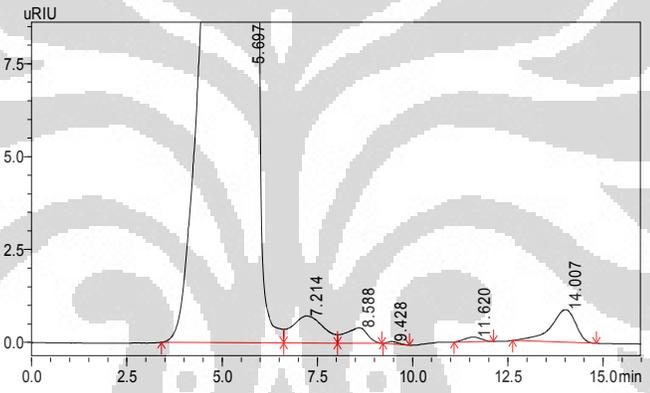
2. Jati untreat + detoksifikasi



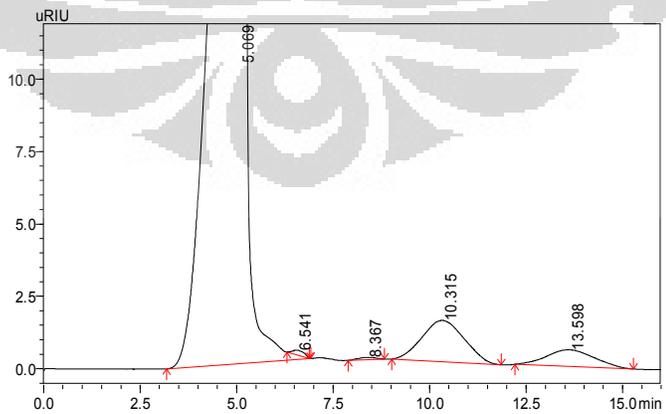
3. Jati delignifikasi



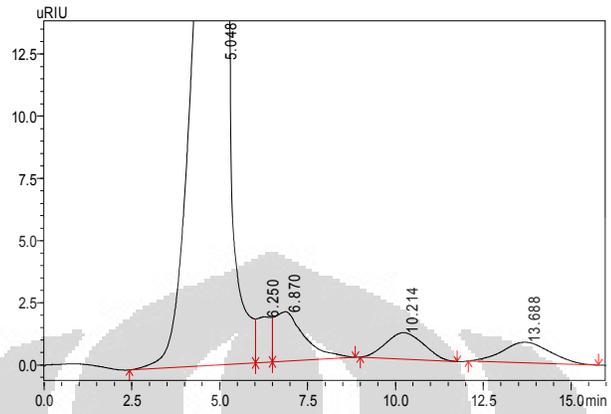
4. Jati delignifikasi + detoksifikasi



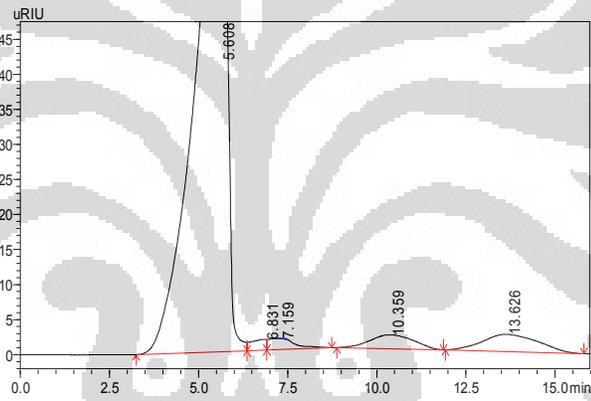
5. Melinjo untreat



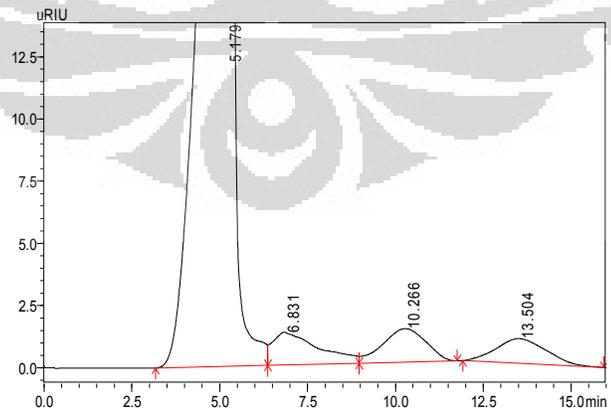
6. Melinjo untreat + detoksifikasi



7. Melinjo delignifikasi



8. Melinjo delignifikasi + detoksifikasi



LAMPIRAN 9

Data Perhitungan Hasil Fermentasi Substrat

1. Jati kontrol

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	77,7	0,2331	4,631130735
36	9461	87,4	0,2622	5,209277043
48	4082	49,9	0,1497	2,974175337
60	3049	42,7	0,1281	2,545035809

2. Jati detoksifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	98,5	0,2955	5,692930825
36	9461	106,5	0,3195	6,155300841
48	4082	72,9	0,2187	4,213346773
60	3049	52,4	0,1572	3,028523606

3. Jati delignifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	66,3	0,1989	5,144288366
36	9461	73,6	0,2208	5,710703223
48	4082	47,23	0,14169	3,664626539
60	3049	30,9	0,0927	2,397564261

4. Jati delignifikasi + detoksifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	69,4	0,2082	5,498963596
36	9461	76,7	0,2301	6,077384839
48	4082	57,7	0,1731	4,571904892
60	3049	30,8	0,0924	2,44046223

5. Melinjo kontrol

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	122,4	0,3672	4,292905203
36	9461	132,6	0,3978	4,650647303
48	4082	77,5	0,2325	2,718138507
60	3049	70,7	0,2121	2,479643773

6. Melinjo detoksifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	143,6	0,4308	4,807576419
36	9461	155,3	0,4659	5,199280069
48	4082	129,4	0,3882	4,332175408
60	3049	84,7	0,2541	2,835666593

7. Melinjo delignifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	110,2	0,3306	4,772562702
36	9461	118,6	0,3558	5,13635151
48	4082	89,6	0,2688	3,880413957
60	3049	61,6	0,1848	2,667784595

8. Melinjo delignifikasi + detoksifikasi

Waktu	Xilitol		% yield dalam 1 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)		
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	8070	125,5	0,3765	5,708759557
36	9461	139,6	0,4188	6,350142105
48	4082	95,6	0,2868	4,348664651
60	3049	68,4	0,2052	3,111387679

LAMPIRAN 10

Contoh Cara Perhitungan

1. Xilosa

Persamaan regresi linier dari grafik std xilosa $y = 200,97x - 2051,4$; $y =$ luas area dan $x =$ konsentrasi xilosa (ppm)

Misal pada sampel serbuk kayu jati kontrol \Rightarrow Luas area (y) = 286783, maka

konsentrasi xilosa (x) = $(286783 + 2051,4) / 200,97 = 1437,2$ ppm

$1437,2$ ppm = $1,4372 \times 10^{-3}$ g/mL = $1,4372$ g/L

Karena volume larutan 30 mL, maka dalam 30 mL larutan terdapat:

$1,4372 \times 10^{-3}$ g/mL \times 30 mL = $0,0431$ g

Sehingga % kadar xilosa dalam 1 g tongkol jagung = $(0,0431 \text{ g} / 1 \text{ g}) \times 100 \% = 4,31\%$ (w/w)

2. Xilitol

Persamaan regresi linier dari grafik std xilitol $y = 143,44x - 3075,7$; $y =$ luas area dan $x =$ konsentrasi xilitol (ppm)

Misal pada sampel serbuk kayu jati kontrol \Rightarrow Luas area (y) = 8070, maka

konsentrasi xilitol (x) = $(8070 + 3075,7) / 143,44 = 77,7$ ppm = $0,0777$ g/L =

$7,77 \times 10^{-5}$ g/mL

Karena volume larutan 30 mL, maka dalam 30 mL larutan terdapat:

$7,77 \times 10^{-5}$ g/mL \times 30 mL = $2,331 \times 10^{-3}$ g

Sehingga % yield xilitol dari 1 g sampel serbuk kayu = $(2,331 \times 10^{-3} / 1 \text{ g}) \times 100 \% = 0,23\%$ (w/w)

Konsentrasi awal xilosa dalam hidrolisat = $1655,73$ ppm = $1,656$ g/L

Xilitol $0,0777$ g/L = $5,112 \times 10^{-4}$ mol/L

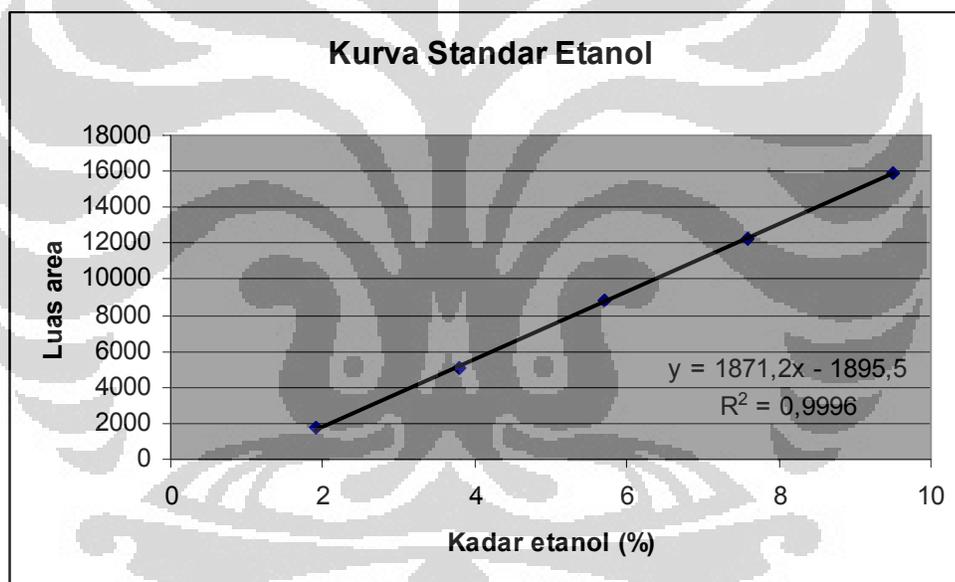
Xilosa $1,656$ g/L = $0,011$ mol/L

Persen konversi xilosa menjadi xilitol = $(5,112 \times 10^{-4} \text{ mol/L} / 0,011 \text{ mol/L}) \times 100 \% = 4,63\%$

LAMPIRAN 11

Kurva Standar Etanol dan Data Kadar Etanol
dalam Substrat Jati Kontrol

Kadar etanol %	Luas Area
1,9	1740
3,8	5064
5,7	8871
7,6	12257
9,5	15920



Data kadar etanol dalam substrat jati kontrol

waktu	luas area	kadar etanol (%)	kadar etanol (ppm)
12	0	0	0
24	0	0	0
36	3067	2,652041471	21480,52
48	4525	3,431220607	27792,21
60	9634	6,161554083	49909,09