

**PEMANFAATAN *POLLARD* (LIMBAH PENGGILINGAN
GANDUM) UNTUK PRODUKSI PEMANIS XILITOL**

RIYANTI TERESA NOVITAWATI

0606069294



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

2009

**PEMANFAATAN *POLLARD* (LIMBAH PENGGILINGAN
GANDUM) UNTUK PRODUKSI PEMANIS XILITOL**

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

Oleh:

RIYANTI TERESA NOVITAWATI

0606069294



DEPOK

2009

SKRIPSI : PEMANFAATAN *POLLARD* (LIMBAH
PENGGILINGAN GANDUM) UNTUK
PRODUKSI PEMANIS XILITOL

NAMA : RIYANTI TERESA NOVITAWATI

NPM : 0606069294

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 6 Januari 2010

Dr. Endang Saepudin
PEMBIMBING I

Dra. Sri Handayani, M. BioMed.
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana : 6 Januari 2010

Penguji I : Prof. Dr. Sumi Hudiyono PWS.....

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

Penguji III : Dr. Herry Cahyana

BETTER TOGETHER

Love is the answer

At least for most of the questions in my heart

Why are we here and where do we go

And how come it's so hard

It's not always easy and sometimes life can be deceiving

I'll tell you one thing

It's always better when we're together

We'll look at the stars when we're together

And all of these moments just might find a way into my dreams tonight

But I know that they'll be gone when the morning light sings

Or brings new things for tomorrow night you see

That they'll be gone too, too many things I have to do

But if all of these dreams might find their way into my day to day scene

I'd be under the impression I was somewhere in between

With only two, just me and you, not so many things we got to do

Or places we got to be, we'll sit beneath the mango tree now

It's always better when we're together

We're somewhere in between together

(Jack Johnson)

Skripsi ini ku persembahkan untuk: Yesus Kristus, Papa, Mama, Rio, Om Adi, dan semua orang yang kusayangi. Terima kasih atas segala kasih, dukungan doa, semangat, dan pengorbanan yang begitu besar dari kalian. God Bless You All.

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena atas berkat, rahmat, dan perlindungan-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Pemanfaatan *Pollard* (Limbah Penggilingan Gandum) untuk Produksi Pemanis Xilitol”, 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 sebesar-besarnya kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing skripsi I dan Dra. Sri Handayani, M. BioMed. selaku pembimbing skripsi II, atas bimbingan, arahan, diskusi, dan bantuan pemikiran yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan, penelitian, hingga tersusunnya skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI, Dra. Tresye Utari, M. Si. selaku koordinator penelitian dan pembimbing akademis, Ibu Susilowati yang telah memberikan ilmu Mikrobiologi yang sangat berharga, kepada seluruh dosen Departemen Kimia FMIPA UI atas ilmu dan pengajaran yang telah diberikan, serta kepada Pak Hedi S., Mbak Ema, Mbak Tri, Mbak Cucu, Mbak Ina, Pak Amin, Pak Kiri, Babeh perpus, Pak Marji, Pak Hadi, dan seluruh staf Departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

Rasa terima kasih yang begitu dalam juga penulis sampaikan kepada orang-orang tercinta yang sangat berarti bagi penulis, yaitu kepada:

1. Ibu Maria Yosi Likumahwa selaku manajer Departemen *Product Development* PT. ISM, Tbk – Bogasari Flour Mills, terima kasih atas bantuannya dalam penyediaan *pollard* gandum yang penulis butuhkan sebagai bahan utama dalam penelitian ini.
2. Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UI, khususnya kepada Ibu Ariyanti Oetari, terima kasih atas bantuannya dalam pengadaan bahan-bahan penelitian.
3. Kedua orang tua yang telah berkorban sangat besar dalam segala hal, yang telah mengajarkan kepada penulis mengenai kesabaran dan semangat hidup, dan yang telah banyak membantu penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi ini baik secara moril maupun materiil.
4. Adikku tersayang – Mario Giovanni – yang telah mendorong dan memberikan semangat kepada penulis, serta kepada seluruh keluarga besar penulis yang terus mendoakan dan mendukung penulis untuk terus berjuang.
5. Sara Ayu Sekarini, Vania Viandra, Tantri Kuswantiningsih, dan Tanti Maryana F., yang telah dengan setia mendampingi penulis dalam segala hal, baik suka maupun duka, memberikan dukungan dan semangat. Terima kasih karena telah memberikan warna-warni dalam kehidupan penulis, dan canda tawa serta persahabatan yang indah selama masa kuliah.

6. Daniel Jeffry Pasaribu, Hadi Septian Gotama, Andreas, Anthony, Bali Susilo, Bimo, Merry, Diana Ayu Nindita, dan Mika Rinawati, terima kasih atas bantuan dukungan, doa, serta penghiburannya selama penelitian dan telah memberikan kenangan manis di akhir masa perkuliahan penulis.
7. Wulan Sari, Febri, Mbak Tatu, Mbak Afifah, Mbak Suri, Dewi, Meli, serta seluruh teman-teman kos Griya Tiara Indah, terima kasih atas dukungan semangat dan doanya selama ini.
8. Kak Ria Fatmawati, kak Cicilia Aristya, dan kak Purnama Laurentina yang telah begitu baik dan sabar menjawab pertanyaan-pertanyaan yang penulis ajukan dan yang dengan setia mendengar keluh kesah penulis mengenai penelitian penulis selama ini. Terima kasih atas arahan dan diskusi selama penelitian.
9. Teman-teman penelitian di lantai 4 (Ardie, kak Meta, kak Feri, kak Atyka, kak Syarif), teman-teman penelitian di lantai 3 (kak Retno, kak Dian, kak Widya, kak Ersi, kak Camelia, kak Sepit, kak Hany, kak Camelia, kak Iman, kak Emil, kak Neny, kak Ani, kak Vira), dan teman-teman penelitian di lantai 1 (Egi, kak Wuri, kak Eli, dan kak Agus) serta teman-teman 2006 lainnya, terima kasih atas dukungannya selama penelitian.
10. Tim Laboratorium Afiliasi, terima kasih atas bantuannya dalam penggunaan alat instrumen – khususnya HPLC dan GC – selama penelitian.

11. Teman-teman angkatan 2005, 2007, 2008, dan 2009, atas dukungannya selama ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan belum sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat terbuka untuk kritik dan saran yang akan membantu dalam perbaikan. Penulis juga berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Depok, Desember 2009

Penulis



ABSTRAK

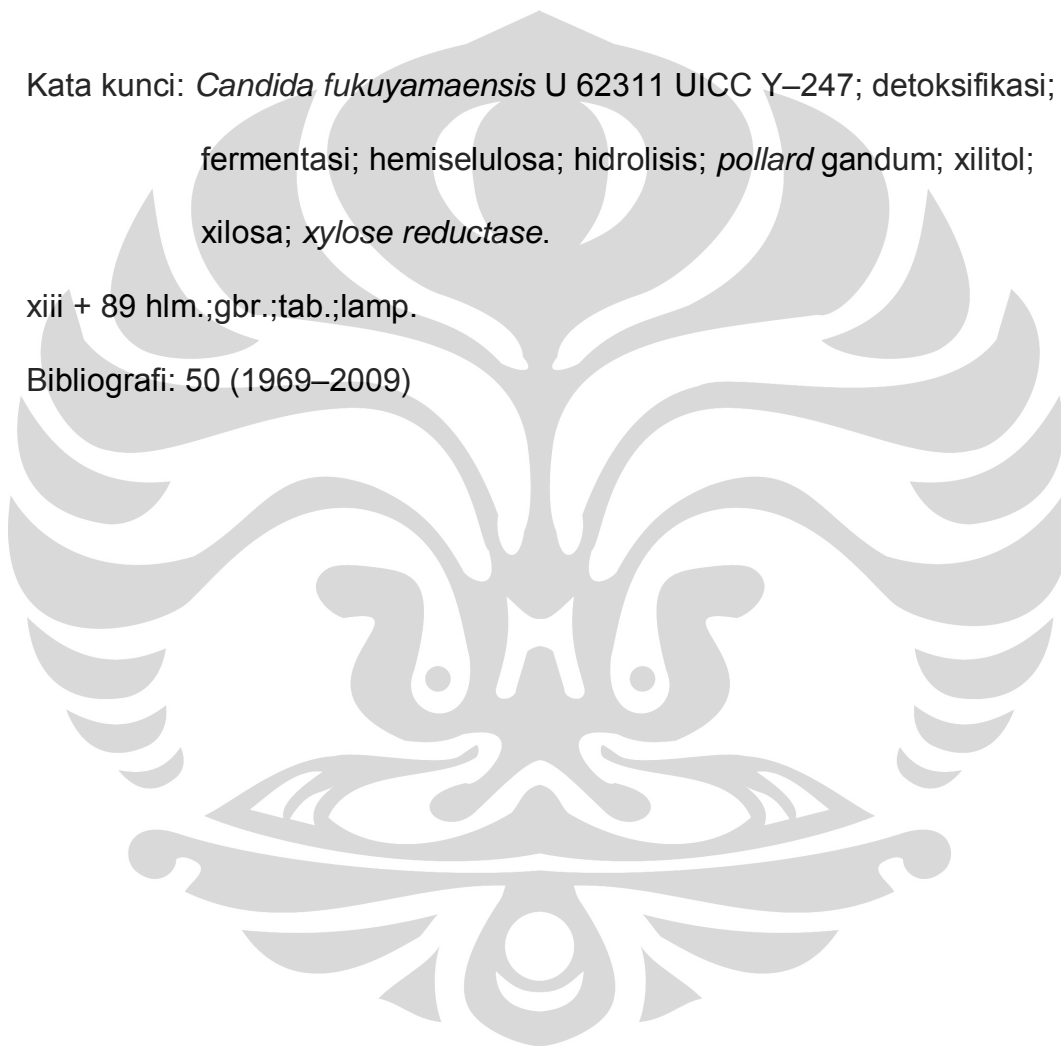
Gandum merupakan salah satu hasil pertanian yang dihasilkan di Indonesia dan banyak dimanfaatkan lebih lanjut menjadi bahan pangan. Pada umumnya, hasil samping dari penggilingan biji gandum adalah *pollard* dan *bran*. *Pollard* merupakan bagian yang paling dekat dengan endosperma biji gandum dan banyak digunakan sebagai bahan baku pembuatan pakan ternak. Di dalam *pollard* terkandung hemiselulosa yang apabila dihidrolisis dapat menghasilkan monomer-monomernya. Salah satu monomer yang dihasilkan adalah xilosa yang dapat diubah menjadi xilitol yang berfungsi sebagai pemanis seperti gula. Pada penelitian ini, digunakan *pollard* gandum sebagai bahan utama pembuatan xilitol dengan hidrolisis menggunakan H_2SO_4 0,3 M pada suhu $121^\circ C$ dengan waktu optimum 45 menit. Hasil pengukuran kadar xilosa dalam hidrolisat pada kondisi optimum adalah sebesar 9,48% (w/w). Hidrolisat ini digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi oleh khamir penghasil enzim *xylose reductase*, yaitu *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247. Sebelum dilakukan proses fermentasi, dibuat terlebih dahulu media aktivasi untuk mengaktifkan enzim *xylose reductase*. Hidrolisat diberi perlakuan detoksifikasi untuk menghilangkan senyawa toksik yang dapat menghambat pertumbuhan khamir dengan menambahkan arang aktif 1% (w/v). Produk xilitol hasil fermentasi tertinggi, didapatkan pada waktu fermentasi 24 jam untuk substrat yang didetoksifikasi yaitu dengan persen konversi xilitol tertinggi sebesar 8,65%. Waktu

fermentasi optimum untuk substrat tanpa detoksifikasi diperoleh pada jam ke-12 dengan persen konversi xilitol tertinggi sebesar 5,31%. Persen *yield* xilitol tertinggi untuk 2 gram sampel, terdapat pada substrat yang didetoksifikasi, yaitu sebesar 0,70%.

Kata kunci: *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247; detoksifikasi; fermentasi; hemiselulosa; hidrolisis; *pollard* gandum; xilitol; xilosa; *xylose reductase*.

xiii + 89 hlm.;gbr.;tab.;lamp.

Bibliografi: 50 (1969–2009)



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Perumusan Masalah	4
1.4 Hipotesis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Gandum	6
2.1.1 Taksonomi Gandum	7
2.1.2 Kandungan Gizi Gandum	7
2.1.3 <i>Pollard</i> Gandum	8
2.2 Lignoselulosa	9
2.2.1 Selulosa	10
2.2.2 Hemiselulosa	11
2.2.3 Lignin	12

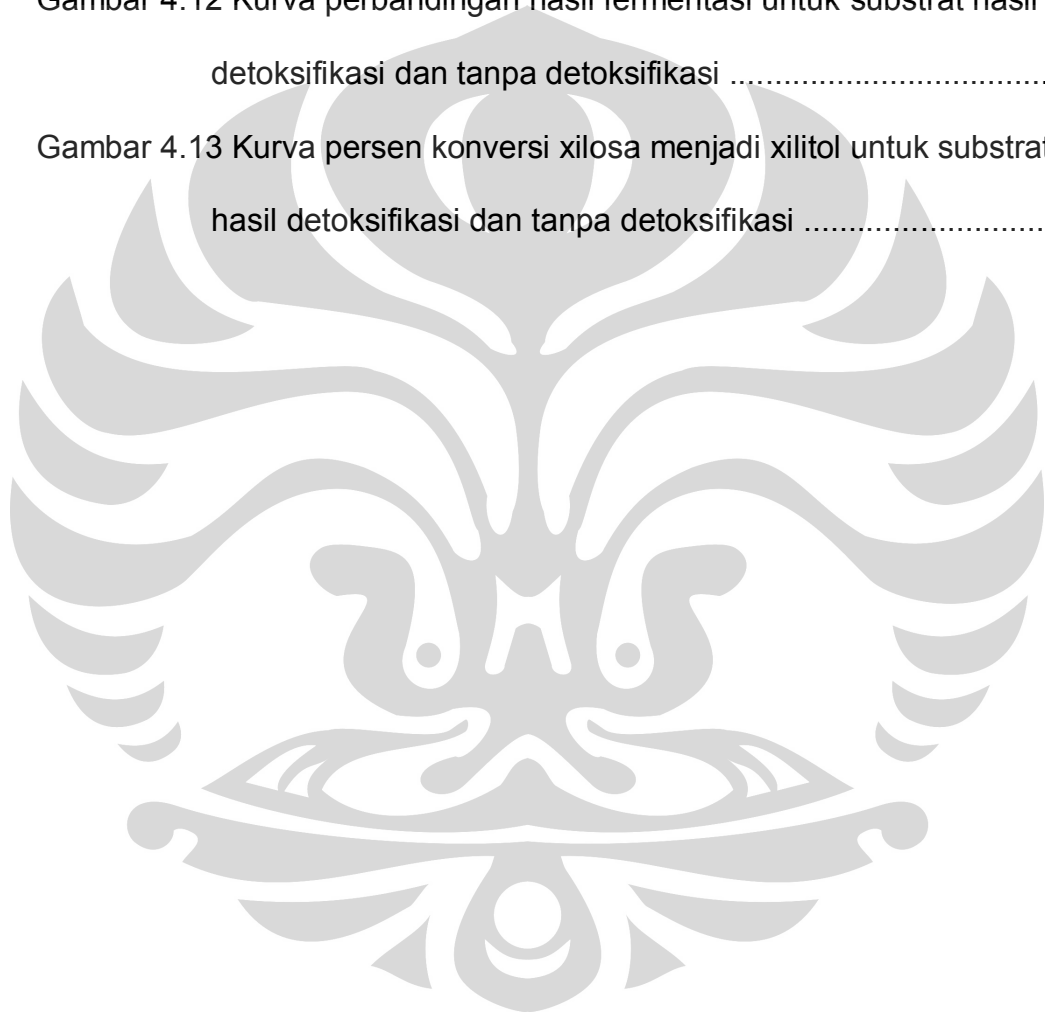
2.3 Xilosa	13
2.3.1 Sifat Fisika dan Kimia Xilosa	14
2.4 Xilitol	14
2.4.1 Sejarah Penemuan Xilitol	15
2.4.2 Sifat Fisika dan Kimia Xilitol	15
2.4.3 Keunggulan Xilitol Dibandingkan Pemanis Lain	16
2.4.4 Manfaat Xilitol	17
2.4.5 Proses Produksi Xilitol	17
2.5 Hidrolisis Hemiselulosa dengan Katalis Asam	18
2.6 Khamir	20
2.6.1 <i>Candida fukuyamaensis</i> U 62311 UICC Y-247	22
2.7 Metabolisme Pembentukan Xilitol oleh Khamir	22
2.8 Perkembangan Pembentukan Xilitol Secara Bioteknologi	24
BAB III METODE PENELITIAN	27
3.1 Alat dan Bahan Kimia	27
3.1.1 Alat-alat yang Digunakan	27
3.1.2 Bahan-bahan Kimia yang Digunakan	27
3.1.3 Mikroorganisme yang Digunakan	28
3.2 Prosedur Kerja	28
3.2.1 Pembuatan Sampel <i>Pollard</i> Gandum	28
3.2.2 Pembuatan Larutan Standar	29
3.2.3 Pembuatan Hidrolisat	29
3.2.4 Sterilisasi Alat	30

3.2.5	Penyiapan Inokulum	31
3.2.6	Penentuan Jumlah Sel Khamir dengan Metode Kamar Hitung dan Spektrofotometri	32
3.2.7	Fermentasi	32
3.2.8	Variasi Kondisi	34
3.2.9	Analisis Produk dengan HPLC.....	34
3.2.10	Bagan Kerja	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		38
4.1	Sampling <i>Pollard</i> Gandum	38
4.2	Pembuatan Sampel <i>Pollard</i> Gandum	39
4.3	Penentuan Kadar Air dalam <i>Pollard</i> Gandum	40
4.4	Hidrolisis <i>Pollard</i> Gandum	41
4.5	Identifikasi Standar Karbohidrat	44
4.6	Hasil Hidrolisis <i>Pollard</i> Gandum	46
4.7	Detoksifikasi Hidrolisat dengan Arang Aktif	49
4.8	Fermentasi dengan Khamir <i>Candida fukuyamaensis</i> U 62311 UICC Y-247	50
4.9	Hasil Fermentasi Kontrol Xilosa.....	53
4.10	Hasil Fermentasi Substrat	57
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		61
DAFTAR PUSTAKA		63
LAMPIRAN		70

DAFTAR GAMBAR

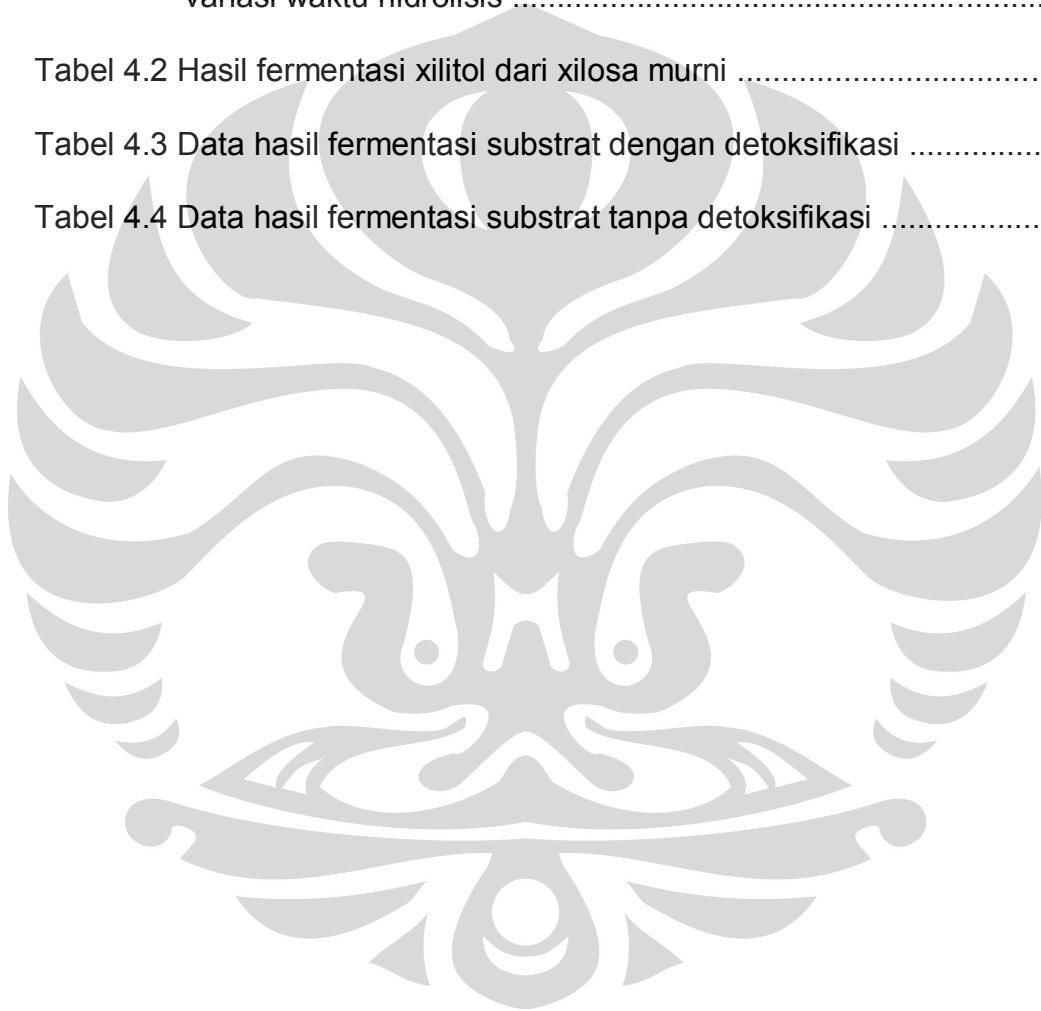
Gambar 2.1 Gandum	7
Gambar 2.2 <i>Pollard</i> gandum	9
Gambar 2.3 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman	10
Gambar 2.4 Struktur selulosa	11
Gambar 2.5 Struktur dasar arabinoglukoronoxilan	12
Gambar 2.6 Struktur lignin	13
Gambar 2.7 Struktur xilosa	14
Gambar 2.8 Struktur xilitol	16
Gambar 2.9 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida	20
Gambar 2.10 Foto mikroskopik khamir dari genus <i>Candida</i>	21
Gambar 2.11 Jalur metabolisme xilosa oleh khamir	24
Gambar 3.1 Instrumentasi HPLC	30
Gambar 3.2 Bagan kerja pengeringan <i>pollard</i> gandum	34
Gambar 3.3 Bagan kerja penentuan kadar air <i>pollard</i> gandum	35
Gambar 3.4 Bagan kerja pembuatan media aktivasi (<i>starter</i>)	36
Gambar 3.5 Bagan kerja hidrolisis, detoksifikasi, dan fermentasi	37
Gambar 4.1 <i>Pollard</i> gandum	39
Gambar 4.2 Alat autoklaf	41
Gambar 4.3 Reaksi β -D-xilopiranosida menjadi furfural	43
Gambar 4.4 Reaksi β -D-glukopiranosida menjadi HMF	43
Gambar 4.5 Kromatogram standar karbohidrat	45
Gambar 4.6 Kromatogram standar xilitol 100 ppm	46

Gambar 4.7 Kurva kadar xilosa dalam hidrolisat	46
Gambar 4.8 Kromatogram hidrolisat sampel <i>pollard</i> gandum	48
Gambar 4.9 Kromatogram hasil fermentasi menggunakan xilosa murni .	54
Gambar 4.10 Kurva hasil fermentasi untuk kontrol xilosa murni	55
Gambar 4.11 Kromatogram hasil fermentasi substrat didetoksifikasi	57
Gambar 4.12 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk substrat hasil detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi	59
Gambar 4.13 Kurva persen konversi xilosa menjadi xilitol untuk substrat hasil detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi	60



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan kimia biji gandum	8
Tabel 2.2 Kandungan nutrisi <i>pollard</i>	9
Tabel 4.1 Kadar xilosa dalam hidrolisat yang dihasilkan pada berbagai variasi waktu hidrolisis	48
Tabel 4.2 Hasil fermentasi xilitol dari xilosa murni	54
Tabel 4.3 Data hasil fermentasi substrat dengan detoksifikasi	58
Tabel 4.4 Data hasil fermentasi substrat tanpa detoksifikasi	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Penentuan kadar air <i>pollard</i> gandum	70
Lampiran 2 Kromatogram dan kurva standar xilosa	72
Lampiran 3 Kromatogram dan kurva standar xilitol	75
Lampiran 4 Kromatogram standar glukosa dan arabinosa	78
Lampiran 5 Kromatogram hidrolisat sampel <i>pollard</i> gandum dengan variasi waktu hidrolisis	79
Lampiran 6 Data hasil perhitungan kadar xilosa pada hidrolisat dengan suhu hidrolisis 121°C	83
Lampiran 7 Kromatogram media aktivasi (<i>starter</i>), sebelum, dan sesudah substrat didetoksifikasi dan persentase pengurangan kadar xilosa	84
Lampiran 8 Kromatogram dan tabel data hasil fermentasi kontrol xilosa	.86
Lampiran 9 Kromatogram hasil fermentasi substrat pada waktu optimum	87
Lampiran 10 Contoh cara perhitungan	88

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan negara agraris yang sebagian besar penduduknya bermatapencaharian sebagai petani. Hasil pertanian yang dihasilkan diolah menjadi kebutuhan pokok, yang dalam prosesnya akan menghasilkan limbah pertanian. Apabila jumlah limbah ini semakin banyak, maka akan menimbulkan masalah lingkungan. Oleh karena itu, dibutuhkan penanganan yang benar dan efektif dalam mengelola limbah pertanian ini, sehingga tidak menimbulkan masalah bagi lingkungan.

Limbah pertanian dapat diolah lebih lanjut untuk menghasilkan sesuatu yang lebih berguna. Pada umumnya, limbah pertanian ini kaya akan kandungan lignoselulosa, yang mengandung hemiselulosa yang tinggi. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa, seperti L-arabinosa dan D-xilosa.¹ Xilosa dari limbah pertanian ini dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Oleh karena itu, limbah pertanian dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan produk yang lebih berguna dan memiliki nilai jual yang tinggi.

Salah satu hasil pertanian yang dihasilkan di Indonesia adalah gandum. Gandum banyak dimanfaatkan menjadi tepung terigu yang diproses lebih lanjut menjadi panganan seperti roti, mie, pasta, dan lain-lain. Pada

proses penggilingan gandum dihasilkan produk samping berupa kulit ari dan kulit terluar dari biji gandum. Pada umumnya, hasil samping dari penggilingan biji gandum adalah *pollard* dan *bran*. *Pollard* merupakan bagian yang paling dekat dengan endosperma biji gandum, sedangkan *bran* merupakan kulit terluar biji gandum.

Di kalangan industri, *pollard* banyak digunakan sebagai bahan baku pembuatan pakan ternak seperti pakan unggas dan sapi perah, sedangkan *bran* digunakan sebagai bahan campuran pada roti. Keduanya juga masih memiliki kandungan gizi yang potensial dan dapat digunakan sebagai media pertumbuhan dan pembiakan ragi/ khamir.

Di dalam *pollard* terkandung hemiselulosa yang apabila dihidrolisis dapat menghasilkan monomer-monomernya. Salah satu monomer yang dihasilkan adalah xilosa. Xilosa dapat diubah menjadi xilitol yang berfungsi sebagai pemanis seperti gula. Peningkatan konsumsi gula pada industri makanan dan minuman sebagai pemanis menimbulkan efek yang buruk bagi kesehatan. Gula yang digunakan adalah sukrosa yang memiliki kadar kemanisan yang paling tinggi di antara jenis lainnya. Konsumsi yang berlebihan pada makanan dan minuman yang mengandung gula sukrosa ini dapat mengakibatkan karies gigi, diabetes, obesitas, jantung, dan lain-lain. Oleh karena itu, perlu dicari pemanis alternatif yang dapat menggantikan gula sukrosa ini yang tidak mengakibatkan efek buruk bagi kesehatan, salah satunya adalah xilitol.

Xilitol merupakan pemanis pengganti yang memiliki kelebihan dibandingkan dengan gula sukrosa yang pada umumnya digunakan. Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa, tetapi memiliki tingkat energi yang lebih rendah yaitu 2,4 kal/g, sedangkan sukrosa 4 kal/g.² Xilitol dapat dijumpai pada buah-buahan seperti stroberi, plum, dan pir dalam jumlah yang sedikit. Oleh karena itu, sangat sulit mengekstraksi xilitol dari buah-buahan. Xilitol memiliki kelarutan yang baik dalam air dan memiliki sifat antikariogenik karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang dapat menyebabkan karies gigi.³

Dalam skala industri, xilitol dapat diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi D-xilosa, dengan bantuan katalis Raney nikel pada suhu 80-140°C dan tekanan 50 atm.⁴ Proses kimiawi ini memiliki beberapa kelemahan, seperti katalis Raney nikel yang digunakan relatif mahal karena masih harus diimpor dari luar negeri, dapat berdampak buruk karena menghasilkan limbah nikel bagi lingkungan, dan *yield* xilitol yang didapat relatif rendah yaitu 50-60% dari total xilan yang terdapat pada hemiselulosa. Oleh karena itu, saat ini mulai dikembangkan pembuatan xilitol dengan proses bioteknologi dengan memanfaatkan mikroba untuk mereduksi D-xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim *xylose reductase*.

Mikroba dapat berkembang dengan baik pada daerah tropis, seperti Indonesia, yang merupakan lingkungan yang ideal bagi mikroba untuk tumbuh. Selain itu, Indonesia juga merupakan negara penghasil limbah

pertanian yang banyak mengandung lignoselulosa sehingga proses bioteknologi ini dapat dikembangkan dalam skala besar.

Proses bioteknologi memiliki keunggulan dibandingkan dengan proses kimiawi yang menggunakan katalis Raney nikel. Salah satu keunggulannya adalah biaya yang dibutuhkan relatif lebih murah karena mikroba yang digunakan, yaitu khamir *Candida fukuyamaensis*, berasal dari dalam negeri dimana isolatnya diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan *pollard* gandum untuk menghasilkan xilosa sebagai substrat yang potensial untuk produksi xilitol, dengan menghidrolisis *pollard* gandum yang kemudian difermentasi. Pada proses ini digunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* untuk menghasilkan xilitol. Mikroorganisme ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Collection) Departemen Biologi, Universitas Indonesia.

1.3 Perumusan Masalah

Pada penelitian ini, akan dilakukan hidrolisis terhadap *pollard* gandum menggunakan asam sulfat untuk menghasilkan xilosa. Hidrolisis dilakukan pada suhu 121°C dengan konsentrasi asam sulfat 0,3 M, dengan variasi waktu hidrolisis untuk menghasilkan kondisi optimum. Setelah hidrolisis,

dilakukan detoksifikasi yang bertujuan untuk menyerap senyawa-senyawa toksik yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis. Proses detoksifikasi ini menggunakan 1% arang aktif (w/v) selama 30 menit dalam *shaker*. Xilosa yang dihasilkan dalam proses hidrolisis ini kemudian difermentasi dengan menggunakan khamir *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247. Penggunaan spesies khamir ini didasarkan pada hasil penelitian sebelumnya. Mikroorganisme ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UICC Departemen Biologi, Universitas Indonesia. Metode yang digunakan pada fermentasi ini adalah metode curah.

1.4 Hipotesis

1. *Pollard* gandum mengandung hemiselulosa yang tinggi yang dapat menghasilkan xilosa yang optimum sehingga diharapkan akan diproduksi xilitol dalam jumlah yang tertinggi.
2. Hidrolisat *pollard* gandum yang mengandung xilosa, dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol dengan cara fermentasi menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR). Khamir ini akan mereduksi xilosa menjadi xilitol.
3. Proses detoksifikasi akan meningkatkan persen konversi xilitol terhadap xilosa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gandum

Gandum merupakan tanaman pangan yang tumbuh pada dataran tinggi yang beriklim tropis dan subtropis. Untuk satu hektar lahan gandum, dapat dihasilkan antara 3 sampai 4,5 ton gandum. Tingkat konsumsi gandum di Indonesia hingga tahun 2005 mencapai 4,5 juta ton.⁵

Gandum diperkenalkan di Indonesia sekitar tahun 1784 dan mula-mula ditanam di Jakarta, Semarang, Cirebon, dan Solo. Bibitnya didatangkan dari Afrika Selatan, Jepang, Persia, dan Cina. Di Indonesia, gandum bukanlah komoditas utama, sehingga untuk memenuhi kebutuhan akan tepung terigu yang berasal dari gandum, Indonesia mengimpor gandum dari Kanada, Amerika Serikat, Argentina, dan Australia. Pada tahun 2009 Indonesia diperkirakan mengimpor gandum sebanyak 5,5 juta ton.⁶

Di dunia saat ini dikenal tiga jenis gandum, yaitu *Durum Wheat*, *Hard Wheat* (gandum berbiji keras), dan *Soft Wheat* (gandum berbiji lunak). *Durum Wheat* terbagi menjadi dua, yakni *Amber Durum*, sebagai bahan baku pembuatan pasta, sedangkan *Red Durum* biasanya untuk makanan ternak dan jarang sekali dikonsumsi oleh manusia. *Hard Wheat* dan *Soft Wheat* adalah jenis gandum yang dipergunakan sebagai bahan baku tepung terigu.

2.1.1 Taksonomi Gandum

Nama latin tanaman gandum adalah *Triticum aestivum*. Klasifikasi botani tanaman gandum adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Ordo : Poales
Famili : Poaceae
Genus : *Triticum*
Species : *T. aestivum*



Gambar 2.1 Gandum

2.1.2 Kandungan Gizi Gandum

Gandum merupakan salah satu sumber karbohidrat terpenting di dunia. Selain itu, gandum juga mengandung protein, vitamin, dan mineral. Protein pada gandum lebih tinggi dibandingkan sumber karbohidrat lain.

Begitu pula asam-asam aminonya lebih lengkap dan lebih besar jumlahnya, demikian pula bila dibandingkan dengan asam amino dari hewan. Lisin yang terdapat pada gandum merupakan sumber asam amino dengan jumlah yang lebih besar dibanding kedelai.

Tabel 2.1 Kandungan kimia biji gandum

Kadar (%)	Aleuron	Endosperma	Tepung (ekstraksi 72%)
Protein	13,3	26,6	11,8
Lemak	2,0	10,9	1,2
Mineral	1,7	4,3	0,46
Serat	2,3	2,5	0,4
Karbohidrat	68,7	44,2	74,1
Air	12,0	11,5	12,0

Endosperma pada gandum merupakan sumber protein dan pati. Sedangkan aleuron dan lembaganya banyak mengandung minyak, mineral, vitamin, dan protein nongluten.

2.1.3 *Pollard* Gandum

Pollard merupakan produk samping dari hasil proses penggilingan gandum. Angka konversi *pollard* dari bahan baku sekitar 25-26%. *Pollard* memiliki granulasi yang lebih halus dibandingkan *wheat bran* dan kandungan serat serta protein tinggi sehingga sangat baik dikonsumsi oleh ternak unggas.

Tabel 2.2 Kandungan nutrisi *pollard*

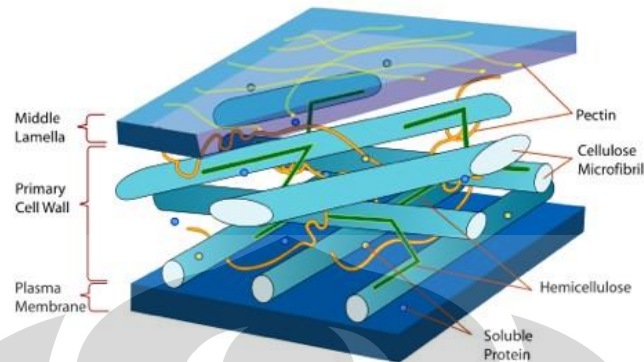
Kandungan	Kadar (%)
Selulosa	35
Hemiselulosa	45
Air	14
Protein	14,5
Abu	5,5
Pati	30
Lemak Kasar	4,3
Serat Kasar	7

Kualitas protein *pollard* lebih baik dari jagung, tetapi lebih rendah daripada kualitas protein kedelai, susu, ikan, dan daging. *Pollard* kaya akan fosfor (P) sebesar 1,29% dan ferrum (Fe), tetapi hanya mengandung kalsium (Ca) sebesar 0,13%. Bagian terbesar dari fosfor terdapat dalam bentuk fitin fosfor. *Pollard* tidak mengandung vitamin A atau vitamin lainnya, tetapi kaya akan niacin (vitamin B₃) dan thiamin (vitamin B₁).⁷

**Gambar 2.2** *Pollard* gandum

2.2 Lignoselulosa

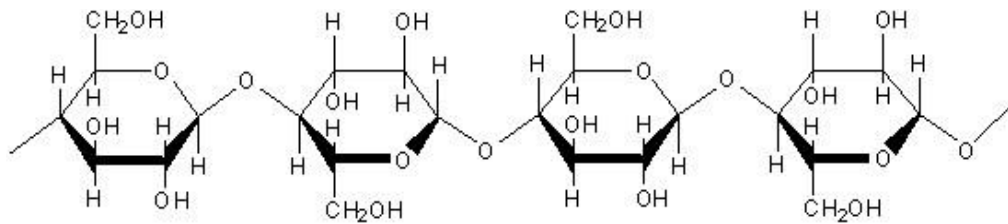
Lignoselulosa merupakan komponen yang terdapat dalam tanaman. Lignoselulosa ini terdiri dari tiga komponen, yaitu selulosa (35-40%), hemiselulosa (30-35%), dan lignin (14-15%).⁸



Gambar 2.3 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman

2.2.1 Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa yang tidak bercabang. Bentuk polimer ini memungkinkan selulosa saling menumpuk atau terikat menjadi bentuk serat yang sangat kuat.⁹ Selulosa merupakan komponen terbesar di dalam dinding sel tanaman, yaitu antara 35-40%, dan memiliki derajat polimer antara 7000-15000 molekul glukosa per polimer.¹⁰ Selulosa terdiri dari unit-unit β -D-glukopiranosida dengan ikatan β -1,4-glikosida, membentuk homopolisakarida yang tersusun linier dan memiliki kecenderungan membentuk ikatan hidrogen intramolekular dan intermolekular yang menyebabkan polimer ini menjadi lebih kuat dan kaku.¹¹ Selulosa alami mempunyai bentuk amorf dan kristalin serta bersifat tidak larut dalam kebanyakan pelarut. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan enzim atau asam.¹²

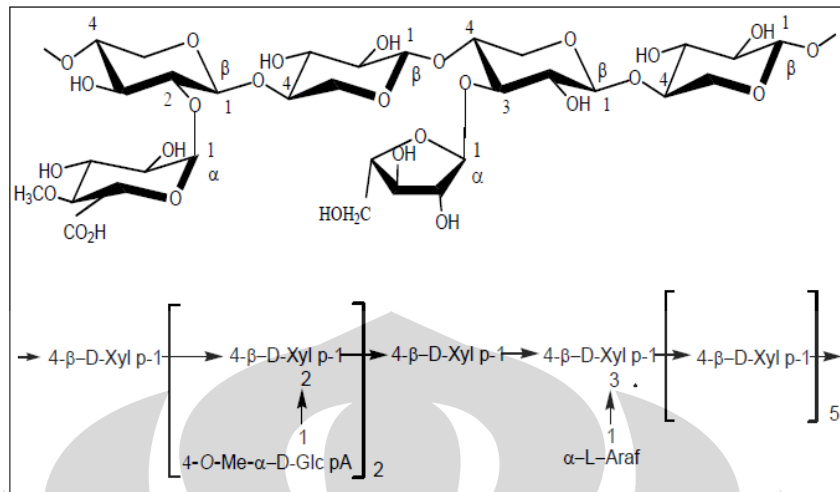


Gambar 2.4 Struktur selulosa

2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polimer gula. Namun, berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun dari glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula, seperti xilosa, arabinosa, dan manosa.⁷

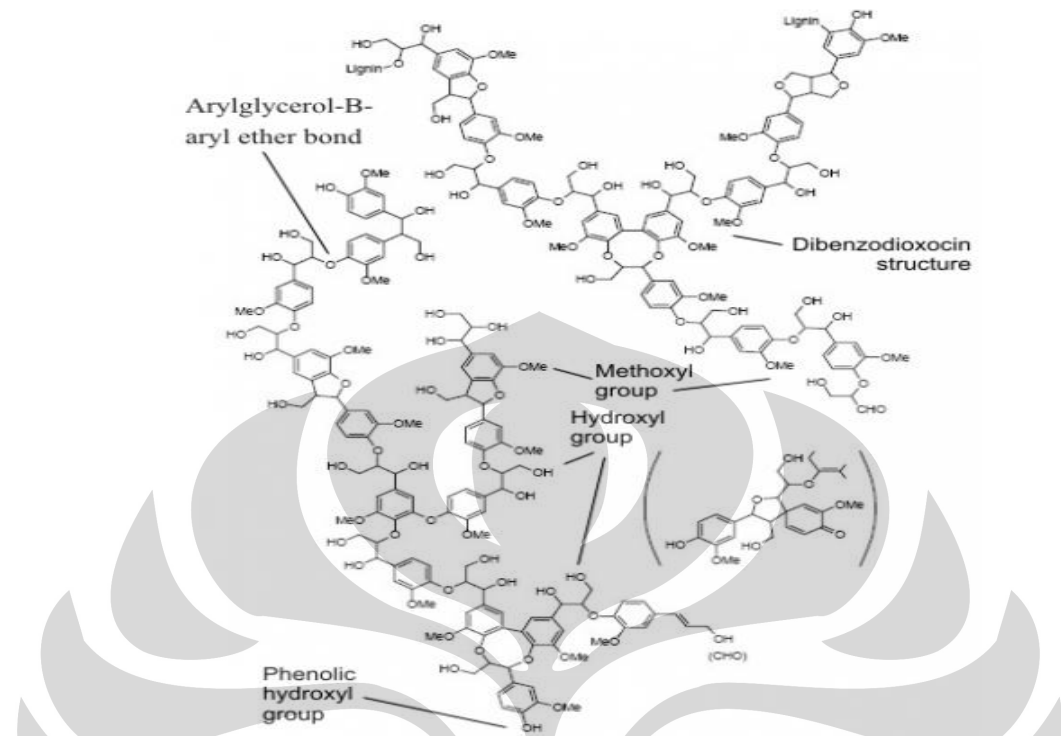
Hemiselulosa merupakan komponen terbesar kedua di dalam dinding sel tanaman. Hemiselulosa tersusun atas rantai pendek gula yang memiliki 150-200 unit monomer. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa, seperti L-arabinosa dan D-xilosa.¹ Rantai polimer hemiselulosa memiliki cabang yang pendek dan amorf.¹⁰ Pada Gambar 2.5 merupakan salah satu contoh hemiselulosa yakni xilan.



Gambar 2.5 Struktur dasar arabinoglucuronoxilan

2.2.3 Lignin

Lignin merupakan komponen yang paling keras pada dinding sel tanaman yang berfungsi sebagai penguat dan pembentuk dinding sel yang kokoh, dan merupakan polimer dari unit fenilpropanoid 3 dimensi yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman.³⁶ 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 dan bersifat hidrofobik.³⁷



Gambar 2.6 Struktur lignin

2.3 Xilosa

Xilosa merupakan aldopentosa, monosakarida yang terdiri dari lima buah atom karbon dengan gugus aldehyd. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis bahan-bahan yang mengandung hemiselulosa yang terdapat dalam kayu ataupun bahan lainnya.¹ Xilosa merupakan unit penyusun xilan, komponen terbesar dalam hemiselulosa. Xilosa merupakan bahan baku pembuatan xilitol.

2.3.1 Sifat Fisika dan Kimia Xilosa

Berikut ini adalah beberapa sifat fisika dan kimia dari xilosa³³:

Nama Kimia : Xilosa

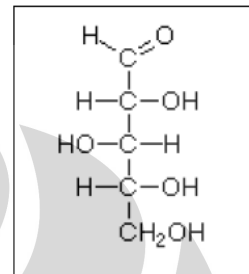
Rumus Kimia: $C_5H_{10}O_5$

Wujud : Tidak ditemukan dalam keadaan bebas tetapi dalam bentuk xilan

Berat Molekul: 150,13 g/mol

Titik Leleh : 148-150°C

Densitas : 1,525 g/cm³



Gambar 2.7 Struktur xilosa

2.4 Xilitol

Xilitol merupakan gula alkohol dengan lima atom karbon. Xilitol disebut sebagai pemanis alami karena secara alami ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan.³ Senyawa ini bersifat antikariogenik dan berpotensi sebagai pemanis rendah kalori. Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa, tetapi memiliki tingkat energi yang lebih rendah yaitu 2,4 kal/g, sedangkan sukrosa 4 kal/g.²

Berdasarkan penelitian, mikroorganisme kariogenik lebih menyukai struktur gula enam karbon seperti D-glukosa untuk mendukung pertumbuhannya. Xilitol memiliki lima atom karbon sehingga bakteri kariogenik, seperti *Streptococcus mutans* yang ada di dalam mulut, tidak dapat menggunakan atau mendegradasinya sebagai sumber energi. Oleh

karena itu, xilitol banyak digunakan untuk mencegah karies pada gigi.³ Xilitol juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dalam nasofaring, sehingga dapat mengurangi 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.²

2.4.1 Sejarah Penemuan Xilitol

Xilitol pertama kali dibuat dari pohon Birch oleh orang-orang Finlandia selama perang dunia kedua. Pada tahun 1930, terjadinya kelangkaan pasokan gula mendorong para peneliti 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. Sampai akhirnya pada tahun 1963 mendapat persetujuan dari US *Food and Drug Administration* (FDA), bahwa xilitol tidak mempunyai efek toksik.¹⁴

2.4.2 Sifat Fisika dan Kimia Xilitol

Berikut ini adalah beberapa sifat fisika dan kimia dari xilitol¹³:

Nama Kimia : Xilitol

Rumus Kimia: $C_5H_{12}O_5$

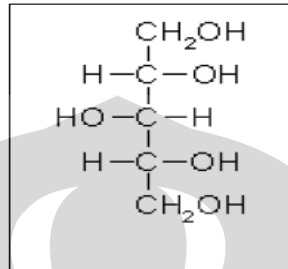
Wujud : Kristal putih

Bau : Tidak berbau

Berat Molekul: 152,15 g/mol

Titik Leleh : 94°C

Densitas : 1,52 g/cm³



Gambar 2.8 Struktur xilitol

2.4.3 Keunggulan Xilitol Dibandingkan Pemanis Lain

- Xilitol mempunyai nilai kalori sebesar 2,4 kal/g, lebih rendah daripada gula pada umumnya, seperti glukosa dengan nilai kalori sebesar 4 kal/g.²
- Xilitol memiliki tingkat kemanisan yang sama dengan sukrosa dan lebih manis daripada sorbitol.
- Xilitol bersifat antikariogenik, artinya tidak menyebabkan karies pada gigi, karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri kariogenik *Streptococcus mutans*.³
- Xilitol merupakan pemanis yang aman digunakan oleh setiap orang. Pernyataan ini telah dikeluarkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA).¹⁵

2.4.4 Manfaat Xilitol^{14,15,16}

Nilai kalori xilitol yang lebih rendah dibandingkan gula lain, seperti glukosa, menyebabkan xilitol sangat baik dikonsumsi oleh mereka yang sedang menjalani program penurunan berat badan. Xilitol memberikan sensasi dingin dan menyejukkan saat berada di mulut. Xilitol dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam mulut, sehingga bermanfaat untuk mencegah karies dan pembentukan plak.

2.4.5 Proses Produksi Xilitol

Proses pembentukan xilitol dari xilosa dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan cara kimiawi dan bioteknologi. Proses secara kimiawi dilakukan dengan mereduksi xilosa menggunakan gas hidrogen dan katalis Raney nikel pada suhu 80°C – 140°C dan tekanan yang tinggi, yaitu 50 atm.³⁸ Proses kimia ini memiliki beberapa kelemahan, yakni membutuhkan beberapa tahap pemurnian, hasil samping reaksi yang berupa limbah nikel, dan biaya yang tinggi karena proses yang menggunakan tekanan tinggi. Proses kedua yakni bioteknologi adalah dengan memanfaatkan mikroorganisme yakni khamir untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim *xylose reductase*. Proses secara bioteknologi ini memiliki beberapa keuntungan yaitu reaksi reduksinya selektif terhadap xilosa. Reaksinya berlangsung pada suhu dan tekanan yang rendah, biayanya

mudah karena berasal dari sel khamir dan *yield* yang didapat relatif tinggi (60-80%).³⁹

2.5 Hidrolisis Hemiselulosa dengan Katalis Asam

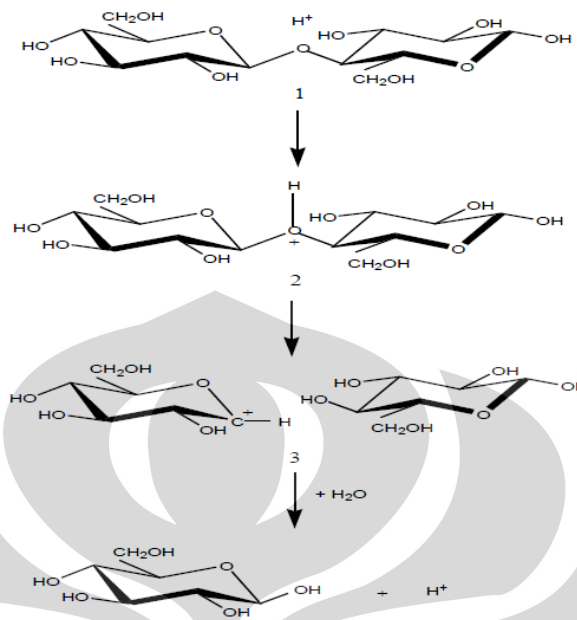
Hidrolisis merupakan pemecahan molekul besar menjadi bagian yang lebih kecil yang masih merupakan komponen monomer dari senyawa itu sendiri, melalui adisi oleh air.¹⁷ Untuk mendegradasi molekul besar ini dapat digunakan katalis asam atau enzim. Hidrolisis dengan asam akan menghasilkan hasil berupa campuran. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, tidak hanya hemiselulosa yang dihidrolisis, tetapi juga selulosa dan senyawa monosakarida lainnya menjadi bentuk lain.

Asam yang biasa digunakan pada hidrolisis adalah asam sulfat. Asam ini akan melepaskan proton yang memecahkan ikatan eter heterosiklik antara monomer gula dalam rantai polimer yang dibentuk oleh hemiselulosa dan selulosa. Produk yang dihasilkan merupakan senyawa campuran berupa xilosa, arabinosa, dan glukosa. Selain itu dihasilkan produk samping berupa oligomer, furfural, dan asam asetat. Senyawa furfural bersifat toksik bagi beberapa mikroorganisme sehingga harus dihilangkan dari hidrolisat. Sedangkan asam yang tersisa harus dinetralkan karena dapat menghambat reaksi fermentasi. Furfural dapat dibentuk dengan mudah pada konsentrasi asam dan suhu yang tinggi.

Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam melalui pemutusan ikatan-ikatan glikosida menjadi komponen-komponen monomernya.

Monosakarida-monosakarida yang terbentuk selama proses hidrolisis oleh asam meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam dan waktu hidrolisis. Namun, pentosa dan heksosa juga cenderung mengalami degradasi menjadi furfural dan 5-hidroksimetil furfural jika konsentrasi asam, waktu, dan suhu reaksi hidrolisis ditingkatkan.¹⁸ Pengurangan konsentrasi senyawa-senyawa beracun dalam hidrolisat dapat dilakukan dengan pemberian karbon aktif.

Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida yang terdiri atas tiga tahap. Pada tahap pertama, proton (sebagai katalis asam) berinteraksi dengan oksigen pada ikatan eter heterosiklik antara monomer-monomer gula dan membentuk asam konjugat. Langkah ini diikuti oleh pemecahan secara lambat ikatan C-O-C (glikosida) menghasilkan intermediet kation karbonium siklik. Setelah mengalami adisi yang cepat, maka terbentuklah gula bebas.¹⁹



Gambar 2.9 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida¹⁹

2.6 Khamir

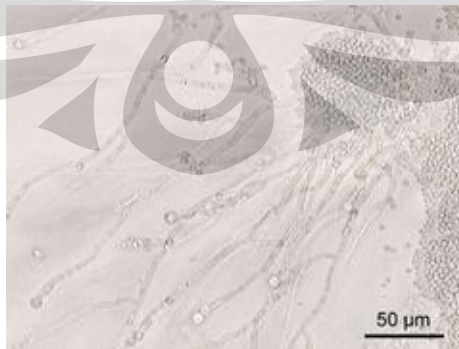
Saat ini terdapat lebih dari 250.000 spesies fungi yang telah diidentifikasi. Kingdom fungi terdiri dari tiga jenis, yaitu khamir (organisme yang terdiri atas satu sel), kapang (organisme yang berfilamen), dan jamur (organisme yang berkumpul membentuk struktur makroskopik atau lendir).²⁰

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.^{20,21}

Manfaat khamir sangat bermacam-macam, beberapa diantaranya adalah digunakan dalam industri biofuel dan pembangkit tenaga listrik. Salah satu genus khamir adalah *Candida*, yang dapat dimanfaatkan dalam produksi xilitol.

Taksonomi *Candida* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Fungi
Divisi : Ascomycota
Sub divisi : Saccharomycotina
Kelas : Saccharomycetes
Ordo : Saccharomycetales
Famili : Saccharomycetaceae
Genus : *Candida*
Contoh Spesies : *C. fukuyamaensis* ; *C. boidinii* ; *C. albican* ; *C. dubliniensis* ; *C. glabrata* ; *C. guillermondii* ; *C. kefyr* ; *C. krusei* ; *C. lusitanae* ; *C. milleri* ; *C. oleophila* ; *C. parapsilosis* ; *C. tropicalis* ; *C. utilis*



Gambar 2.10 Foto mikroskopik khamir dari genus *Candida*

2.6.1 *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247²²

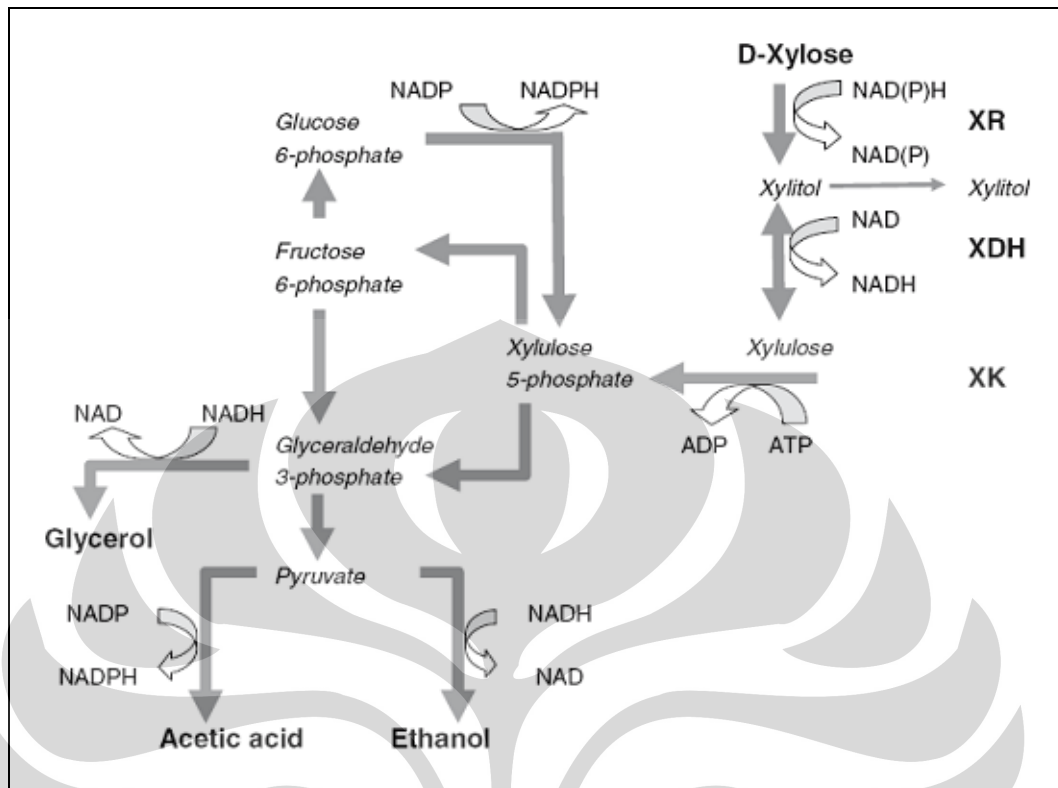
Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium *Yeast Malt Agar* (YMA). Koloni berwarna putih agak krem, permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap seperti mentega, profil dan tepi koloni menggantung, dan lurus. Khamir ini mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa, galaktosa, dan sukrosa. Selain itu, khamir ini mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, D-xilosa, dan L-arabinosa serta mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37°C. Isolat ini diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

2.7 Metabolisme Pembentukan Xilitol oleh Khamir

Mekanisme xilosa menjadi xilitol melibatkan khamir dari genus *Candida*. Dalam hal ini, xilosa akan masuk ke dalam jalur metabolisme *Candida* yang selanjutnya akan diubah menjadi xilitol. Jalur katabolisme D-xilosa melibatkan tiga buah enzim, yaitu *xylose reductase* (XR), *xylitol dehidrogenase* (XDH), dan *xilulokinase* (XK). Pertama, D-xilosa direduksi menjadi xilitol oleh enzim XR. Xilitol yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi D-xilulosa oleh XDH. Kemudian D-xilulosa ini difosforilasi menjadi xilulosa-5-fosfat oleh XK yang akan masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP). Jalur ini menggunakan energi berupa ATP. *Xylose reductase* memerlukan kofaktor baik NADH maupun NADPH tetapi *xylitol*

dehidrogenase bergantung pada NAD.^{2,23,24} Di lain pihak enzim *xilulokinase* memerlukan ATP sebagai kofaktornya.²

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktivitas enzim *xylose reductase* dan *xylitol dehidrogenase*. Untuk meningkatkan produksi xilitol dapat dilakukan dengan menambahkan glukosa atau gula yang lain pada hidrolisat untuk fermentasi. Penambahan ini bertujuan agar sel khamir dapat tumbuh dengan dihasilkannya ATP dari proses glikolisis, sedangkan xilosa dapat terkonsentrasi menjadi xilitol oleh enzim *xylose reductase*. Penambahan glukosa ini baik sampai konsentrasi tertentu. Jika konsentrasi glukosa berlebih, maka xilosa dapat terabaikan oleh khamir sehingga tidak terbentuk xilitol. Cara lain untuk meningkatkan xilitol adalah dengan membuat kondisi fermentasi yang anaerobik. Oksigen mempunyai peranan 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.² Tingginya konsentrasi NADH dalam sel menaikkan aktivitas enzim *xylose reductase* dan menyebabkan akumulasi xilitol.



Gambar 2.11 Jalur metabolisme xilosa oleh khamir

Berdasarkan jalur metabolisme di atas, selain dihasilkan produk xilitol ternyata dihasilkan juga etanol dan asam asetat dari reaksi glikolisis. Pembentukan asam asetat menggunakan enzim asetat kinase, sedangkan pada alkohol dibantu dengan enzim *alcohol dehidrogenase*.

2.8 Perkembangan Pembentukan Xilitol Secara Bioteknologi

Pada awalnya, proses pembentukan xilitol dengan khamir diusulkan dengan menggunakan glukosa sebagai bahan baku, karena harga yang murah dan mudah didapatkan.³⁸ Jalur metabolisme pertama kali diusulkan adalah glukosa diubah menjadi D-arabitol, kemudian membentuk D-xilulosa,

dan akhirnya D-xilulosa direduksi menjadi xilitol. Pembentukan xilitol dari glukosa ini terdiri dari beberapa tahapan reaksi yang lebih panjang dibandingkan dengan pembentukan xilitol dari D-xilosa, sehingga jalur metabolisme ini kurang diminati, disamping *yield* xilitol yang dihasilkan juga lebih rendah yakni sebesar 11,6% dari 77,5 g glukosa yang dikonsumsi.^{38,40}

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan D-xilosa sebagai bahan dasar baku dan didapatkan informasi bahwa aktivitas enzim *xylose reductase* berperan dalam pembentukan xilitol.⁴¹ Kemudian, pada tahun 1998 dilakukan penelitian untuk menaikkan *yield* xilitol yang didapatkan dengan menambahkan glukosa sebagai kosubstrat. Dari penelitian tersebut, didapatkan kenaikan *yield* xilitol menjadi 93% dengan menggunakan xilosa dan glukosa dengan perbandingan glukosa:xilosa 15% untuk *Candida tropicalis*, dibandingkan dengan *yield* xilitol saat menggunakan xilosa yang sebesar 82%.⁴² Penambahan glukosa dapat menaikkan *yield* xilitol hingga konsentrasi tertentu.⁴³ Penambahan glukosa di atas 10 g/L menunjukkan inhibisi terhadap aktivitas enzim *xylose reductase* sehingga xilitol yang dihasilkan berkurang. Inhibisi ini terjadi dengan dihasilkannya etanol sebagai metabolit samping.⁴⁰

Penelitian berkembang kepada mutasi gen penyandi enzim kunci dalam fermentasi xilosa yakni *xylitol dehidrogenase* yang mengkatalisis oksidasi xilitol menjadi xilulosa pada *Candida tropicalis*. Adanya mutasi pada gen penyandi *xylitol dehidrogenase* menyebabkan penggunaan xilosa sebagai sumber energi tidak mungkin terjadi. Hal ini dapat terjadi karena

tanpa adanya enzim *xylitol 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. Oleh karena itu, xilosa hanya digunakan sebagai penghasil xilitol tanpa digunakan oleh sel sebagai sumber energi, sehingga perlu ditambahkan sumber karbon lain, seperti glukosa. Metode ini akan menghasilkan *yield* 98% dari 50 g/L xilosa dan 10 g/L glukosa sebagai kosubstrat.⁴⁴

Pada saat sekarang, penelitian berkembang kepada penggunaan bahan baku yang tersedia dari alam yakni sekam padi,⁴⁵ ampas tebu,⁴⁶ tongkol jagung,⁴⁷ batang gandum.⁴⁸ Dari berbagai jenis bahan baku tersebut, semuanya menghasilkan *yield* yang berbeda-beda karena kandungan hemiselulosanya berbeda, namun secara keseluruhan memberikan *yield* sekitar 50-80%.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Kimia

3.1.1 Alat-alat yang Digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, botol semprot, corong gelas, pipet tetes, pipet volumetrik, pipet mikro, labu ukur, labu erlenmeyer, labu didih, tabung *centrifuge*, cawan petri, jarum ose, propilet (*bulb*), dan kondensor.

Instrumentasi yang digunakan adalah sebagai berikut: timbangan analitis, blender, autoklaf, *heating* mantel, penangas air, *shaker*, penyaring vakum, penyaring milipor, alat *centrifuge*, *diskmill*, *syringe*, pH meter, pompa vakum, alat *degassing*, pompa LC-20AB, HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, dan detektor refraktif indeks (RID-10A).

3.1.2 Bahan-bahan Kimia yang Digunakan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: *pollard* gandum, standar xilosa, glukosa, arabinosa, air suling, ekstrak khamir, H₂SO₄, NaOH, akuabides, alkohol 70%, glukosa, ammonium sulfat, magnesium sulfat, KH₂PO₄, pepton, *malt extract*, agar,

resin penukar kation dan anion, kertas saring, karbon aktif, kertas lakmus merah dan biru, dan filter membran nitroselulosa nitrat 0,45 µm.

3.1.3 Mikroorganisme yang Digunakan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah khamir *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UICC Departemen Biologi, Universitas Indonesia. Khamir tersebut diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pembuatan Sampel *Pollard* Gandum

Pollard gandum dicuci dengan air untuk menghilangkan pengotor-pengotor yang ada. Kemudian dioven pada suhu 60°C selama 12 jam. Pengeringan dilakukan pada suhu 60 °C karena dapat mengeringkan *pollard* tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada, sedangkan waktu pengeringan dilakukan selama 12 jam agar dapat diperoleh kadar air yang sama yaitu sebesar 6,69% dan berat yang konstan pada setiap kali penggunaan *pollard*. Pengeringan ini dimaksudkan untuk mencegah timbulnya jamur pada *pollard* selama proses penyimpanan karena media yang mengandung kadar gula dan air yang tinggi rentan ditumbuhi jamur.

3.2.2 Pembuatan Larutan Standar

Larutan induk xilosa, glukosa, dan arabinosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg xilosa, glukosa, dan arabinosa yang dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuabides 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. Deret larutan standar xilosa ini dianalisis menggunakan HPLC dan akan diperoleh nilai waktu retensi untuk uji kualitatif dan nilai luas area untuk uji kuantitatif. Dari nilai luas area dan konsentrasi masing-masing larutan standar xilosa, dibuat persamaan regresi linier.

3.2.3 Pembuatan Hidrolisat

Pollard gandum sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 60 mL larutan H_2SO_4 0,3M, kemudian sampel ditutup dengan sumbat kapas dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk dihidrolisis selama 45 menit pada suhu 121°C . Segera setelah proses hidrolisis selesai, ke dalam hidrolisat ditambahkan NaOH 0,5 M untuk menetralkan asam sulfat, sehingga diharapkan reaksi hidrolisis akan terhenti. Setelah dinetralkan, hidrolisat disaring dengan menggunakan kertas saring biasa dan filtratnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan putaran 3000 rpm. Kemudian supernatannya ditambahkan 1 g karbon aktif dan

didiamkan selama 15 menit lalu disaring dengan kertas saring yang dirangkap dua.

Untuk pengujian kadar xilosa dalam hidrolisat, filtrat yang didapatkan dari hasil sentrifugasi, ditambahkan dengan resin penukar kation dan anion terlebih dahulu. Setelah itu, disaring dengan menggunakan membran nitroselulosa dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C yang merupakan kolom penukar kation terdiri dari kalsium dengan kopolimer stiren divinilbenzena. Selain itu, kondisi kecepatan alir yang digunakan 1 mL/menit, suhu kolom 80°C, dan fase gerak yang digunakan adalah akuabides. Detektor yang digunakan adalah RID-10A. Di bawah ini adalah gambar alat instrumentasi HPLC yang digunakan.



Gambar 3.1 Instrumentasi HPLC

3.2.4 Sterilisasi Alat

Semua alat-alat gelas yang digunakan untuk fermentasi dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam.

Sterilisasi alat plastik (*tip*) dan media yang akan digunakan dilakukan dengan metode sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.2.5 Penyiapan Inokulum

1. Dalam proses ini digunakan sel mikroba berupa ragi dari spesies *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Center).
2. Medium agar yang digunakan untuk pertumbuhan adalah medium *Yeast Malt Agar* (YMA) dengan komposisi glukosa 10 g/L, *yeast extract* 3 g/L, *malt extract* 3 g/L, pepton 5 g/L, dan agar 15 g/L.
3. Kultur-kultur yang didapat, dimurnikan dengan metode cawan gores.

Cawan petri yang telah digores tadi diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 2 hari. Setelah hari kedua, biakan dalam cawan petri dilakukan pengamatan. Secara aseptik, biakan yang dianggap berasal dari sel tunggal diambil dan dipindahkan ke dalam agar miring yang telah disiapkan. Biakan dalam agar miring tadi diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30°C untuk dilakukan fermentasi.

3.2.6 Penentuan Jumlah Sel Khamir dengan Metode Kamar Hitung dan Spektrofotometri

Pada metode kamar hitung, setetes suspensi diletakkan di kamar hitung tipe *Neubauer* dan jumlah sel dapat ditentukan secara langsung dengan bantuan mikroskop dengan pembesaran 10 x atau 40 x. Jumlah total sel dihitung per mL suatu suspensi. Pada metode spektrofotometri, suspensi sel diletakkan di dalam kuvet yang akan diukur nilai absorbansinya pada berbagai panjang gelombang untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari suspensi sel khamir tersebut. Nilai absorbansi tersebut merupakan nilai rapat optis (*Optical Density* atau OD).

3.2.7 Fermentasi

Komposisi medium yang digunakan untuk fermentasi, yaitu xilosa 20 g/L, *yeast extract* 2 g/L, kalium dihidrogen fosfat KH_2PO_4 5 g/L, ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, dan magnesium sulfat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 0,4 g/L dengan pH 6.

1. Sebelum fermentasi, dilakukan pembuatan media aktivasi (*starter*) terlebih dahulu yakni xilosa murni dibuat dengan konsentrasi sebesar 500 ppm. Setelah itu, ditambah dengan medium fermentasi kecuali $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kemudian $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang telah ditimbang, dilarutkan dalam sedikit akuabides lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Xilosa murni yang telah berisi medium fermentasi dan tabung reaksi yang berisi

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi selesai, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang berada di dalam tabung reaksi dipindahkan secara aseptik ke dalam labu erlenmeyer yang berisi xilosa murni dan medium fermentasi. Secara aseptik, 10 mL air steril dituang ke dalam agar miring berisi biakan hasil pemurnian sebelumnya. Lalu, disuspensikan dengan menggunakan jarum ose ke dalam tabung reaksi secara aseptik dan suspensi yang didapat diaduk menggunakan *vortex*. Setelah mendapatkan suspensi sel, suspensi sel dimasukkan ke dalam xilosa murni dan medium fermentasi yang sebelumnya telah disterilisasi dengan perbandingan 1:25 (v/v). Medium fermentasi berisi suspensi sel, diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam dengan laju guncangan 110 rpm. Inilah yang dinamakan media aktivasi (*starter*).

2. Setelah 48 jam, media aktivasi yang berisi suspensi sel dimasukkan ke dalam sampel dan medium fermentasi dengan perbandingan 1:25 (v/v).
3. Sampel yang berisi medium fermentasi dan suspensi sel, diinkubasi di dalam *shaker* pada suhu 30°C dengan laju guncangan 110 rpm.
4. Fermentasi dihentikan setelah 3 hari dengan cara memanaskannya dalam penangas air pada suhu 80°C selama 10 menit. Kemudian, hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan diambil filtratnya. Selanjutnya ke dalam filtrat tersebut ditambahkan resin penukar kation dan anion, kemudian disaring dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dan xilitol menggunakan HPLC.

3.2.8 Variasi Kondisi

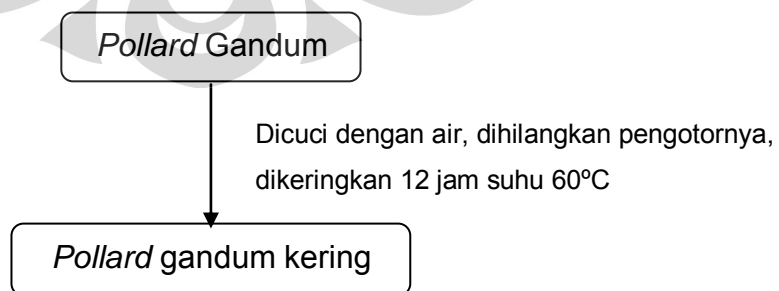
Variasi kondisi yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari 2, yakni:

1. Variasi waktu hidrolisis.
2. Variasi sampel yang tidak mengalami dan mengalami detoksifikasi.

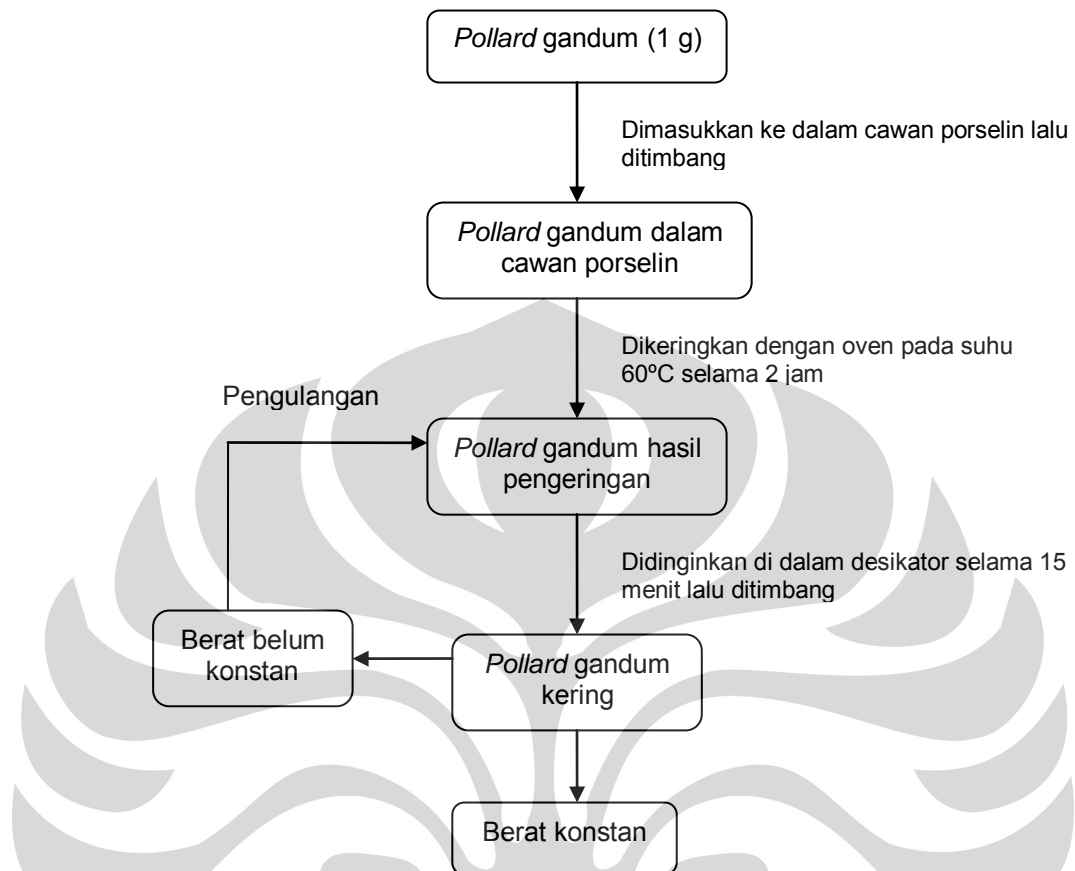
3.2.9 Analisis Produk dengan HPLC

Sampel hasil fermentasi disentrifugasi selama 20 menit, dengan kecepatan putar 3000 rpm. Supernatan yang didapatkan dari hasil sentrifugasi ditambahkan dengan resin penukar kation dan anion, kemudian disaring dengan menggunakan membran nitroselulosa. Sebanyak 20 μ L larutan tersebut dianalisis dengan HPLC dan hasilnya diamati dengan membandingkan waktu retensinya dengan standar (xilitol dan D-xilosa). Pengukuran pada HPLC menggunakan kolom kalsium untuk karbohidrat, detektor refraktif indeks (RID-10A), laju alir 1 mL/menit, suhu kolom 80°C, dan fase gerak akuabides.

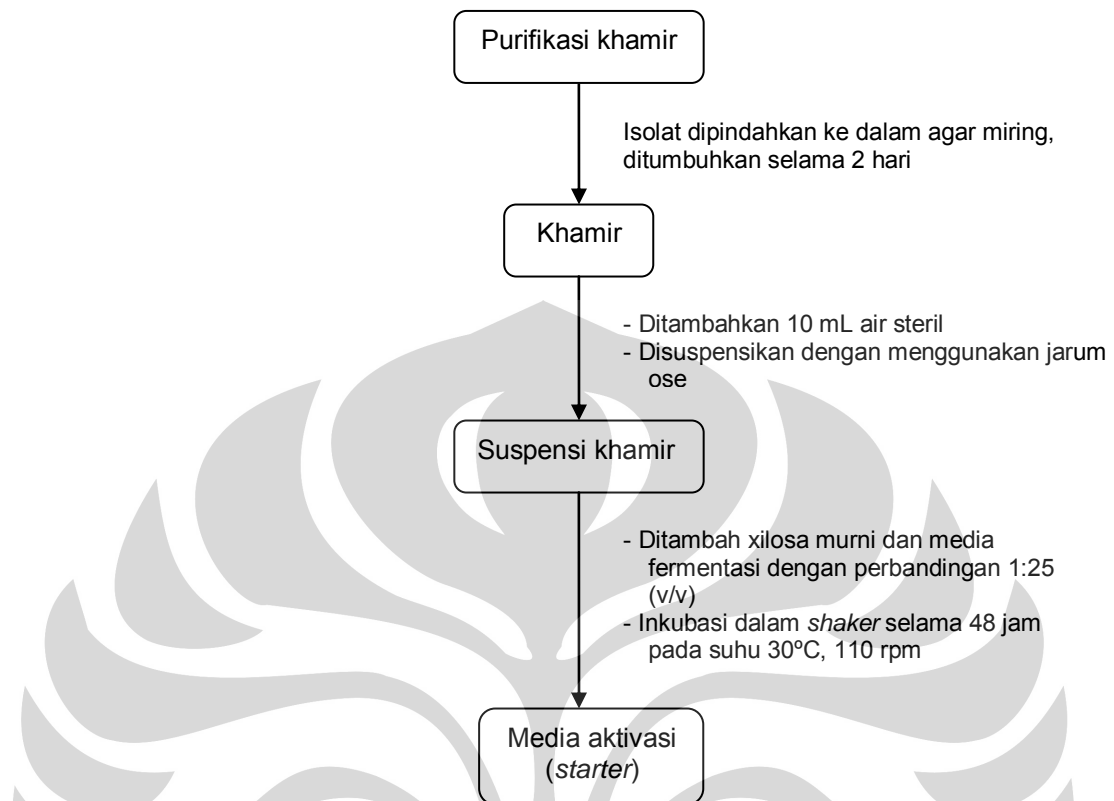
3.2.10 Bagan Kerja



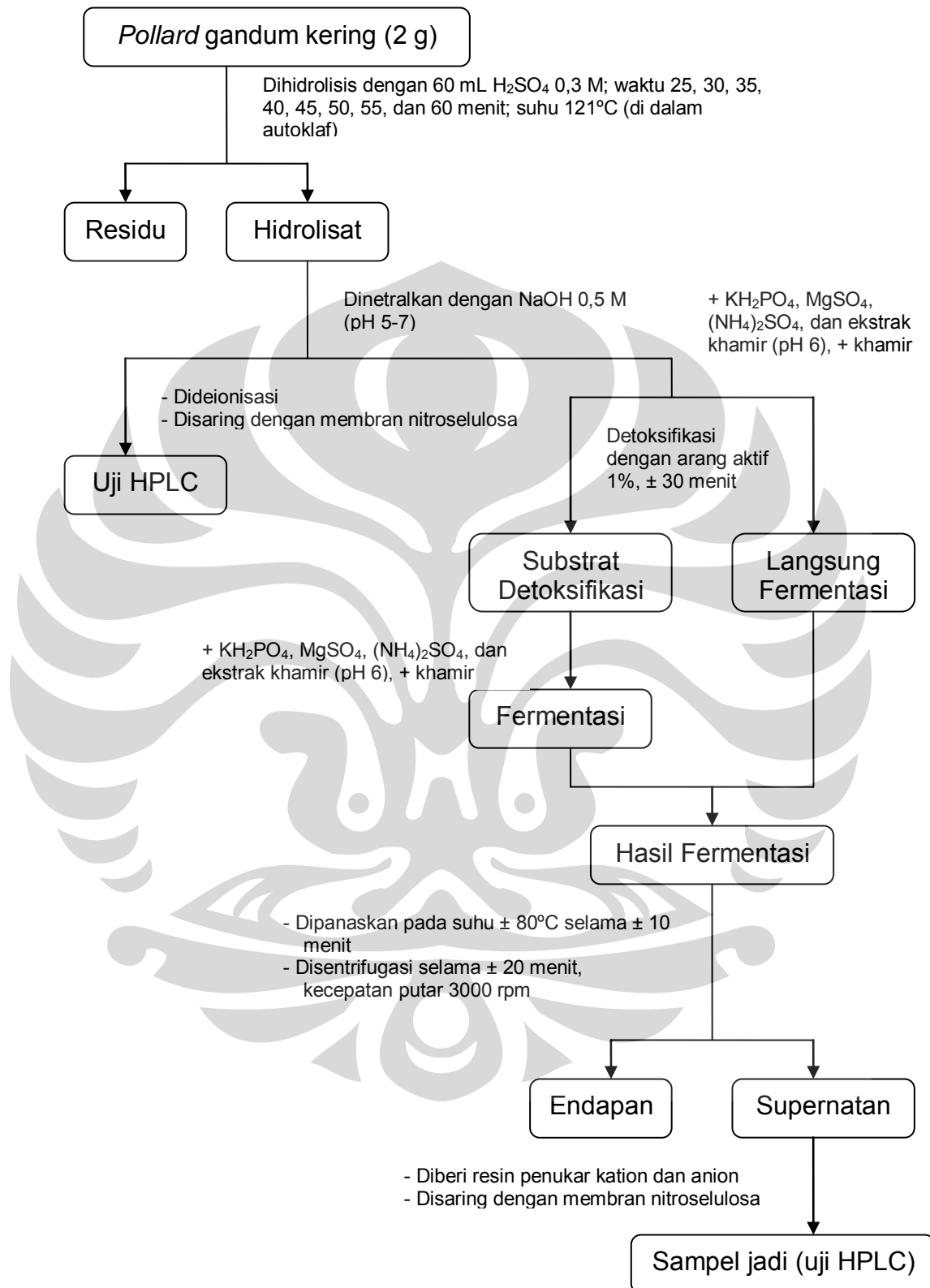
Gambar 3.2 Bagan kerja pengeringan *pollard* gandum



Gambar 3.3 Bagan kerja penentuan kadar air *pollard* gandum



Gambar 3.4 Bagan kerja pembuatan media aktivasi (*starter*)



Gambar 3.5 Bagan kerja hidrolisis, detoksifikasi, dan fermentasi

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan *pollard* gandum untuk menghasilkan xilosa sebagai substrat yang potensial untuk produksi xilitol dengan menghidrolisis *pollard* gandum yang kemudian difermentasi menggunakan khamir penghasil enzim *xylitol reductase* untuk menghasilkan xilitol. Adapun proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan katalis asam sulfat untuk menghasilkan xilosa yang akan digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Proses ini menggunakan metode fermentasi, yaitu dengan bantuan khamir dari species *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 yang merupakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR). Khamir species ini dipilih karena menghasilkan xilitol dengan kadar yang paling tinggi berdasarkan penelitian sebelumnya. Spesies *Candida* ini diperoleh dari koleksi UICC yang diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

4.1 Sampling *Pollard* Gandum

Pollard gandum yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT. Indofood Sukses Makmur, Tbk – Bogasari Flour Mills yang berasal proses *milling* gandum. *Pollard* merupakan limbah penggilingan gandum karena bagian dari gandum yang banyak digunakan adalah endosperma untuk pembuatan tepung terigu, sedangkan *pollard* dicampur dengan *bran* menjadi

pellet untuk pakan ternak misalnya unggas dan sapi. Alasan pemilihan *pollard* gandum adalah karena *pollard* memiliki kandungan hemiselulosa yang cukup tinggi. Selain itu, *pollard* gandum merupakan limbah penggilingan gandum yang dihasilkan dalam jumlah yang besar setiap tahunnya yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut selain menjadi pakan ternak. Oleh karena itu, *pollard* gandum merupakan substrat yang sangat potensial untuk menghasilkan xilitol.



Gambar 4.1 *Pollard* Gandum

4.2 Pembuatan Sampel *Pollard* Gandum

Pollard gandum yang diperoleh dari PT. ISM, Tbk – Bogasari Flour Mills berbentuk serbuk berwarna coklat muda yang sangat halus dan merupakan hasil sampingan dari penggilingan gandum yang berasal dari berbagai macam gandum di dalamnya dan tak menutup kemungkinan hasil sampingan ini masih mengandung pengotor–pengotor. Selain itu, akibat penyimpanan yang kurang baik akan dapat mengakibatkan timbulnya kutu. *Pollard* gandum termasuk salah satu bahan yang sangat rentan terkena

serangan kutu apabila penyimpanan bahan ini dilakukan dalam wadah yang tidak tertutup rapat dan kondisi lingkungan yang lembab. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencucian dengan air sampai bersih agar *pollard* menjadi bersih dan bebas dari pengotor serta kutu.

Pollard gandum yang telah dicuci bersih, dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 60°C selama 12 jam. Pengeringan dilakukan pada suhu 60 °C karena dapat mengeringkan *pollard* tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada, sedangkan waktu pengeringan dilakukan selama 12 jam agar dapat diperoleh kadar air yang sama yaitu sebesar 6,69% dan berat yang konstan pada setiap kali penggunaan *pollard*. Pengeringan ini dimaksudkan untuk mencegah timbulnya jamur pada *pollard* selama proses penyimpanan karena media yang mengandung kadar gula dan air yang tinggi rentan ditumbuhi jamur. Setelah proses pengeringan, *pollard* gandum disimpan dalam wadah yang tertutup.

4.3 Penentuan Kadar Air dalam *Pollard* Gandum

Pollard gandum yang telah dikeringkan selama 12 jam, diberi perlakuan lanjutan untuk mengetahui kandungan air (*moist*) yang terdapat dalam *pollard* gandum, sehingga akan dapat dijadikan acuan pada penelitian selanjutnya. Metode yang digunakan adalah metode gravimetri, yakni sampel yang telah dimasukkan ke dalam cawan porselin ditimbang terlebih dahulu yang kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 60°C selama 2 jam. Selanjutnya ditimbang kembali sampai diperoleh berat yang konstan. Pada

penentuan kadar air dalam *pollard* gandum diperoleh kadar air sebesar 6,69%. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam *pollard* gandum hanya sedikit mengandung air. Semua perhitungan penentuan kadar air ini tertera pada Lampiran 1.

4.4 Hidrolisis *Pollard* Gandum

Reaksi hidrolisis bertujuan untuk memecah ikatan hemiselulosa. Proses ini dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Autoklaf digunakan karena alat ini dapat mencapai suhu lebih dari 100°C dan tekanan yang tinggi yang dibutuhkan untuk proses hidrolisis.³¹ Variasi yang dilakukan pada proses hidrolisis adalah waktu hidrolisis. Pada Gambar 4.2 ini adalah alat autoklaf yang digunakan pada penelitian ini.



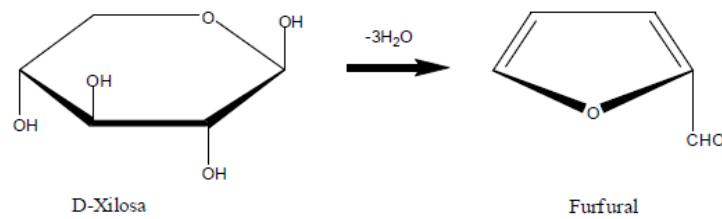
Gambar 4.2 Alat autoklaf

Proses hidrolisis dari hemiselulosa akan menghasilkan produk campuran karena hemiselulosa ini merupakan senyawa heteropolisakarida yang terdiri dari berbagai macam polisakarida. Hidrolisis dilakukan dengan

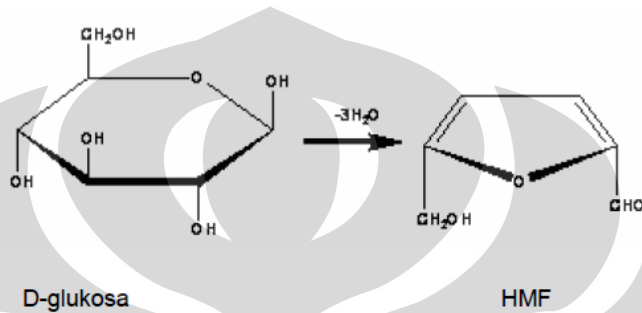
bantuan katalis asam sulfat karena merupakan katalis yang baik dan biasa digunakan untuk proses ini. Konsentrasi asam sulfat yang digunakan adalah 0,3 M, karena pada konsentrasi tersebut hemiselulosa sudah dapat dihidrolisis. Akan tetapi, selulosa belum terhidrolisis secara keseluruhan karena sifat ikatan selulosa yang lebih kuat dibandingkan hemiselulosa.³² Hal ini berkaitan dengan struktur selulosa yang berbentuk mikrofibril kristalin yang tersusun secara teratur sehingga memiliki tingkat rigiditas yang tinggi dan lebih sulit terhidrolisis, sedangkan hemiselulosa memiliki struktur amorf sehingga lebih mudah terhidrolisis dibandingkan selulosa.¹⁶

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 proses 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.²⁸

Degradasi xilosa menjadi furfural dan glukosa menjadi 5-hidroksimetil furfural dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4.



Gambar 4.3 Reaksi β -D-xilopiranos menjadi furfural

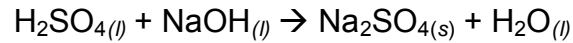


Gambar 4.4 Reaksi β -D-glukopiranos menjadi HMF

Proses hidrolisis ini menghasilkan hidrolisat yang berwarna coklat tua, memiliki bau seperti sereal, dan residu yang berupa endapan. Residu ini kemungkinan masih mengandung hemiselulosa, selulosa, dan lignin yang belum terhidrolisis. Ikatan glikosida yang mudah dipecah oleh asam akan memberikan asumsi bahwa filtrat mengandung monomer – monomer gula yang sebagian berasal dari hemiselulosa dan sebagian lain berasal dari selulosa. Setelah proses hidrolisis selesai, filtrat dan residu dipisahkan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring.

Hidrolisat yang bersifat asam segera dinetralkan dengan NaOH 0,5 M hingga pH 5 – 7 yang bertujuan untuk mencegah proses degradasi gula menjadi senyawa furfural dan menghentikan proses hidrolisis. Hasil reaksi

dari penetralan ini adalah garam Na_2SO_4 dan air karena reaksi ini adalah reaksi asam basa. Reaksi yang terjadi sebagai berikut.



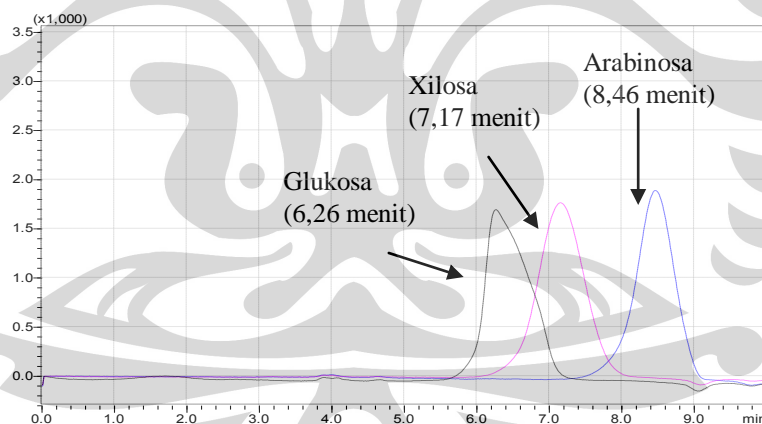
Proses penetralan ini diusahakan pH hidrolisat tidak lebih dari 7 karena dapat merusak cincin karbohidrat yang ada.³⁰ Hidrolisat yang dihasilkan berwarna coklat kekuningan dan bening.

Hasil hidrolisis ini kemudian dideionisasi dengan cara menambahkan resin penukar kation dan anion secara bergantian hingga larutan akhir hidrolisat bersifat netral. Penambahan resin bertujuan agar pada larutan hidrolisat bersifat netral dan tidak mengandung ion logam yang dapat merusak kolom kromatografi. Untuk mengetahui kadar gula hasil hidrolisis, pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Pelarut yang digunakan adalah akuabides, karena pelarut ini dianggap sebagai pelarut yang terbaik untuk memisahkan gula – gula seperti xilosa dan glukosa, sedangkan kolom yang digunakan adalah kolom kalsium untuk karbohidrat. Suhu kolom dijaga 80°C untuk menurunkan viskositas gula karbohidrat. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit.

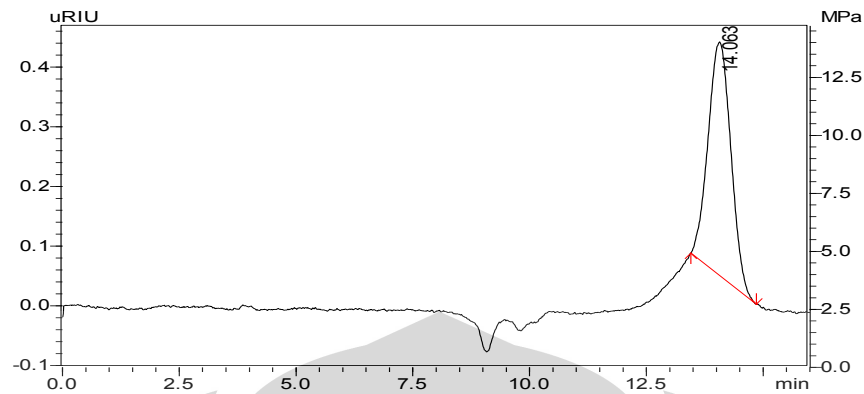
4.5 Identifikasi Standar Karbohidrat

Standar karbohidrat yang digunakan adalah larutan standar glukosa, arabinosa, xilosa, dan xilitol murni. Masing – masing larutan standar tersebut dibuat dengan berbagai macam konsentrasi lalu diukur dengan menggunakan HPLC Shimadzu Prominence–20 dengan kolom kalsium untuk

karbohidrat dengan detektor refraktif indeks (RID-10A) untuk menentukan kandungan hasil hidrolisis. Pengukuran ini dilakukan untuk memperoleh data secara kualitatif dan kuantitatif. Pengukuran secara kualitatif diketahui dengan melihat waktu retensi yang muncul dari setiap larutan standar, sedangkan pengukuran secara kuantitatif diketahui dengan adanya luas puncak area setelah dibandingkan dengan standar. Penentuan waktu retensi dari tiap puncak ini berdasarkan pada interaksi gugus hidroksil pada masing-masing gula karbohidrat dengan kolom kalsium. Pada kromatogram, glukosa ditunjukkan dengan adanya puncak pada waktu sekitar 6 menit, arabinosa 8 menit, dan xilosa 7 menit. Pada Gambar 4.5 ini adalah kromatogram HPLC untuk setiap standar karbohidrat.



Gambar 4.5 Kromatogram standar karbohidrat

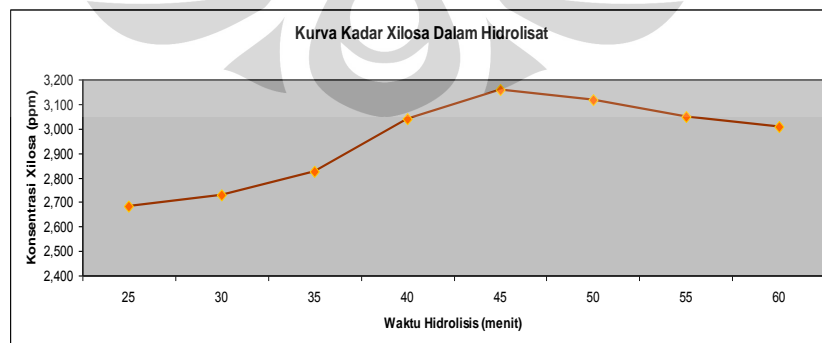


Gambar 4.6 Kromatogram standar xilitol 100 ppm

Semua hasil pengukuran HPLC berupa kromatogram dan grafik deret standar tertera pada Lampiran 2 dan 3.

4.6 Hasil Hidrolisis *Pollard* Gandum

Pada proses hidrolisis ini hanya dilakukan variasi waktu hidrolisis saja sedangkan perlakuan yang lain merupakan kondisi optimum pada penelitian sebelumnya.^{32,34} Variasi waktu hidrolisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 menit. Konsentrasi asam sulfat yang digunakan adalah 0,3 M. Kondisi hidrolisis optimum diperoleh pada suhu 121°C selama 45 menit.



Gambar 4.7 Kurva kadar xilosa dalam hidrolisat

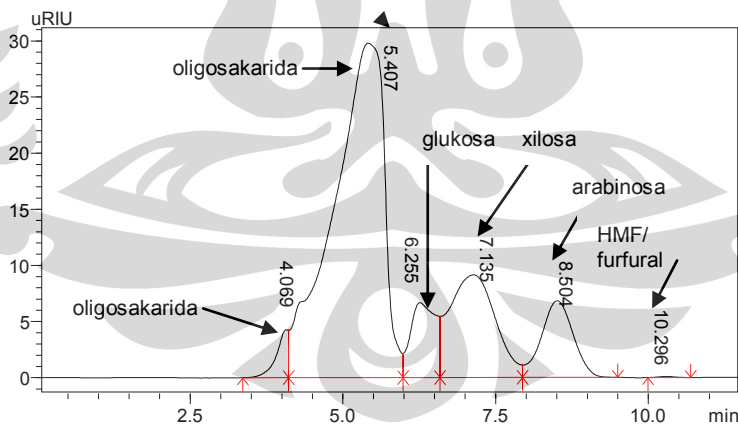
Data konsentrasi xilosa hasil hidrolisis (Gambar 4.7) menunjukkan bahwa semakin lama berlangsungnya proses hidrolisis kimiawi, maka semakin banyak ikatan-ikatan glikosida pada polisakarida yang terputus membentuk monomer-monomernya. Hal ini dapat dilihat dari kadar xilosa yang meningkat seiring dengan meningkatnya waktu hidrolisis pada suhu hidrolisis 121°C. Namun, pada menit ke-50, kadar xilosa berkurang dibandingkan dengan kadar xilosa pada menit ke-45. Hal ini dapat terjadi karena 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 masing-masing xilosa yang terbentuk.²⁵ Hal ini dapat dilihat dari warna hidrolisat yang semakin coklat dengan bertambahnya waktu hidrolisis karena adanya proses karamelisasi yang melibatkan degradasi gula. Warna coklat pada hidrolisat merupakan indikasi dari senyawa furfural dan HMF yang terbentuk. Jika reaksi tidak dikontrol, maka dapat memberikan hasil yang tidak menyenangkan, hangus, dan produk-produk yang pahit.²⁶

Pada proses hidrolisis akan diperoleh konsentrasi xilosa yang terdapat dalam sampel dengan menggunakan persamaan regresi linier dari standar xilosa. Tabel 4.1 menunjukkan persen kadar xilosa dari 2 gram sampel *pollard* gandum.

Tabel 4.1 Kadar xilosa dalam hidrolisat yang dihasilkan pada berbagai variasi waktu hidrolisis

Waktu Hidrolisis (menit)	% Kadar Xilosa (w/w)
25	8,05
30	8,19
35	8,47
40	9,12
45	9,48
50	9,35
55	9,15
60	9,03

Dari tabel tersebut, dapat dilihat bahwa persentase kadar xilosa tertinggi terjadi pada waktu hidrolisis selama 45 menit dengan kadar xilosa sebesar 9,48%. Hidrolisat pada waktu hidrolisis inilah yang digunakan untuk proses fermentasi agar diharapkan dapat menghasilkan xilitol secara optimal. Gambar kromatogram hidrolisat pada kondisi optimum dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Kromatogram hidrolisat sampel *pollard* gandum

Kromatogram hidrolisat menunjukkan bahwa dalam sampel *pollard* gandum terdapat produk utama berupa monomer xilosa dan produk samping

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

Selain xilosa dan arabinosa, juga terdapat glukosa yang merupakan salah satu monomer penyusun hemiselulosa. Oleh karena itu, glukosa yang dihasilkan kemungkinan bukan berasal dari hidrolisis selulosa tetapi dari hidrolisis hemiselulosa karena untuk memutus ikatan glikosida pada selulosa dibutuhkan konsentrasi asam yang lebih tinggi (1M).²⁷

4.7 Detoksifikasi Hidrolisat dengan Arang Aktif

Selama proses hidrolisis menggunakan asam sulfat, selain mendegradasi polisakarida, ternyata juga dapat dihasilkan senyawa-senyawa pengotor yang bersifat toksik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Apabila senyawa-senyawa tersebut tidak dihilangkan, pertumbuhan mikroorganisme akan terganggu dan proses fermentasi tidak dapat berjalan dengan baik.²⁹

Inhibitor bagi pertumbuhan mikroorganisme ini dapat dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu furfural dan 5-hidroksimetil furfural (hasil samping turunan gula), asam asetat (substansi yang dilepaskan dari struktur hemiselulosa), beberapa senyawa aromatik, dan fenolik (produk degradasi lignin), serta inhibitor yang berasal dari logam atau mineral dalam *pollard* gandum. Inhibitor ini dapat dihilangkan dari hidrolisat dengan metode

detoksifikasi untuk meningkatkan produk xilitol. Metode tersebut dapat dilakukan dengan penambahan arang aktif pada hidrolisat untuk meminimalisasi kadar senyawa beracun pada hidrolisat dengan cara adsorpsi, sehingga senyawa-senyawa toksik tersebut dapat ditarik ke dalam pori-pori karbon aktif.

Dalam penelitian ini, proses detoksifikasi dilakukan dengan menambahkan 1% arang aktif (w/v) ke dalam hidrolisat sampel *pollard* gandum dan dikocok dengan *shaker* selama 30 menit. Metode detoksifikasi dengan 1% arang aktif dapat mengadsorpsi sebagian besar komponen toksik pada hidrolisat, tanpa adanya xilosa yang hilang.³⁰ Setelah itu, filtrat dan endapannya disaring dengan menggunakan kertas saring biasa yang dirangkap dua. Filtrat yang didapatkan lebih bening dari sebelumnya yang kemungkinan diakibatkan oleh senyawa-senyawa toksik dan zat warna yang telah berkurang.

4.8 Fermentasi dengan Khamir *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247

Media yang digunakan sebagai media tumbuh khamir adalah YMA. Untuk proses fermentasi, dilakukan pembuatan media aktivasi (*starter*) yang berisi xilosa murni dengan konsentrasi tertentu yang ditambahkan media fermentasi dan suspensi sel khamir. Media ini diinkubasi selama 48 jam. Tujuan pembuatan media aktivasi ini adalah untuk mengaktifkan khamir *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 yang semula berada pada

media pertumbuhan berupa glukosa dipindahkan ke dalam media fermentasi cair yang berisi xilosa. Oleh karena itu, diharapkan khamir telah siap mengubah xilosa menjadi xilitol ketika media aktivasi ini dimasukkan ke dalam substrat. Media fermentasi yang ditambahkan, 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.

Sebelum dilakukan proses fermentasi, dilakukan perhitungan jumlah sel khamir yang terdapat dalam suspensi. Hal ini dilakukan dengan menggunakan metode kamar hitung dan spektrofotometri. Adapun keunggulan kedua metode tersebut dibandingkan dengan metode yang lainnya adalah metode ini dapat menghitung khamir pada saat itu juga digunakan dan tidak bergantung pada waktu, sehingga dapat lebih dipertanggungjawabkan hasilnya. Pada metode kamar hitung, suspensi sel yang didapatkan berjumlah $2,195 \times 10^7$ sel. Pada penelitian ini, digunakan 2 mL suspensi sel, sehingga terdapat $4,390 \times 10^7$ sel yang dimasukkan ke dalam media. Kelemahan metode ini adalah tidak dapat membedakan antara sel-sel yang hidup dari yang mati sehingga yang dihitung adalah jumlah total sel yang ada di dalam populasi. Akan tetapi, hal tersebut dapat diatasi dengan menambahkan larutan biru metilen 1% dalam air. Sel yang hidup tidak menyerap warna sedangkan sel yang mati akan berwarna biru.⁴⁹

Suspensi sel ini juga dihitung dengan menggunakan metode spektrofotometri

dengan tujuan untuk mencari panjang gelombang maksimum. Metode ini menggunakan prinsip turbidimetri (kekeruhan) yang didasarkan bahwa partikel-partikel kecil menyebarkan cahaya secara proporsional. Semakin keruh sel, semakin banyak jumlah sel dalam suspensi dan semakin kecil intensitas cahaya yang lolos maka semakin tinggi absorbansi yang didapatkan atau lebih sering disebut sebagai rapat optis (*Optical Density* atau *OD*).⁴⁹ Pada metode ini, diperoleh panjang gelombang maksimum pada 400 nm dengan nilai absorbansi sebesar 2,073. Panjang gelombang tersebut yang akan digunakan untuk pengukuran berikutnya tanpa menggunakan metode kamar hitung kembali dalam hal mengukur jumlah sel khamir yang terdapat di dalam suspensi sel.

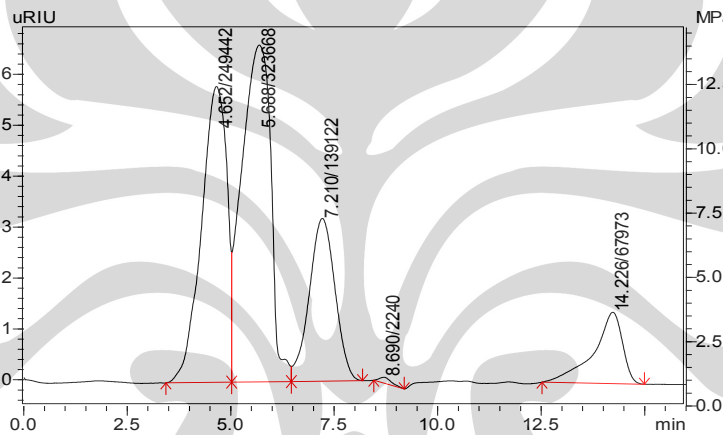
Fermentasi dilakukan menggunakan metode curah, yaitu fermentasi yang dilakukan dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi. Sebelum inokulum dimasukkan ke dalam media fermentasi, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi 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*.³⁵ Reaksi ini biasa terjadi pada makanan yang mengandung asam amino dan karbohidrat, yang dipanaskan pada suhu tinggi, misalkan pada pemanggangan roti. Reaksi ini disebut juga reaksi pencokelatan karena menyebabkan perubahan warna menjadi kecokelatan dan rasa agak pahit pada makanan.

Inokulum dimasukkan ke dalam media fermentasi dan diinkubasi dalam *incubator shaker* agar suhu fermentasi tetap terjaga. Penggunaan *shaker* bertujuan 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.

4.9 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 adalah 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 fermentasi, kontrol xilosa murni ditambahkan nutrisi dan garam-garam untuk pertumbuhan khamir, kemudian disterilisasi. Pengambilan hasil fermentasi dilakukan setiap 12 jam, sampai jam ke-60. 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.

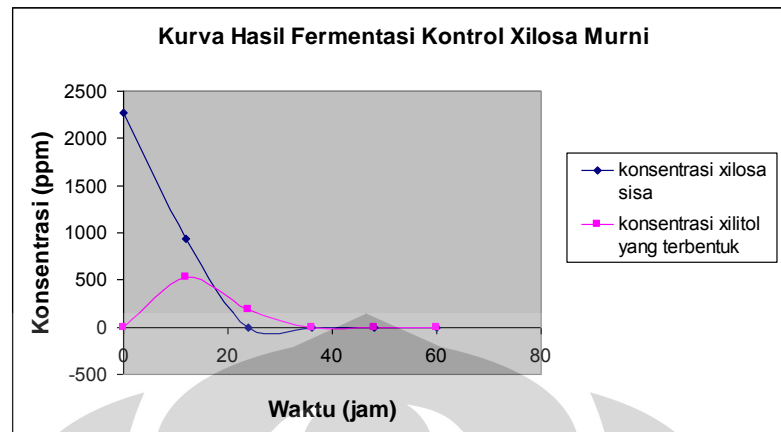


Gambar 4.9 Kromatogram hasil fermentasi menggunakan xilosa murni

Tabel 4.2 dan Gambar 4.10 menunjukkan data dan kurva hasil fermentasi kontrol xilosa murni.

Tabel 4.2 Hasil fermentasi xilitol dari xilosa murni

Waktu	Xilosa Sisa	Xilitol	% Konversi Xilosa Menjadi Xilitol
0	2392	0	0
12	933,23	525,98	22,87
24	-----	190,69	8,29
36	-----	-----	0
48	-----	-----	0
60	-----	-----	0



Gambar 4.10 Kurva hasil fermentasi untuk kontrol xilosa murni

Pada penelitian ini, dilakukan fermentasi pada xilosa murni untuk menentukan kurva pertumbuhan khamir *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247.³⁴ 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.

Pada penelitian ini, diperoleh data bahwa produk xilitol mulai terbentuk pada jam ke-12. Hal ini dapat disebabkan karena pada jam ke-12, khamir telah memasuki fase 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. Produksi xilitol mencapai konsentrasi tertinggi pada jam ke-12 dengan persen konversi sebesar 22,87%. Hal ini dapat disebabkan karena sebagian besar xilosa ditujukan untuk produksi xilitol dan hanya sedikit yang digunakan untuk pertumbuhan, sebab khamir telah memasuki fase statis.⁵⁰

Pada fase logaritma, mulai terbentuk metabolit seperti xilitol karena kandungan NADH dalam sel mengalami akumulasi. Apabila NADH mengalami akumulasi, maka aktivitas enzim *xylose reductase* lebih dominan dibandingkan dengan enzim *xylitol dehidrogenase*. Enzim *xylose reductase* merupakan enzim yang berperan dalam mereduksi xilosa menjadi xilitol. Tingginya aktivitas enzim *xylose reductase* menyebabkan produksi xilitol oleh khamir meningkat.²

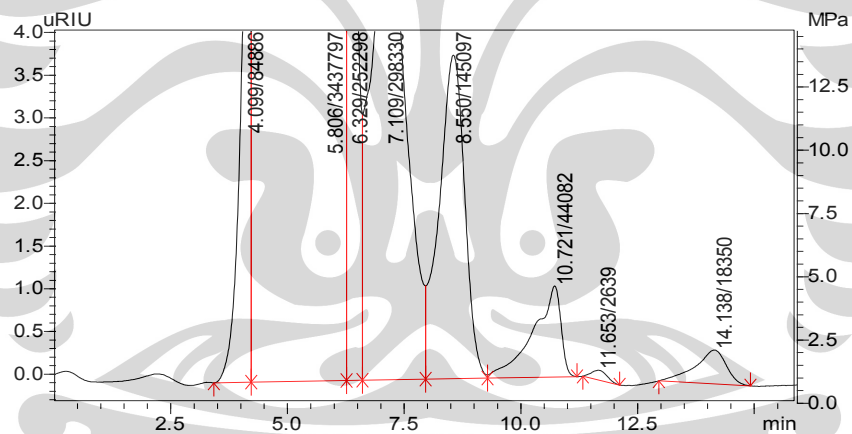
Peran oksigen merupakan faktor yang penting dalam produksi xilitol. Pada kondisi oksigen yang terbatas (anaerob), jalur oksidatif fosforilasi tidak dapat mengoksidasi kembali NADH yang terbentuk, sehingga konsentrasi NADH dalam sel meningkat. Tingginya konsentrasi NADH dalam sel akan menaikkan aktivitas enzim *xylose reductase* yang menyebabkan akumulasi xilitol.²

Pada jam ke-24, jumlah xilitol mengalami penurunan. Penurunan jumlah xilitol ini terjadi karena xilosa sebagai sumber karbon telah habis. Oleh karena itu, xilitol digunakan sebagai sumber karbon oleh khamir penghasil enzim *xylitol dehidrogenase* dan *xilulokinase*. Pada kondisi ini, terjadi penurunan produk xilitol yang terbentuk. Xilitol akan dioksidasi menjadi xilulosa oleh enzim *xylitol dehidrogenase* dan kemudian akan difosforilasi oleh enzim *xilulokinase* membentuk xilulosa-5-fosfat dan akan masuk ke dalam jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP).^{2,23,24}

Khamir mulai memasuki fase kematian pada jam ke-36. Pada fase ini, khamir tidak lagi memproduksi enzim dan tidak aktif lagi. Oleh karena itu, tidak dihasilkan metabolit-metabolit dalam sampel.

4.10 Hasil Fermentasi Substrat

Pada penelitian ini, digunakan substrat *pollard* gandum yang diberi perlakuan detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi. Pengambilan produk dilakukan setiap 12 jam dan didapatkan persen konversi produk xilitol tertinggi pada jam ke-24 untuk substrat hasil detoksifikasi dan jam ke-12 untuk substrat tanpa detoksifikasi dan kontrol xilosa murni.



Gambar 4.11 Kromatogram hasil fermentasi substrat didetoksifikasi

Tabel 4.3 Data hasil fermentasi substrat dengan detoksifikasi

Waktu (jam)	Xilitol		% <i>yield</i> dalam 2 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilitol (ppm)		
0	0	0	0	0
12	11007	92,550	0,28	3,43
24	29542	233,575	0,70	8,65
36	0	0	0	0
48	0	0	0	0
60	0	0	0	0

Pada Tabel 4.3, dapat dilihat bahwa pembentukan xilitol mulai terjadi pada waktu fermentasi jam ke-12. Hal ini dapat terjadi karena khamir mulai menghasilkan metabolit-metabolitnya. Salah satunya adalah xilitol. Pembentukan xilitol tertinggi untuk substrat hasil detoksifikasi terjadi pada waktu fermentasi jam ke-24 dengan persen *yield* sebesar 0,70% dan persen konversi xilosa menjadi xilitol sebesar 8,65%. Setelah waktu fermentasi 24 jam, tidak lagi dihasilkan xilitol. Hal ini dapat terjadi karena xilosa sebagai sumber karbon telah habis sehingga khamir tidak lagi menghasilkan xilitol.

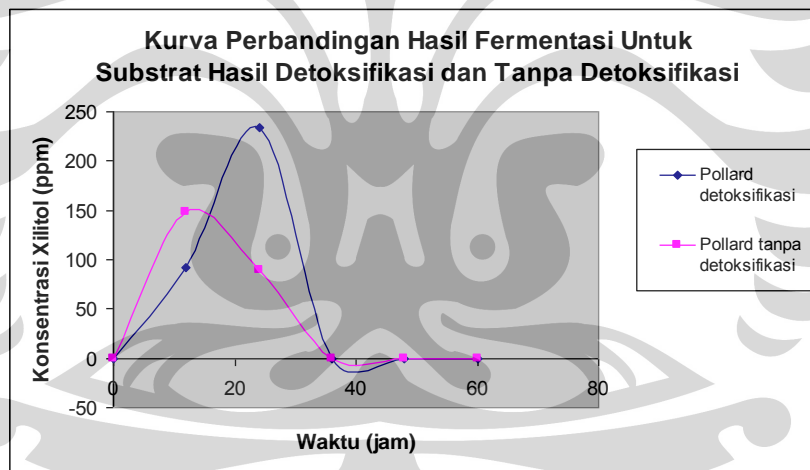
Tabel 4.4 Data hasil fermentasi substrat tanpa detoksifikasi

Waktu (jam)	Xilitol		% <i>yield</i> dalam 2 g sampel	% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilitol (ppm)		
0	0	0	0	0
12	18350	148,420	0,45	5,31
24	10526	88,890	0,27	3,18
36	0	0	0	0
48	0	0	0	0
60	0	0	0	0

Pada Tabel 4.4, dapat dilihat bahwa pembentukan xilitol mulai terjadi pada waktu fermentasi jam ke-12. Hal ini dapat terjadi karena khamir

penghasil enzim *xylose reductase* mulai mereduksi xilosa menjadi xilitol. Pembentukan xilitol tertinggi untuk substrat tanpa detoksifikasi terjadi pada waktu fermentasi jam ke-12 dengan persen *yield* sebesar 0,45% dan persen konversi xilosa menjadi xilitol sebesar 5,31%. Setelah waktu fermentasi 12 jam, xilitol yang dihasilkan berkurang. Hal ini dapat terjadi karena jumlah xilosa sebagai sumber karbon telah berkurang sehingga xilitol yang terbentuk akan lebih sedikit dan apabila persediaan xilosa telah habis, maka xilitol sebagai hasil metabolit tidak dihasilkan lagi.

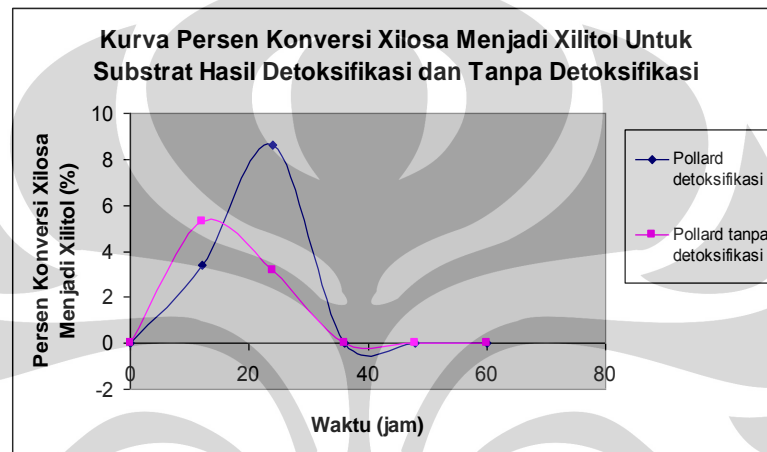
Gambar 4.12 merupakan kurva perbandingan hasil fermentasi substrat detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi.



Gambar 4.12 Kurva perbandingan hasil fermentasi untuk substrat hasil detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi

Berdasarkan kurva hasil fermentasi, dapat dilihat bahwa konsentrasi xilitol terbesar terdapat pada substrat hasil detoksifikasi, dengan persen *yield* xilitol pada waktu fermentasi optimum (24 jam), yaitu sebesar 0,70%. Pada substrat yang diberi perlakuan detoksifikasi, komponen inhibitor yang

terdapat pada hidrolisat diadsorpsi oleh arang aktif, sehingga proses biokonversi xilosa menjadi xilitol berjalan lebih baik dan menghasilkan *yield* xilitol yang lebih tinggi dibandingkan substrat yang lain. Pada Gambar 4.13 dapat dilihat kurva perbandingan persen konversi xilosa menjadi xilitol untuk substrat dengan dan tanpa detoksifikasi.



Gambar 4.13 Kurva persen konversi xilosa menjadi xilitol untuk substrat hasil detoksifikasi dan tanpa detoksifikasi

Berdasarkan kurva persen konversi xilosa menjadi xilitol tersebut, dapat dilihat bahwa substrat yang diberi perlakuan tanpa detoksifikasi mempunyai persen konversi yang lebih rendah dibandingkan dengan substrat yang didetoksifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan terhadap sampel sebelum proses fermentasi tersebut, berpengaruh positif pada proses biokonversi xilosa menjadi xilitol oleh khamir. Dengan adanya perlakuan detoksifikasi terhadap substrat, sebagian besar komponen inhibitor yang dapat menghambat proses fermentasi oleh khamir dapat dihilangkan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum hidrolisis *pollard* gandum pada penelitian ini adalah pada suhu 121°C selama 45 menit dan konsentrasi asam sulfat sebesar 0,3 M, dengan kadar xilosa yang dihasilkan sebesar 9,48% (w/w).
2. Produk xilitol hasil fermentasi tertinggi, didapatkan pada waktu fermentasi 24 jam untuk substrat yang didetoksifikasi yaitu dengan persen konversi xilitol tertinggi sebesar 8,65%. Sedangkan untuk substrat tanpa detoksifikasi, diperoleh waktu fermentasi optimum pada jam ke-12 dengan persen konversi xilitol tertinggi sebesar 5,31%.
3. Persen *yield* xilitol tertinggi terdapat pada substrat yang didetoksifikasi, yaitu sebesar 0,70%.
4. Fermentasi pada substrat yang mendapat perlakuan detoksifikasi menghasilkan produk xilitol dengan persen konversi yang lebih tinggi daripada substrat yang tidak mendapat perlakuan tersebut.

5.2 Saran

1. Perlu dicari metode detoksifikasi lain yang dapat dengan optimal menyerap senyawa toksik yang dapat menghambat pertumbuhan khamir tanpa adanya xilosa yang hilang.

2. Untuk mendapatkan xilitol yang lebih banyak perlu dicari bahan baku alternatif lain yang lebih efektif dan efisien.
3. 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).
4. Untuk memperoleh kadar xilosa yang lebih tinggi, perlu dilakukan variasi konsentrasi asam yang digunakan untuk hidrolisis maupun dicari metode hidrolisis yang lebih efektif dalam menghidrolisis lignoselulosa yang terdapat di dalam sampel sehingga dapat terhidrolisis sempurna.
5. Perlu dipelajari studi kinetika laju reaksi pembentukan xilosa menjadi xilitol untuk mengetahui kecepatan reaksi (*rate reaction*) dari pembentukan xilitol.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu, dasar-dasar dan penggunaan*, terjemahan dari *Wood chemistry, fundamental and applications*, oleh Sastrohamidjoyo, H. Gajah Mada University Press, Yogyakarta: viii + 390 halaman.
2. 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.
3. Makinen, K.K. "History, Safety, and Dental Properties of Xylitol." 7 halaman. <http://www.xylitol.org/drmakinen.htm>. 16 Juni 2009, pukul 11.00.
4. Saha, C. B. 2003. *Hemicellulose Biocoverison*. *J Ind, Microbial Biotech*, 30: 279-291.
5. <http://nanugroho.blogspot.com/menjadikan-gandum-sebagai-pengganti.html>. 16 Juni 2009, pukul 13.58.
6. <http://ditjentan.deptan.go.id>. 16 Juni 2009, pukul 14.22.
7. <http://cisaruafarm.wordpress.com/pollard-dedak-gandum-triticum-sativum-lank>. 16 Juni 2009, pukul 09.40.
8. Fang, J. M., Fowler, P., Tomkinson, J., Hill, C. A. S. 2001. Preparation and Characterisation of Methylated Hemicelluloses From Wheat Straw. *Carbohydrate polymers*, 47:285-293.

9. <http://isroi.wordpress.com/karakteristik-lignoselulosa-sebagai-bahan-baku-bioetanol>. 16 Juni 2009, pukul 13.36.
10. Palonen, H. 2004. *Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose*. VTT Biotechnology. Espoo.
11. Nelson, D. L., Michael, M. C. 2005. *Principles of Biochemistry*. Lehninger. Hlm. 247-252. 4th Edition. WH Freeman and Company, Newyork, Hlm. 247-252.
12. NurBayti, S. 2002. *Produksi dan Karakterisasi Selulase Penicillium nalgiovense Laxa dari Sarang Rayap*. Karya Utama Magister Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
13. Murthy, G. S., Sridhar, S., Sunder, M. S., Shankaraiah, B., Ramakrishna, M. 2005. Concentration of Xilose Reaction Liquor by Nanofiltration For the Production of Xylitol Sugar Alcohol. *Separation and Purification Technology*, 44:205-211.
14. Sellman, S. "Xylitol – Our Sweet Salvation?" 9 halaman. <http://www.laleva.cc/food/xylitol.html>. 16 Juni 2009, pukul 15.28.
15. "Reduced-calorie sweeteners Xylitol." 3 halaman. <http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html>. 16 Juni 2009, pukul 15.15.
16. Kontiokari, T., Uhari, M., Koskela, M. 1995. *Effect of Xylitol on Growth of Nasopharyngeal Bacteria in Vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39 (8): 1820-1823.
17. 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. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.

18. Buhner, J., Anglebevor, F. A. "Dilute Acid Hydrolysis and Fermentation of Corn Fiber to Xylitol." 2 halaman.

<http://www.p2pays.org/ref/35/34369.pdf>. 16 Juni 2009, pukul 16.24.

19. 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.
20. Ingraham, J. L. & C. A. Ingraham. 2000. *Introduction of Microbiology 2nd Ed.* Brooks/Cole-Thomson learning. California. USA.
21. Pelczar, M., Chan, E. C. S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi.* Jakarta: UI Press.
22. Fitrianiingsih. 2005. *Inventarisasi dan Identifikasi Khamir Dari Serasah di Taman Nasional Gunung Halimun.* Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
23. 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. *App Microbiol Biotechnol.* 19:256-260.
24. 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.

25. Neureiter, M. H., H. Danner, C. Thomasser, dan R. Bran. "Dilute Acid Hydrolysis of Softwood Chips for the Production of Hemicellulose Sugars." 2 halaman.
<http://bioproduct.bioenergy.gov/pdfs/bcotal/abstract/12/2386.pdf>.27
Juni 2009, pukul 13.21.
26. Winarno, F. G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Media Pustaka.
27. Nurmalia. 2007. *Studi Optimasi Hidrolisis Ampas Tebu Untuk Menghasilkan D-Xilosa Sebagai Bahan Baku Pembuatan Xilitol*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
28. Pessoa, JR. A., Mancilha, I. M., Sato, S. 1997. Acid Hydrolysis of Hemicellulose from Sugarcane Bagasse. *Braz. J. Chem. Eng.* 14 (3).
29. Villareal, M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A. & Silva J.B. 2005. Detoxification procedure of eucalyptus hemicellulose hydrolyzate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006) 17-24.
30. Mussatto, Solange I., Roberto, Ines C. 2004. "Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production." *Biotechnol. Prog.* (20): 134-139.
31. Roberto, I. C., M. Mancilha, C.A. de Souza, M.G.A. Felipe, S. Sato, H. F. de Castro. 1994. "Evaluation of Rice Straw Hemicellulose Hydrolyzate in Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*". University of Sao Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences. Brazil.

32. Faisal, Ahmad. 2008. *Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim Xylitol Dehidrogenase (XDH) dari Hasil Hidrolisis Ampas Tebu*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
33. "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). 16 Juni 2009, pukul 14.00.
34. Riki. 2008. *Seleksi Berbagai Spesies Khamir Untuk Menghasilkan Xilitol Menggunakan Bahan Dasar D – Xilosa*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
35. www.Food-info.net/uk/color/Maillard.htm. 30 Oktober 2009, pukul 22.42.
36. Fatmawati, Ria. 2009. *Produksi Xilitol Dari Hidrolisat Hemiselulosa Jerami Padi (Oryza sativa) Dengan Khamir Candida fukuyamaensis*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
37. Puspita, Cicilia Aristya D. 2009. *Pemanfaatan Limbah Serbuk Gergajian Kayu Jati (Tectona grandis) dan Kayu Melinjo (Gnetum gnemon) Untuk Produksi Xilitol oleh Khamir Candida fukuyamaensis UICC Y-247*. Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
38. 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.
39. Granstrom, T.B. 2002. *Biotechnological Production of Xylose with Candida yeast*. Technical Biochemistry Report.

40. Onishi, H. & Suzuki T. 1969. Microbial Production of Xylitol from Glucose. *Appl Microbiol.* 72: 1031-1035.
41. 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.
42. Kim, S.Y. & Kim S.Y. 1998. Increase of Xylitol yield by Feeding Xylose and Glucose in *Candida tropicalis*. *App Microbiol Bitechnol.* 50: 419-425.
43. 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.
44. Ko, B.S., Kim J. & Kim J.H. 2006. Production of Xylitol from D-xylose by a *Xylitol dehidrogenase* Gene-Disrupted Mutant of *Candida tropicalis*. *Appl and Environment Microbiol.* 72: 4207-4213.
45. Mayerhoff, Z.D.V.L., Inez C.R. & Silvio S.S. 1997. Xylitol Production from Rice Straw Hemicellulose Hydrolysis Using Different Yeast Strain. *Biotechnol letters.* 19: 407-409.
46. Carvalho, W., Santos J.C., Canilha J., Silva S.S., Perego P. & Converti A. 2005. Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysis Metabolic Behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Calcium alginate. *Biochem Engineering.* 25: 25-31.

47. Kim, S.Y., Oh D.H. & Kim D.H. 1999. Evaluation of Xylitol Production from Corn Cob Hemicellulose Hydrolysisate by Using *Candida parapsilosis*. *Biotechnol letters*. 21: 891-895.
48. Canilha J., Carvalho, W. & Silva J.B. 2005. Influence of Medium Composition in Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysisate. *World J. Microbiol Biotechnol*. 21: 1087-1093.
49. Setiasih, S., Sri Handayani, Susilowati H.S., Endang Saepudin. 2006. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.
50. Sampaio, C. Fabio, Mantovani C. Hilario. 2005. Bioconversion of D-xyllose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. *Process Biochemistry* 40: 3600-3606.

LAMPIRAN 1

Penentuan kadar air *pollard* gandum

Berat cawan porselin kosong 1 = 34,0191 g

Berat cawan porselin kosong 2 = 34,4259 g

Berat cawan porselin kosong 3 = 36,5756 g

Berat *pollard* gandum 1 = 1,0015 g

Berat *pollard* gandum 2 = 1,0003 g

Berat *pollard* gandum 3 = 1,0005 g

Berat cawan porselin dan isi 1 = 35,0206 g

Berat cawan porselin dan isi 2 = 35,4262 g

Berat cawan porselin dan isi 3 = 37,5761 g

	Cawan 1 (gram)	Cawan 2 (gram)	Cawan 3 (gram)
1	34,9528	35,3615	37,5104
2	34,8618	35,2683	37,4176
3	34,9543	35,3597	37,5100
4	34,9504	35,3578	37,5100
5	34,9481	35,3552	37,5055
6	34,9504	35,3590	37,5084
7	34,9502	35,3565	37,5070
8	34,9394	35,3433	37,4909
9	34,9411	35,3483	37,4981
10	34,9495	35,3569	37,5073
11	34,9551	35,3634	37,5112
12	34,9653	35,3721	37,5207
13	34,9557	35,3650	37,5101
14	34,9572	35,3677	37,5133
15	34,9604	35,3691	37,5133
16	34,9782	35,3884	37,5349
17	34,9626	35,3704	37,5169
18	34,9980	35,4086	37,5584

19	34,9611	35,3682	37,5121
20	34,9577	35,3642	37,5108
21	34,9572	35,3626	37,5111
22	34,9559	35,3628	37,5108
23	34,9570	35,3645	37,5110
24	34,9547	35,3635	37,5091
25	34,9556	35,3636	37,5092
26	34,9540	35,3609	37,5093
27	34,9555	35,3622	-

Dari data di atas, diperoleh tiga berat konstan dari cawan porselin 3.

$$\text{Berat rata – rata dari cawan 3} = \frac{37,5091 \text{ g} + 37,5092 \text{ g} + 37,5093 \text{ g}}{3}$$

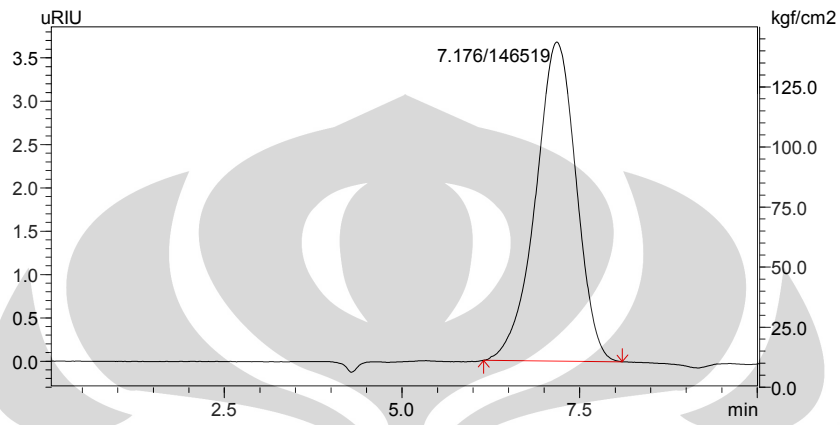
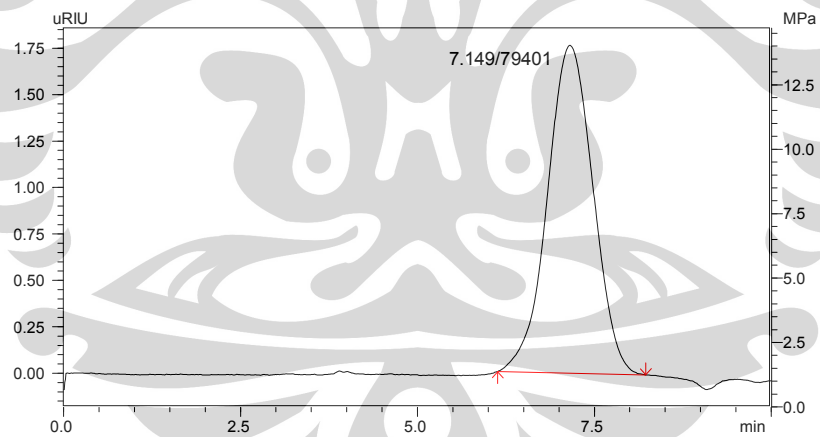
$$= \frac{112,5276 \text{ g}}{3}$$

3

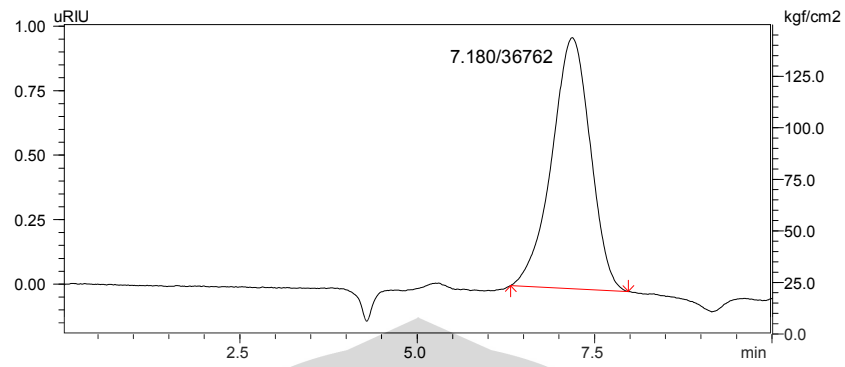
$$= 37,5092 \text{ gram}$$

$$\text{Presentase kadar air} = \frac{(37,5761 \text{ g} - 37,5092 \text{ g}) \times 100 \%}{1,0005 \text{ g}}$$

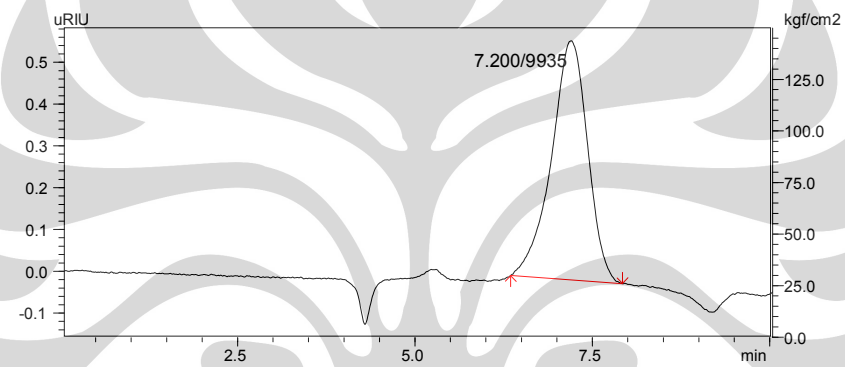
$$= 6,69\%$$

LAMPIRAN 2**Kromatogram dan kurva standar xilosa****1. 1000 ppm****2. 500 ppm**

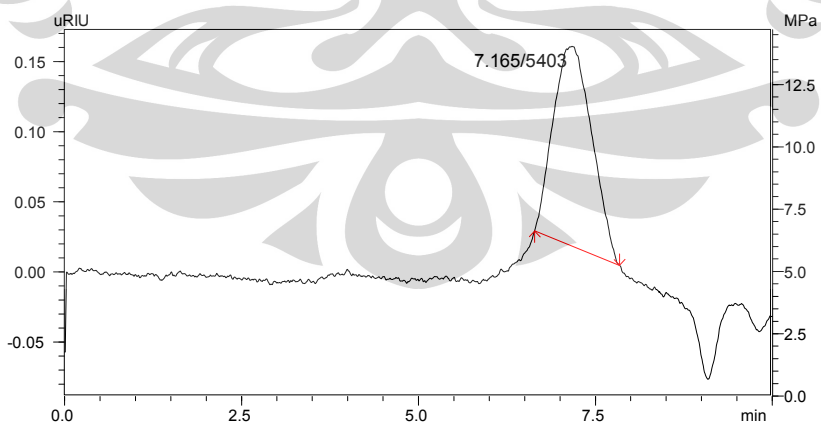
3. 250 ppm



4. 100 ppm

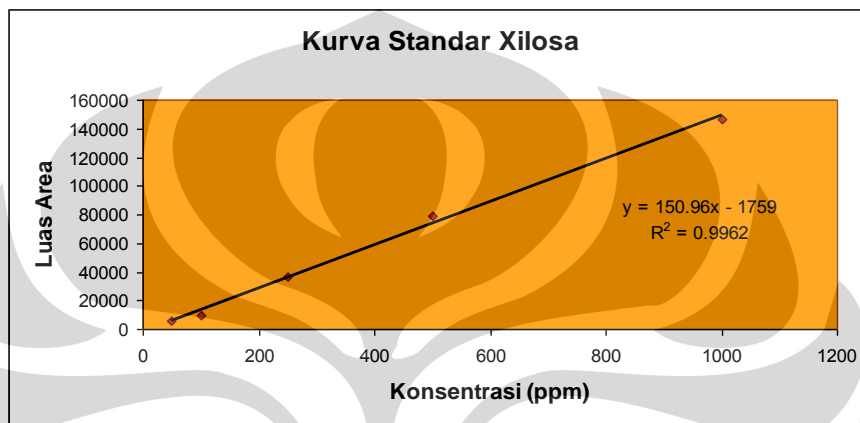


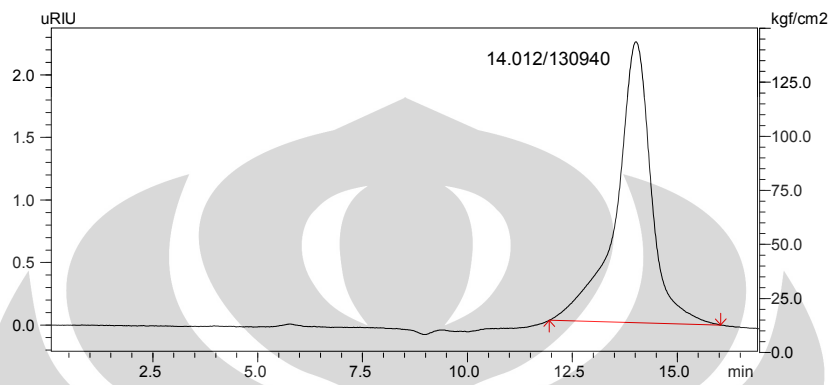
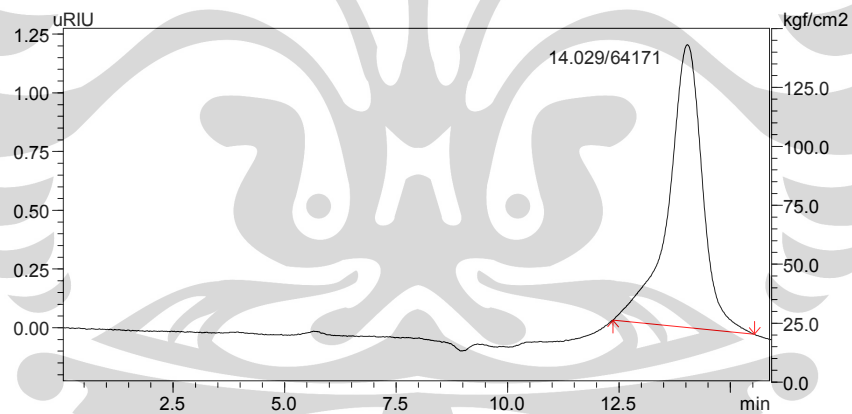
5. 50 ppm



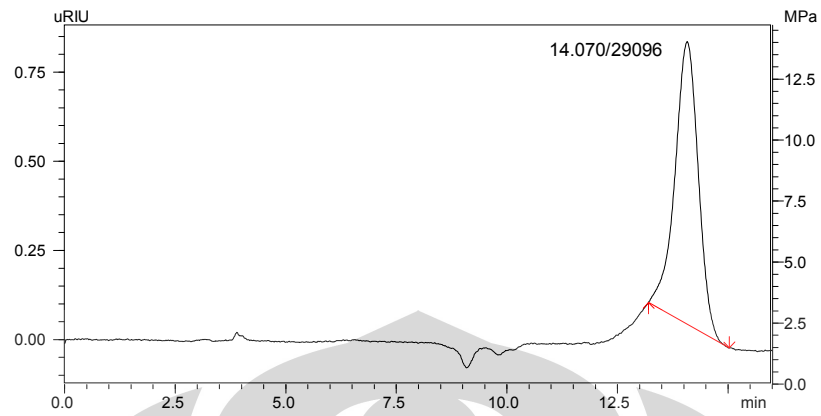
Grafik Standar Xilosa

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
50	5403
100	9935
250	36762
500	79401
1000	146519

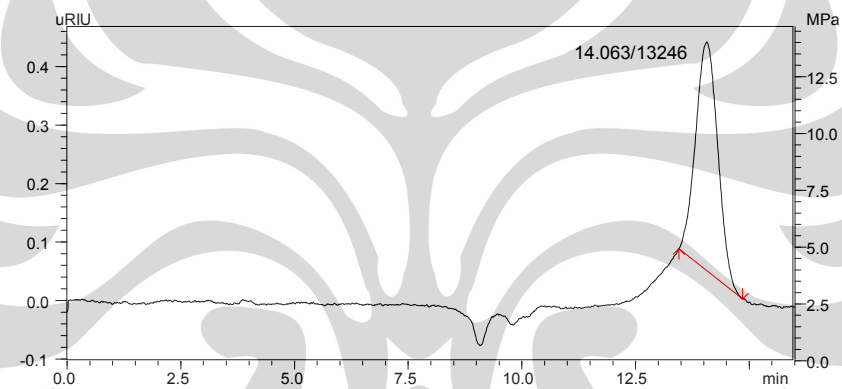


LAMPIRAN 3**Kromatogram dan kurva standar xilitol****1. 1000 ppm****2. 500 ppm**

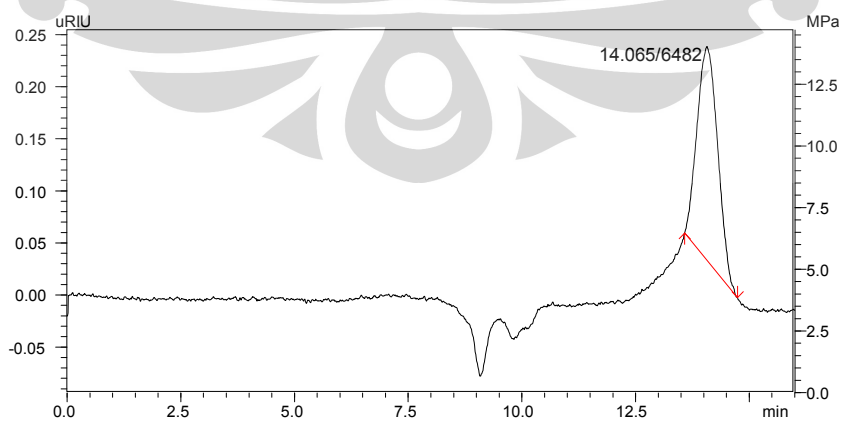
3. 250 ppm



4. 100 ppm

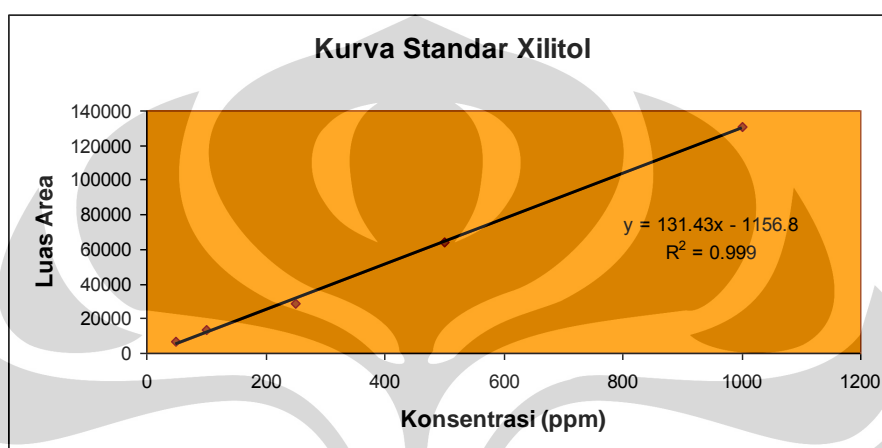


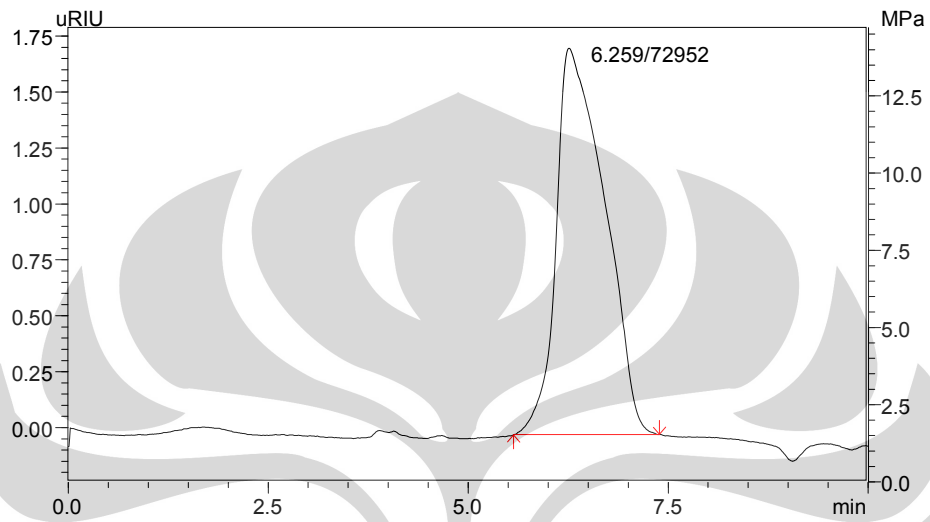
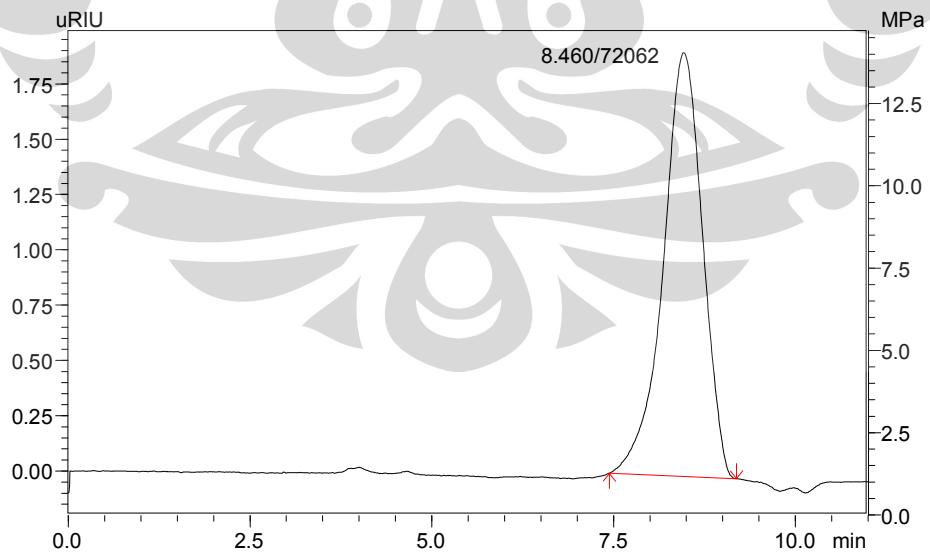
5. 50 ppm



Grafik Standar Xilitol

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
50	6482
100	13246
250	29096
500	64171
1000	130940

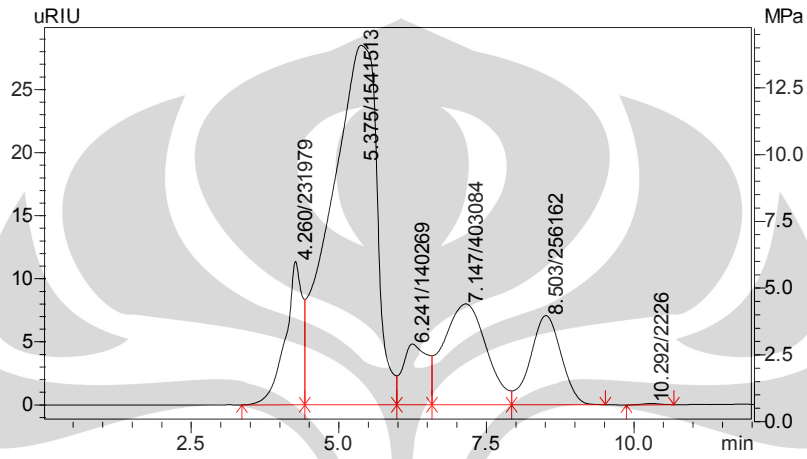


LAMPIRAN 4**Kromatogram standar glukosa dan arabinosa****Kromatogram Standar Glukosa 500 ppm****Kromatogram Standar Arabinosa 500 ppm**

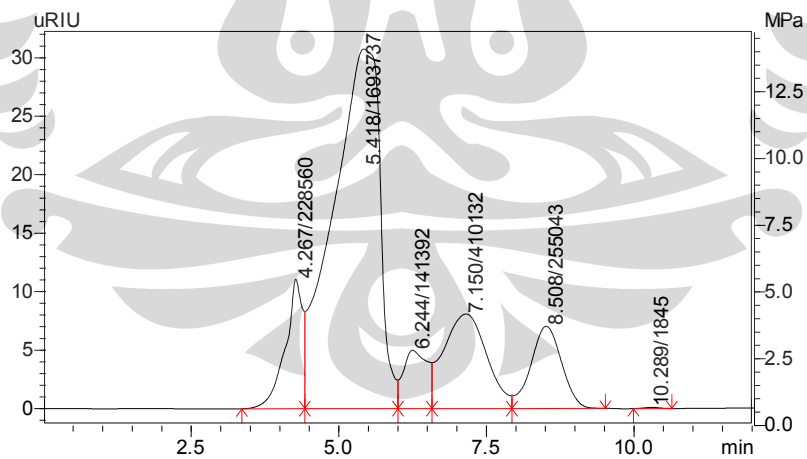
LAMPIRAN 5

Kromatogram hidrolisat sampel *pollard* gandum dengan variasi waktu hidrolisis

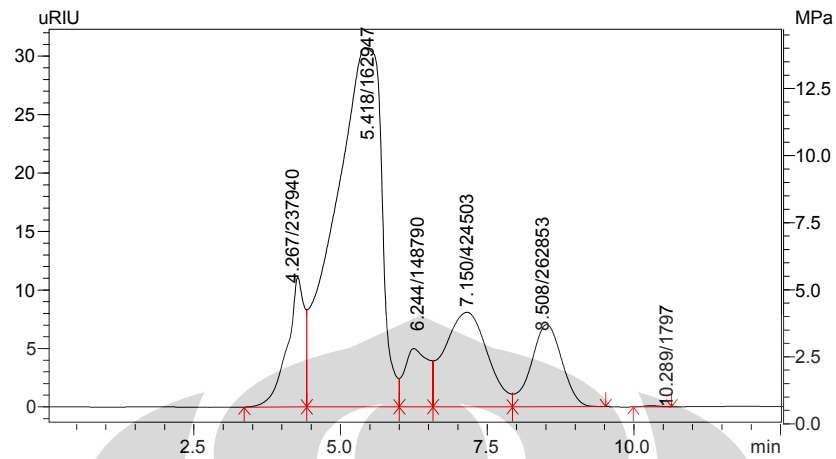
1. Waktu hidrolisis 25 menit



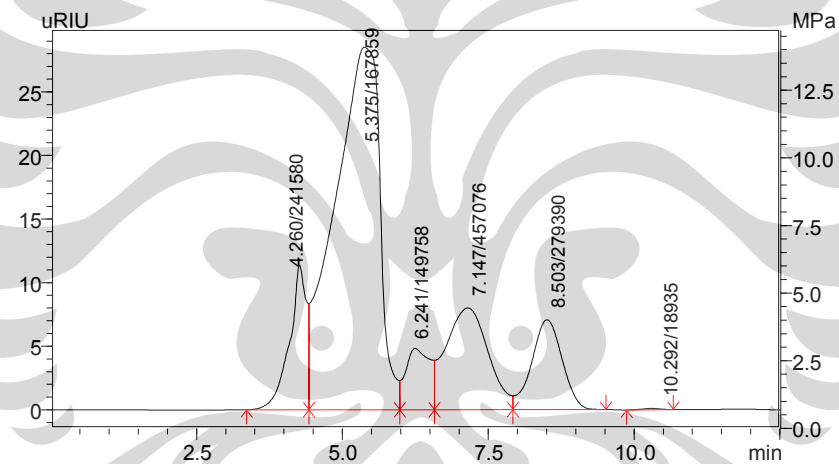
2. Waktu hidrolisis 30 menit



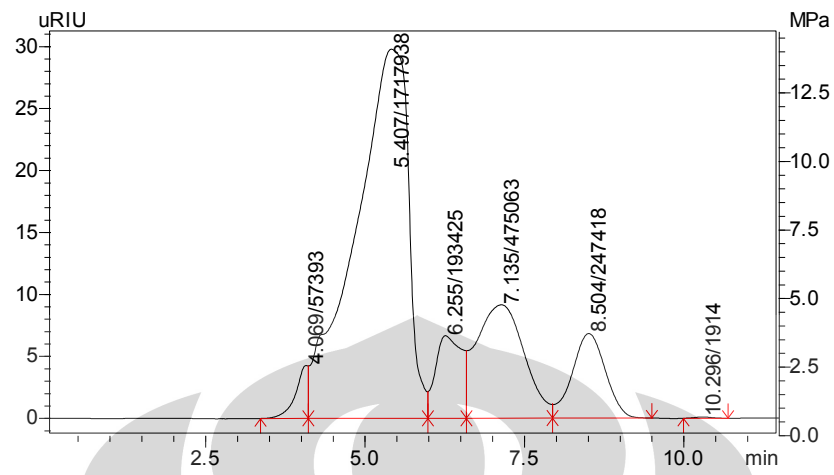
3. Waktu hidrolisis 35 menit



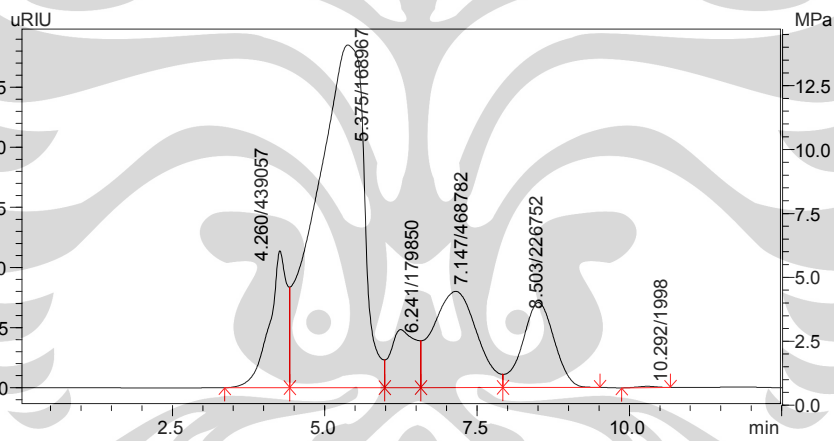
4. Waktu hidrolisis 40 menit



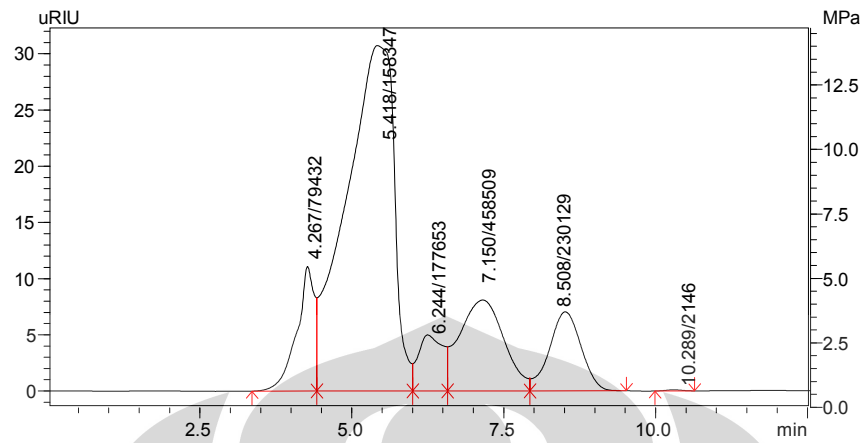
5. Waktu hidrolisis 45 menit



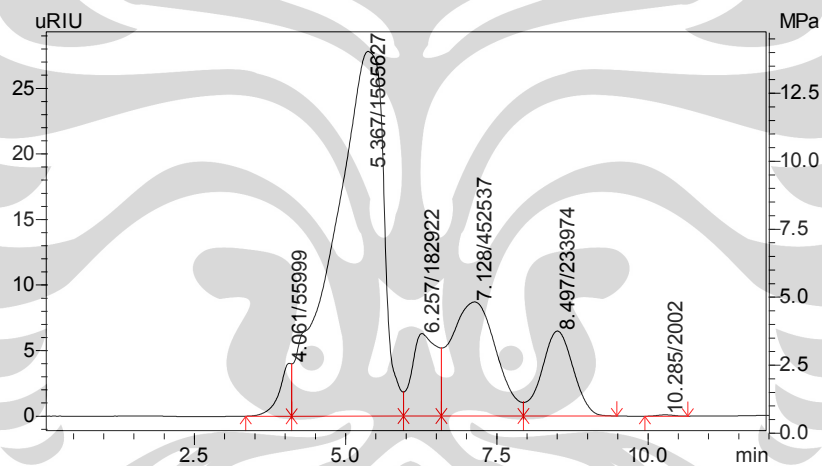
6. Waktu hidrolisis 50 menit



7. Waktu hidrolisis 55 menit



8. Waktu hidrolisis 60 menit



LAMPIRAN 6

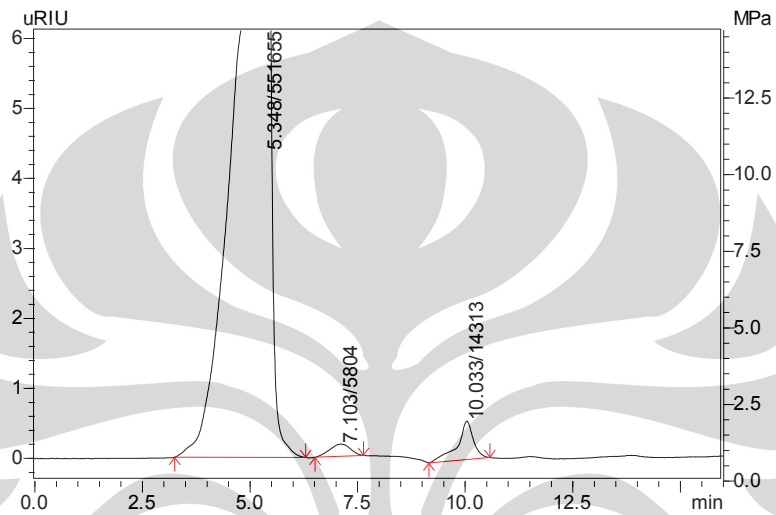
Data hasil perhitungan kadar xilosa pada hidrolisat dengan suhu hidrolisis 121°C

Waktu Hidrolisis (menit)	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Xilosa (g/L)	Xilosa (g/ mL)	Xilosa (g/60 mL)	% Yield (w/w)
25	403084	2681,873	2,682	$2,682 \times 10^{-3}$	0,161	8,05
30	410132	2728,563	2,729	$2,729 \times 10^{-3}$	0,164	8,19
35	424503	2823,675	2,824	$2,824 \times 10^{-3}$	0,169	8,47
40	457076	3039,448	3,039	$3,039 \times 10^{-3}$	0,182	9,12
45	475063	3158,697	3,159	$3,159 \times 10^{-3}$	0,190	9,48
50	468782	3116,991	3,117	$3,117 \times 10^{-3}$	0,187	9,35
55	458509	3048,940	3,049	$3,049 \times 10^{-3}$	0,183	9,15
60	452537	3009,474	3,010	$3,010 \times 10^{-3}$	0,181	9,03

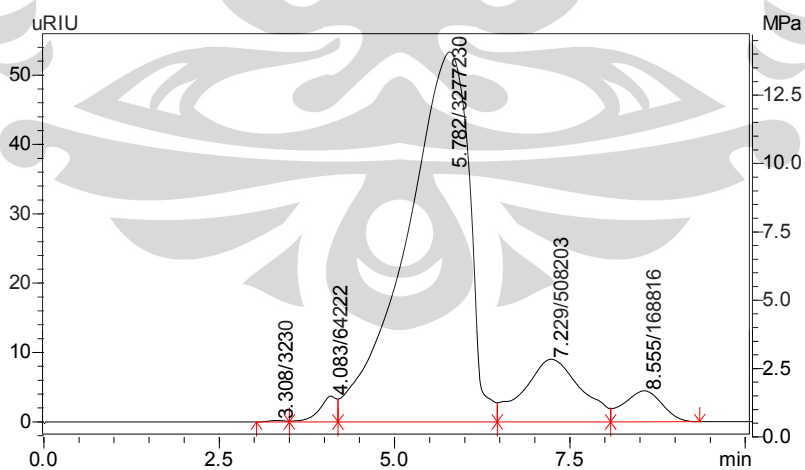
LAMPIRAN 7

Kromatogram media aktivasi (*starter*), sebelum, dan sesudah substrat didetoksifikasi dan persentase pengurangan kadar xilosa

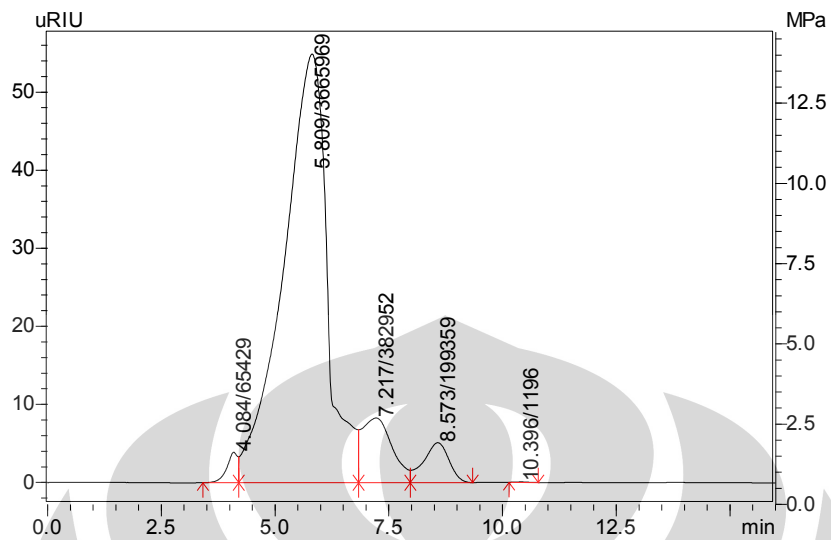
1. Media Aktivasi (*Starter*) berumur 48 jam



2. Sebelum substrat didetoksifikasi



3. Sesudah substrat didetoksifikasi



4. Persentase pengurangan kadar xilosa

Sebelum substrat didetoksifikasi = $1,35 \times 10^{-3}$ mol

Sesudah substrat didetoksifikasi = $1,02 \times 10^{-3}$ mol

Persentase pengurangan xilosa = $(1,35 \times 10^{-3} - 1,02 \times 10^{-3}) \text{ mol} \times 100\%$

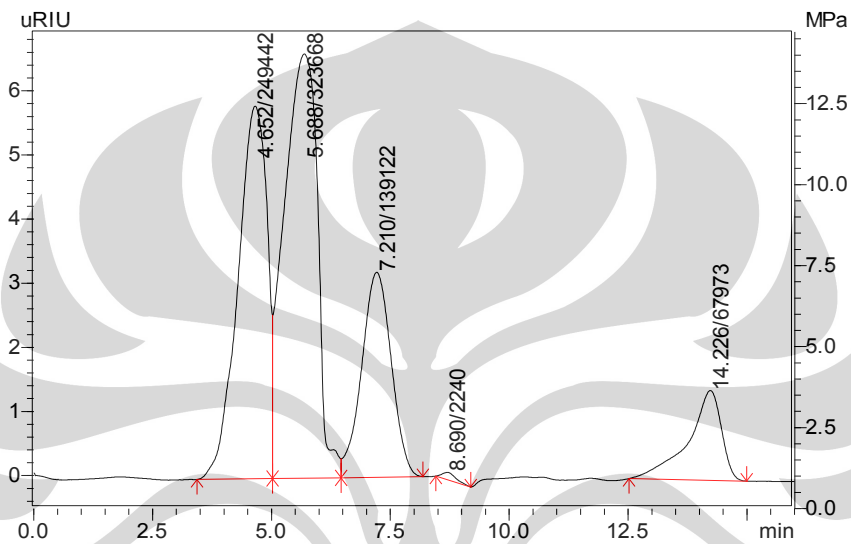
$1,35 \times 10^{-3} \text{ mol}$

= 24,44%

LAMPIRAN 8

Kromatogram dan tabel data hasil fermentasi kontrol xilosa

1. Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni pada waktu optimum (jam ke-12)



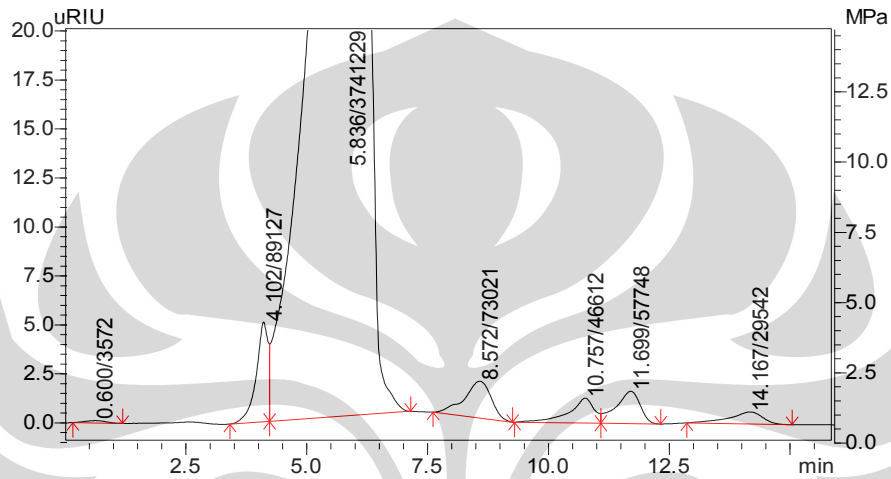
2. Tabel data hasil fermentasi xilosa murni

Waktu	Xilosa Sisa		Xilitol		% konversi xilosa menjadi xilitol
	Luas Area	Kadar Xilosa (ppm)	Luas Area	Kadar Xilitol (ppm)	
0	340759	2392	0	0	0
12	139122	933,234	67973	525,982	22,87
24	0	0	23905	190,686	8,29
36	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

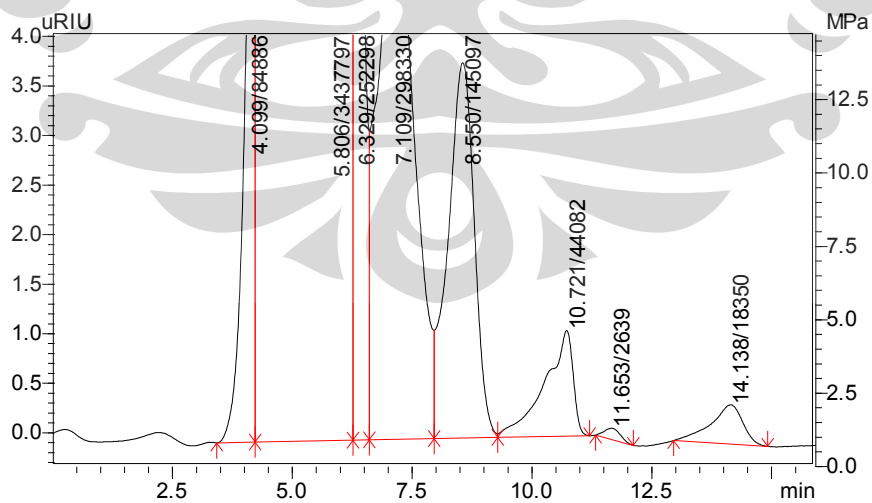
LAMPIRAN 9

Kromatogram hasil fermentasi substrat pada waktu optimum

1. Waktu optimum fermentasi jam ke-24 untuk substrat hasil detoksifikasi



2. Waktu optimum fermentasi jam ke-12 untuk substrat tanpa detoksifikasi



LAMPIRAN 10

Contoh cara perhitungan

1. Xilosa

Persamaan regresi linier dari grafik standar xilosa adalah $y = 150,96x - 1759$; y adalah luas area dan x adalah konsentrasi xilosa (ppm).

Misal pada sampel *pollard* gandum => Luas area (y) = 475063, maka konsentrasi xilosa (x) = $(475063 + 1759)/150,96 = 3158,697$ ppm = $3,159 \times 10^{-3}$ g/mL = 3,159 g/L.

Karena volume larutan 60 mL, maka dalam 60 mL larutan terdapat:

$$3,159 \times 10^{-3} \text{ g/mL} \times 60 \text{ mL} = 0,190 \text{ g}$$

Oleh karena itu, presentase kadar xilosa dalam 2 g sampel *pollard* gandum = $(0,190 \text{ g}/2 \text{ g}) \times 100\% = 9,48\%$ (w/w).

2. Xilitol

Persamaan regresi linier dari grafik standar xilitol adalah $y = 131,43 - 1156,8$; y adalah luas area dan x adalah konsentrasi xilitol (ppm).

Misal pada sampel *pollard* gandum => Luas area (y) = 60784, maka konsentrasi xilitol (x) = $(60784 + 1156,8)/131,43 = 471,280$ ppm = $4,713 \times 10^{-4}$ g/mL = 0,471 g/L.

Karena volume larutan 60 mL, maka dalam 60 mL larutan terdapat:

$$4,713 \times 10^{-4} \text{ g/mL} \times 60 \text{ mL} = 0,028 \text{ g}$$

Oleh karena itu, presentase *yield* xilitol dari 2 g sampel *pollard* gandum = $(0,028 \text{ g}/2 \text{ g}) \times 100\% = 1,41\%$ (w/w)

Konsentrasi awal xilosa dalam hidrolisat = 2755,452 ppm = 2,756 g/L

Xilitol 0,471 g/L = $3,097 \times 10^{-3}$ mol/L

Xilosa 2,755 g/L = 0,018 mol/L

Presentase konversi xilosa menjadi xilitol = $(3,097 \times 10^{-3} \text{ mol/L} / 0,018 \text{ mol/L}) \times 100\% = 16,88\%$

