

**PRODUKSI XILITOL DARI HIDROLISAT HEMISELULOSA
JERAMI PADI (*Oryza sativa*) DENGAN KHAMIR *Candida
fukuyamaensis* UICC Y-247**

**RIA FATMAWATI
0305030549**



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

**PRODUKSI XILITOL DARI HIDROLISAT HEMISELULOSA
JERAMI PADI (*Oryza sativa*) DENGAN KHAMIR *Candida
fukuyamaensis* UICC Y-247**

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

**Oleh :
RIA FATMAWATI
0305030549**



**DEPOK
2009**

SKRIPSI : PRODUKSI XILITOL DARI HIDROLISAT
HEMISELULOSA JERAMI PADI (*Oryza sativa*) DENGAN
KHAMIR *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

NAMA : RIA FATMAWATI

NPM : 0305030549

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, Juli 2009

Dr. ENDANG SAEPUKIN

PEMBIMBING I

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana:

Penguji I : Drs. Sultan Badjri, .M.Si.....

Penguji II : Dra. Siswati Setiasih, Apt. M.si.....

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

Bismillahirrohmaanirrohiim

Bukankah Kami telah melapangkan dadamu?

Dan Kami pun telah menurunkan bebanmu darimu,

Yang memberatkan punggungmu,

Dan Kami tinggikan sebutanmu bagimu.

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan,

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.

Maka apabila engkau sudah selesai (dari sesuatu urusan),

Tetaplah bekerja keras untuk urusan lain,

Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap

(2.5 Al-Insyirah 1-8)

Skripsi ini kupersembahkan untuk semua yang ada di hati

Terutama: Ibu, Bapak, Mbak Nia, Mbak Rose dan Keluarga Besar

quod erat demonstrandum

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT karena hanya atas rahmat, kasih sayang dan petunjuk-Nya serta izin-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini tepat pada waktunya. Salawat serta salam semoga senantiasa terlimpahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing yang dengan tulus ikhlas, penuh kesabaran dan pengertian telah memberikan bimbingan, arahan, waktu dan bantuan pemikiran yang tak ternilai selama penelitian

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI, Dra. Tresye Utari, M.Si. selaku koordinator penelitian yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dalam penelitian, Bu Susi dan Bu Yani yang telah memberikan ilmu mikrobiologi yang sangat berharga, juga untuk dosen-dosen biokimia yang telah membuka wawasan di bidang ilmu biokimia ini, serta kepada seluruh dosen Departemen Kimia FMIPA UI yang tidak hanya memberikan begitu banyak ilmu yang bermanfaat, tetapi juga telah menjadi sumber inspirasi yang berarti bagi penulis. Pak Hedi S., Mbak Ema, Mbak Tri, Mbak Ina, Mbak Cucu, Pak Amin, dan Pak Kiri, Babeh perpus, serta seluruh staf departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

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

1. Kedua orang tua yang telah berkorban begitu besar dalam segala hal, yang telah mengajarkan kesabaran, kerja keras, dan semangat hidup yang sangat berarti bagi penulis. Terutama untuk ibuku yang selalu memberikan dorongan untuk cepat lulus dari kuliah ini.
2. Mbak nia & sekeluarga yang telah memberikan banyak fasilitas yang menunjang untuk kebutuhan selama kuliah, dan juga kepada Mbak Rose yang juga selalu mendukung dalam segala hal mengenai kuliah. Serta kepada seluruh keluarga besar yang terus mendoakan dan mendukung penulis untuk terus berjuang.
3. Emil yang telah banyak memberikan dukungan di saat penulis mengalami masa-masa sulit, memberikan semangat ketika penulis merasa jatuh, serta perhatian dan pengertiannya selama ini.
4. Cicilia Aristya D.P , rekan kerja dalam menghadapi mikroorganisme untuk menghasilkan xilitol. Terima kasih atas bantuan dan kerja samanya selama 6 bulan ini. Kepada Kak Nieza, Kak Isal, dan kak Riki terima kasih atas arahan dan diskusi selama penelitian.
5. Khotimah, Nuril, Mbak Denok, dan Khairunnisa yang mengajarkan untuk selalu tersenyum disaat apapun.
6. Teman-teman penelitian di lantai 4 (Angel, Lusy, Purnama, Faruq, Yusni, Destya, Kak Ana, Kak Ratih, Kak Fajriah, Kak Habibah), teman-teman penelitian di lantai 3 (Rilian, Ana, Melina, Lulu, Lila, Norma, Alti, Mutia,

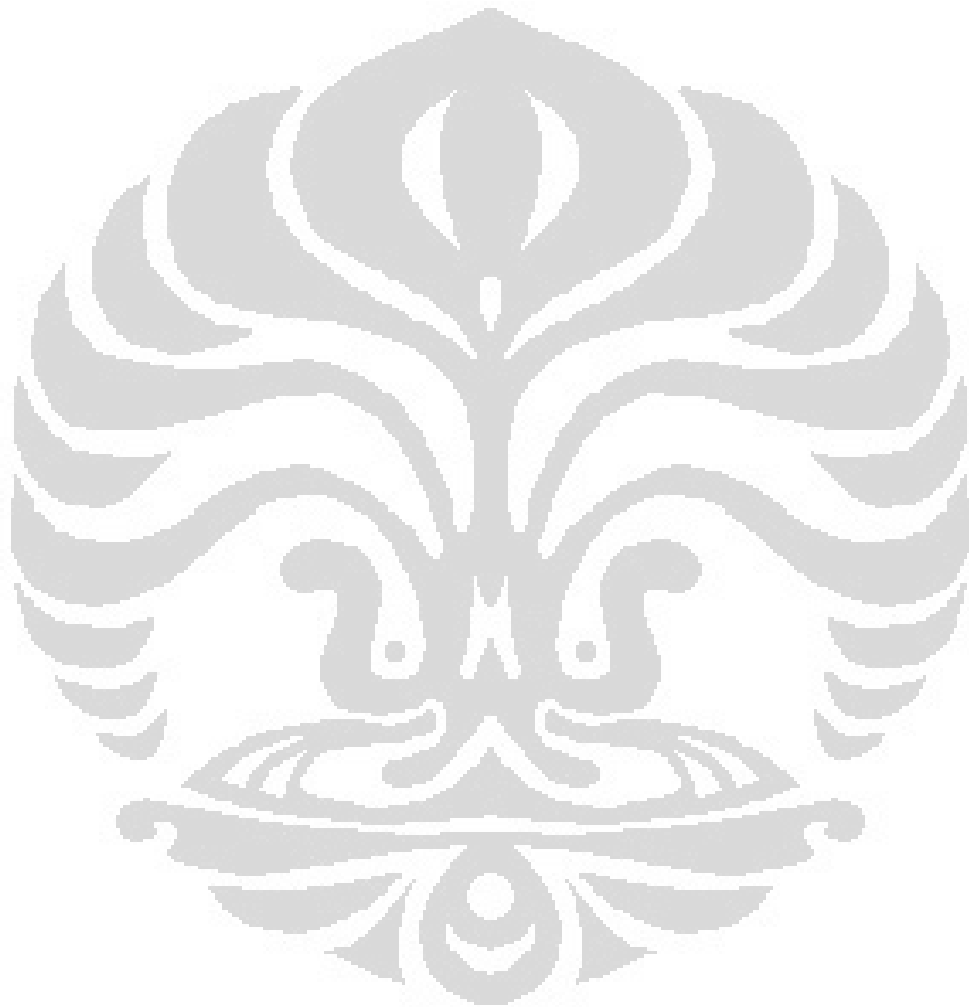
Susi, Santi, Dian, Dayat, Kak Muris, Andri, Lumita), dan teman-teman penelitian di lantai 1 (Ramdhan, Danang, Ronggo, & Samira) serta teman-teman 2005 yang lainnya, terima kasih atas dukungan dan bantuan selama penelitian.

7. Semua pihak yang mendukung terlaksananya penelitian ini.

Sebagai makhluk Allah SWT, kita diberikan keterbatasan dalam hidup ini, oleh karena itu kita terus berusaha dalam mengatasi dan menyeimbangi keterbatasan kita dengan menjadi lebih baik lagi. Dengan sepenuhnya penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, maka dengan segala kerendahan hati penulis membuka diri bila ada saran dan pendapat untuk perbaikan.

Depok, Juni 2009

Penulis



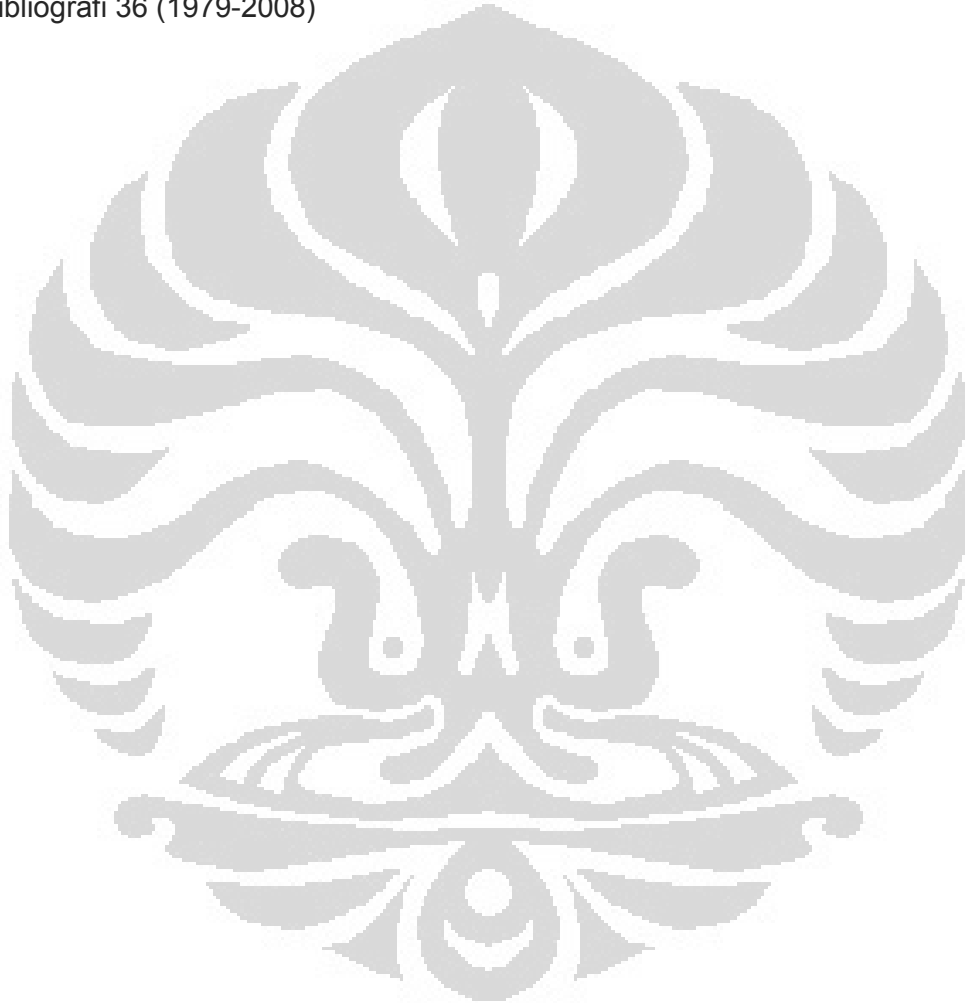
ABSTRAK

Indonesia merupakan negara agraris yang setiap tahunnya menghasilkan padi dalam jumlah besar, namun di sisi lain hal ini menyebabkan banyaknya jumlah limbah jerami padi. Untuk itu diperlukan penanganan limbah yang tepat guna. Pada penelitian ini dicoba memanfaatkan limbah jerami padi yang dibagi menjadi merang dan batang sebagai bahan baku xilitol dengan hidrolisis menggunakan H_2SO_4 0,3 M pada suhu $121^\circ C$ dengan waktu optimum 45 menit. Sebelum hidrolisis, dilakukan delignifikasi menggunakan NaOH 1%, suhu $55^\circ C$ selama 2 jam. Kadar xilosa pada substrat merang sebesar 4918,6 mg/L dan batang 3286,3 mg/L. Untuk substrat yang didelignifikasi pada merang 3148,5 mg/L dan 1869,5 mg/L pada batang. Hasil hidrolisis ini kemudian difermentasi dengan khamir penghasil enzim *xylose reductase*, yaitu *Candida fukuyamaensis*. Sampel diberi perlakuan detoksifikasi untuk menghilangkan senyawa yang menghambat pertumbuhan khamir, yaitu diberi arang aktif 1% dan dikocok dengan *shaker* selama setengah jam. Konsentrasi xilitol optimum dihasilkan dengan perlakuan detoksifikasi yaitu untuk substrat merang sebesar 545,6 mg/L dan pada batang 226,7 mg/L, sedangkan persen konversi terhadap substrat awal paling tinggi juga dihasilkan oleh substrat jerami dengan perlakuan detoksifikasi, yaitu sebesar 1,6 % pada merang dan 0,7% pada batang. Persen konversi terhadap xilosa awal paling tinggi dihasilkan oleh

substrat dengan perlakuan delignifikasi-detoksifikasi, yaitu merang sebesar 17,104% dan batang 7,49%.

Kata kunci : jerami padi, hidrolisis, delignifikasi, fermentasi, *xylose reductase*, xilosa, xilitol, detoksifikasi

xii + 94 hlm; grb; tab; lamp
Bibliografi 36 (1979-2008)



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Perumusan Masalah	3
1.4 Hipotesis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Padi.....	5
2.1.1 Klasifikasi Padi	5
2.1.2 Jerami Padi.....	6
2.2 Lignoselulosa	7
2.2.1 Lignin	7
2.2.2 Selulosa	9
2.2.3 Hemiselulosa.....	10
2.3 Xilosa	11
2.4 Xilitol	12

2.5 Hidrolisis Hemiselulosa dengan Katalis Asam	14
2.6 Candida	16
2.7 Metabolisme xilosa menjadi xilitol	18
2.8 Perkembangan penelitian xilitol	21
BAB III METODE PENELITIAN	23
3.1 Alat dan Bahan	23
3.1.1 Alat-alat yang Digunakan	23
3.1.2 Bahan-bahan yang Digunakan	23
3.2 Prosedur Kerja	24
3.2.1 Pembuatan Sampel Jerami Padi	24
3.2.2 Delignifikasi Sampel	24
3.2.3 Detoksifikasi hidrolisat sebelum fermentasi	25
3.2.4 Pembuatan Larutan Standar	25
3.2.4.1 Larutan Standar Xilosa	25
3.2.4.2 Larutan Standar xilitol	25
3.2.4.3 Larutan Standar Glukosa	26
3.2.4.4 Larutan Standar Arabinosa	26
3.2.5 Pembuatan Hidrolisat	27
3.2.6 Sterilisasi Alat	28
3.2.7 Penyiapan Inokulum	28
3.2.8 Perhitungan Jumlah Sel Khamir	29
3.2.9 Fermentasi	30
3.2.10 Variasi Kondisi	31

3.2.11 Analisis Produk dengan HPLC.....	32
3.2.12 Bagan Kerja	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Sampling Jerami Padi	35
4.2 Pembuatan Sampel Jerami Padi.....	36
4.3 Delignifikasi Sampel Serbuk Jerami Padi.....	37
4.4 Hidrolisis Jerami Padi.....	40
4.5 Identifikasi Standar Karbohidrat	42
4.6 Hasil Hidrolisis Jerami Padi.....	44
4.7 Detoksifikasi hidrolisat dengan arang aktif	46
4.8 Fermentasi	48
4.9 Hasil Fermentasi	50
4.9.1 Hasil Fermentasi substrat awal.....	51
4.9.2 Hasil Fermentasi Substrat detoksifikasi	53
4.9.3 Hasil Fermentasi Substrat Delignifikasi.....	54
4.9.4 Hasil Fermentasi Substrat Delignifikasi dan Detoksifikasi	55
4.10 Hasil samping fermentasi.....	62
4.11 Kelompok Kontrol.....	63
4.12 Perhitungan Jumlah Sel Khamir.....	66
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	69
DAFTAR PUSTAKA.....	71
Lampiran.....	77

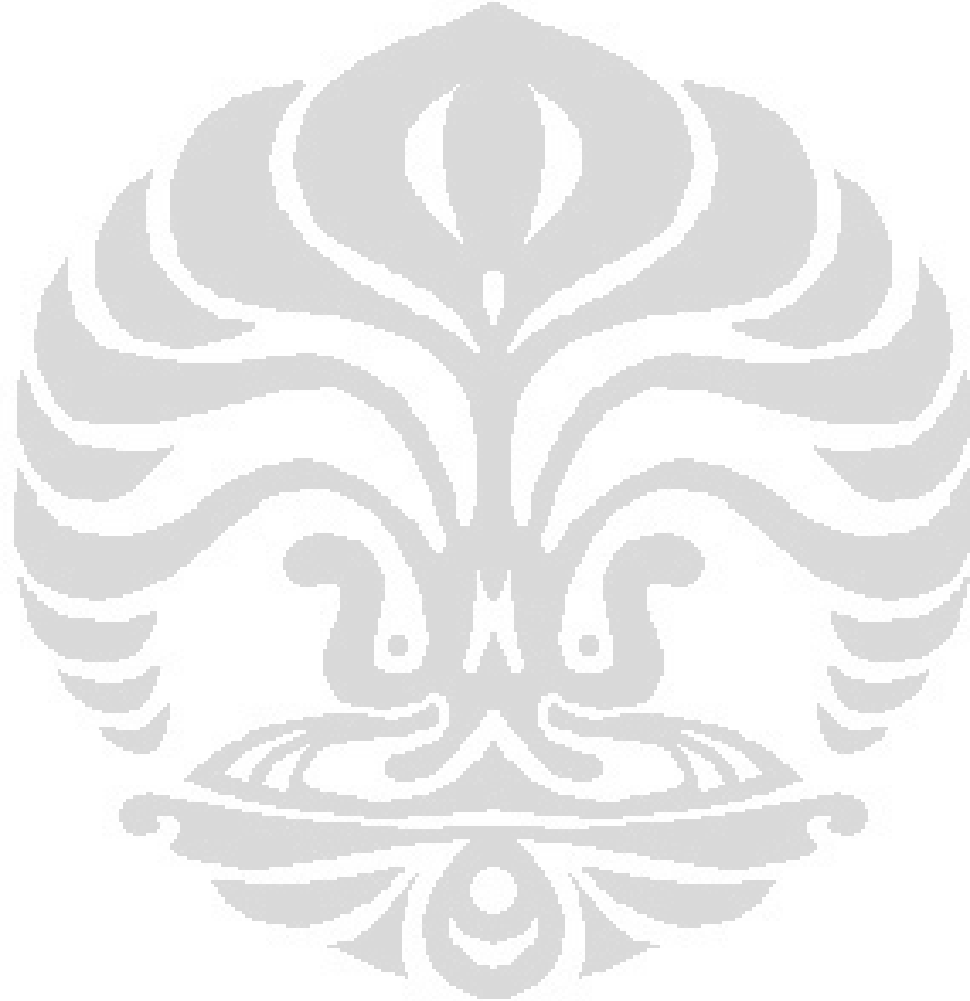
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Padi	5
Gambar 2.2	Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman	8
Gambar 2.3	Struktur lignin	9
Gambar 2.4	struktur selulosa	10
Gambar 2.5	Struktur dasar arabiglukuronoxilan	11
Gambar 2.6	Struktur xilosa	12
Gambar 2.7	Struktur xilosa berbentuk cincin	12
Gambar 2.8	Struktur xilitol	13
Gambar 2.9	Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida	16
Gambar 2.10	Foto mikroskopik khamir dari genus <i>Candida</i>	17
Gambar 2.11	Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa	20
Gambar 3.1	Bagan kerja delignifikasi	33
Gambar 3.2	Bagan kerja hidrolisis, detoksifikasi, dan fermentasi	34
Gambar 4.1	Jerami Padi A. Gambar batang B. Merang.....	36
Gambar 4.2	Contoh-contoh ikatan antara lignin dan karbohidrat	39
Gambar 4.3	Kromatogram standar karbohidrat.....	43
Gambar 4.4	Kromatogram standar xilitol 100 ppm.....	43
Gambar 4.5	Kromatogram hidrolisat	44
Gambar 4.6	kurva hasil hidrolisis	45
Gambar 4.7	Reaksi β -D-xilopiranosida menjadi furfural	48
Gambar 4.8	Reaksi β -D-glukopiranosida menjadi HMF.....	48

Gambar 4.9	Kurva produksi xilitol dari substrat awal.....	52
Gambar 4.10	Kurva produk xilitol dari substrat detoksifikasi	53
Gambar 4.11	Kurva produk xilitol dari substrat delignifikasi	54
Gambar 4.12	Kurva produk xilitol dari substrat delignifikasi-detoksifikasi	56
Gambar 4.13	Perbandingan xilitol pada variasi substrat merang	57
Gambar 4.14	Perbandingan xilitol pada variasi substrat batang.....	58
Gambar 4.15	Kurva persen konversi xilitol pada substrat pada kondisi optimum.....	61
Gambar 4.16	Kromatogram hasil fermentasi menggunakan xilosa murni	63
Gambar 4.17	Kromatogram hidrolisat tanpa penambahan khamir	65
Gambar 4.18	Hasil TPC <i>Candida fukuyamensis</i>	66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Jerami Padi	7
Tabel 4.1	Kadar etanol dalam substrat batang awal.....	62
Tabel 4.2	Hasil fermentasi xilitol dari xilitol murni	64



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kromatogram standar xilosa	77
Lampiran 2	Kromatogram standar xilitol	80
Lampiran 3	Kromatogram hidrolisat dengan variasi waktu.....	83
Lampiran 4	Kromatogram hasil fermentasi	86
Lampiran 5	Tabel hasil pengukuran HPLC untuk substrat dengan variasi waktu hidrolisis	90
Lampiran 6	Tabel perhitungan kadar xilosa dan xilitol hasil fermentasi	91
Lampiran 7	Hasil Samping Etanol	95
Lampiran 8	Cara Perhitungan	96

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan negara agraris, setiap tahun hampir di seluruh pelosok negeri dihasilkan produk pertanian dalam jumlah besar. Seiring dengan berlimpahnya hasil pertanian, jumlah limbah yang berasal dari hasil pertanian pun melimpah. Oleh karena itu perlu adanya upaya pemanfaatan limbah dengan baik sehingga suatu saat tidak menimbulkan masalah yang serius bagi lingkungan dan dapat meningkatkan nilai ekonomi jerami.

Limbah pertanian mempunyai kandungan lignoselulosa yang tinggi sehingga di dalamnya juga kaya akan hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa seperti D-xilosa dan L-arabinosa.¹ Hemiselulosa dapat dihidrolisis menghasilkan xilosa dengan jumlah tertentu, hal ini tergantung limbah pertanian yang digunakan. Xilosa yang dihasilkan dari limbah pertanian dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Jadi limbah hasil pertanian dapat dimanfaatkan lebih lanjut sehingga memiliki nilai jual yang tinggi.

Padi merupakan salah satu produk pertanian utama dan dihasilkan dalam jumlah besar setiap tahunnya, terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Namun padi ini menghasilkan produk samping berupa jerami dan

sekam yang pemanfaatannya masih terbatas, yakni sebagai pakan ternak, media pembuatan pertumbuhan jamur merang dan pupuk kompos, padahal jerami padi mempunyai kandungan lignoselulosa yang tinggi, yakni terdiri atas selulosa (32%), hemiselulosa (24%), dan lignin (13%).² Salah satu alternatif penanganan limbah jerami padi adalah dimanfaatkan sebagai sumber xilosa pada produksi xilitol.

Peningkatan konsumsi gula pada industri makanan, pemanis, dan minuman ringan ternyata memberikan efek yang buruk bagi kesehatan. Makanan dan minuman yang mengandung sukrosa berpotensi menimbulkan karies gigi, diabetes, obesitas, jantung, dan lain-lain. Padahal sukrosa merupakan gula yang biasa dikonsumsi sehari-hari dan penggunaannya sulit dihindari. Oleh karena itu perlu dicari pemanis alternatif yang aman dan tidak menimbulkan efek buruk bagi kesehatan, salah satunya adalah xilitol.

Xilitol sebagai pemanis pengganti mempunyai kelebihan dibanding gula pasir (sukrosa).³ Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa, tetapi memiliki tingkat energi yang lebih rendah yaitu 2,4 kal/g, sedangkan sukrosa 4 kal/g.⁴ Xilitol mempunyai sifat nonkariogenik karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang menimbulkan karies gigi. Selain itu, xilitol mempunyai indeks glikemik yang rendah, yaitu tidak meningkatkan gula darah dalam tubuh, dan metabolismenya tidak membutuhkan insulin.^{3,5,6}

Dalam skala industri, xilitol dapat diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi xilosa dengan bantuan katalis nikel pada suhu 80-140°C

dan tekanan 50 atm.⁷ Limbah nikel yang dihasilkan sangat berbahaya bagi lingkungan. Proses tersebut menggunakan tekanan tinggi sehingga memerlukan mesin dengan rancangan khusus dan biaya yang cukup tinggi. Oleh karena itu, saat ini mulai dikembangkan pembuatan xilitol dengan proses bioteknologi dengan memanfaatkan mikroba yang memiliki enzim *xylose reductase* untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol. Indonesia merupakan daerah tropis yang merupakan lingkungan yang ideal bagi mikroba untuk tumbuh, ditambah lagi hasil limbah lignoselulosa yang berlimpah, sehingga memungkinkan produksi xilitol dengan bioteknologi dalam skala besar.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah memanfaatkan limbah jerami padi untuk menghasilkan xilosa sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Hal ini dilakukan dengan menghidrolisis jerami padi yang kemudian difermentasi menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* untuk menghasilkan xilitol.

1.3. Perumusan Masalah

Pada penelitian ini, dilakukan hidrolisis lignoselulosa dari jerami padi menggunakan asam untuk menghasilkan xilosa. Jerami padi juga mengandung lignin yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroorganisme,

sehingga perlu dilakukan delignifikasi untuk mengoptimalkan xilosa dan xilitol yang diperoleh. Selama proses hidrolisis dihasilkan senyawa-senyawa yang dapat mengganggu proses fermentasi. Untuk itu dilakukan detoksifikasi dengan arang aktif untuk menghilangkan senyawa tersebut. Xilosa yang dihasilkan dalam proses hidrolisis ini kemudian difermentasi dengan menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase*, yaitu *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 yang telah terbukti mampu mengubah xilosa menjadi xilitol.⁸ Mikroorganisme ini di dapat dari laboratorium UICC departemen Biologi Universitas Indonesia. Metode yang digunakan pada fermentasi ini adalah metode *Batch*.

1.4. Hipotesis

1. Hemiselulosa yang terdapat pada jerami padi dapat dihidrolisis menjadi xilosa
2. Hidrolisat jerami padi yang mengandung xilosa dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan xilitol dengan cara fermentasi menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR). Khamir ini akan mereduksi xilosa menjadi xilitol.
3. Proses detoksifikasi dan delignifikasi akan meningkatkan persen konversi xilitol terhadap xilosa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Padi

2.1.1 Klasifikasi Padi

Padi tersebar luas di seluruh dunia dan tumbuh di hampir semua bagian dunia yang memiliki cukup air dan suhu udara cukup hangat. Produksi padi dunia menempati urutan ketiga dari semua serelia setelah jagung dan gandum.⁸ Di Indonesia, pada tahun 2008, produksi padi menembus angka 60 juta ton.⁹

Nama latin tanaman padi adalah *Oryza sativa*. Klasifikasi botani tanaman padi adalah sebagai berikut :

Divisi : Spermatophita
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledonae
Ordo : Poales
Famili : Graminae
Sub family : Oryzoideae
Genus : Oryza



Gambar 2.1 Padi

Padi memiliki morfologi⁸ sebagai berikut:

- berakar serabut,

- daun berbentuk lanset (sempit memanjang),
- urat daun sejajar,
- memiliki pelepah daun,
- bunga tersusun sebagai bunga majemuk dengan satuan bunga berupa *floret*,
- floret tersusun dalam spikelet, khusus untuk padi satu spikelet hanya memiliki satu floret,
- buah dan biji sulit dibedakan karena merupakan bulir (Ing. *grain*) atau kariopsis.

2.1.2. Jerami Padi

Jerami padi merupakan salah satu hasil ikutan pertanian terbesar di Indonesia yang jumlahnya kurang lebih 20 juta ton per tahun, produksinya bervariasi sekitar 12 - 15 ton per hektar atau 4 - 5 ton bahan kering per hektar satu kali panen, tergantung pada lokasi dan jenis varietas tanaman yang digunakan. Jerami padi merupakan limbah hasil samping dari pertanian padi.¹⁰ Pemanfaatan jerami padi selama ini hanya sebatas untuk pakan ternak, dibakar untuk dijadikan pupuk kompos, serta digunakan sebagai media pengembangan jamur merang. Secara umum komposisi jerami padi adalah:

Tabel 2.1 Komposisi jerami padi ²

Komposisi	Jumlah (%)
Selulosa	32
Hemiselulosa	24
Lignin	13
Wax	3,8
Ash	13,3

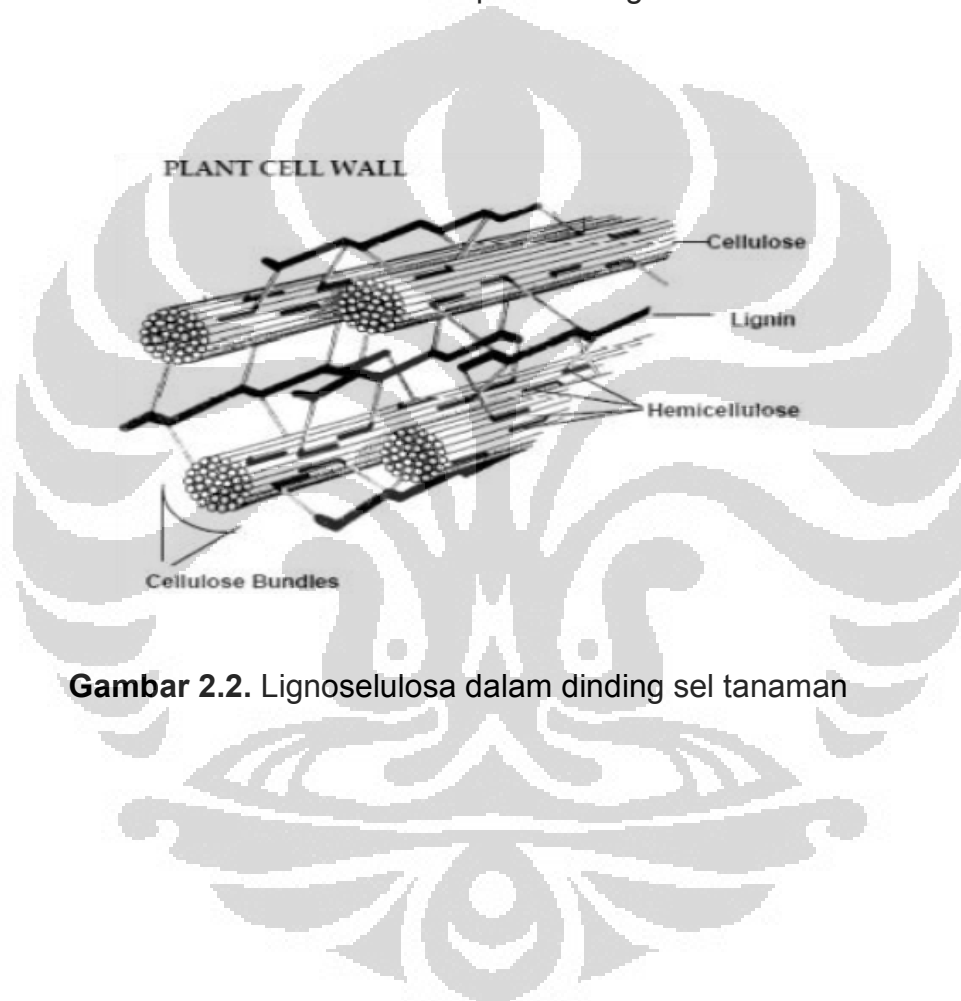
2.2. Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan materi yang terdapat di dalam tanaman. Lignoselulosa tersusun atas 3 bagian utama, yaitu selulosa (polimer dari gula-gula enam atom karbon, yaitu glukosa) sekitar 35- 50%, hemiselulosa (polimer dari gula-gula lima atom karbon) sekitar 20-35%, dan lignin (polimer dari fenol) sekitar 10-25%.¹¹ Selulosa dan hemiselulosa dapat dikonversi menjadi monomer-monomernya melalui proses hidrolisis.

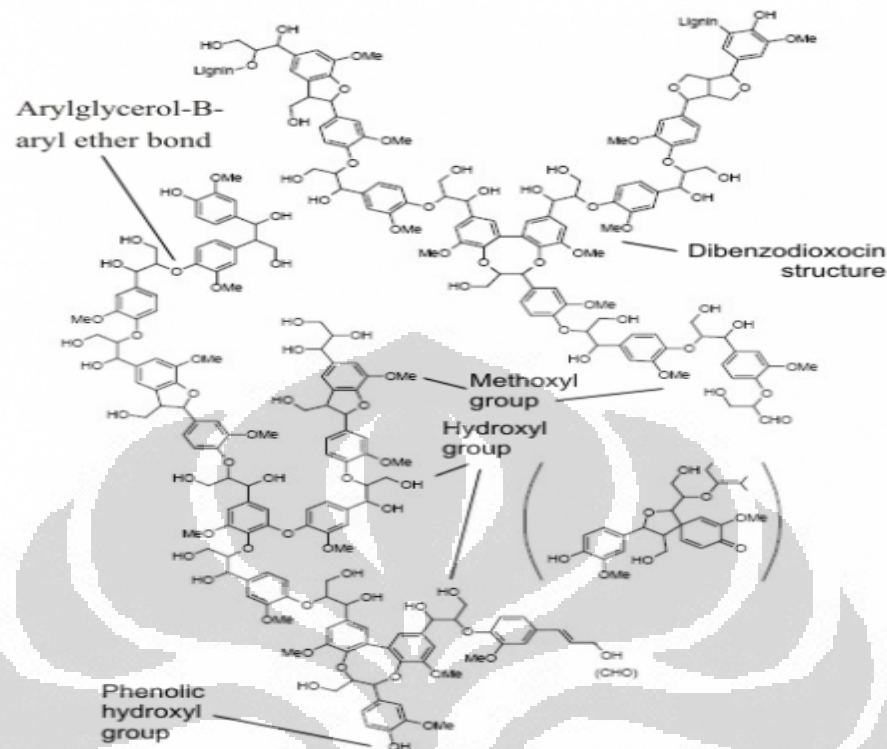
2.2.1 Lignin

Lignin merupakan komponen 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. Lignin mempunyai kelarutan yang sangat rendah pada kebanyakan pelarut. Lignin berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa melalui ikatan-ikatan ester atau ikatan-ikatan eter. Gambar 2.3 merupakan contoh ikatan antara lignin dan hemiselulosa. Ikatan-ikatan ini mudah dipecah dengan alkali.¹³



Gambar 2.2. Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman

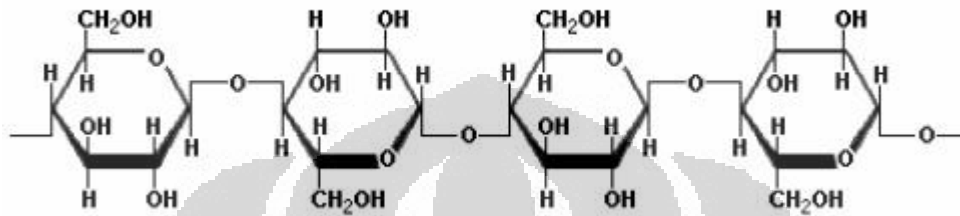


Gambar 2.3. Struktur lignin

2.2.2. Selulosa

Selulosa merupakan senyawa polimer anhidrat yang terdiri dari 100-1500 unit glukosa dengan ikatan β - (1-4) linear dan merupakan komponen utama semua dinding sel tumbuhan, yaitu sekitar 40-60%. Selulosa alami mempunyai bentuk amorf dan kristalin. Sifatnya tidak larut dalam kebanyakan pelarut. Molekul-molekul selulosa seluruhnya berbentuk linear. Ratusan atau lebih selulosa bergabung menjadi mikrofibril. Beberapa mikrofibril membentuk serat-serat selulosa yang lebih besar, yang direkatkan oleh perekat polisakarida seperti pektin dan hemiselulosa sehingga serat menjadi keras

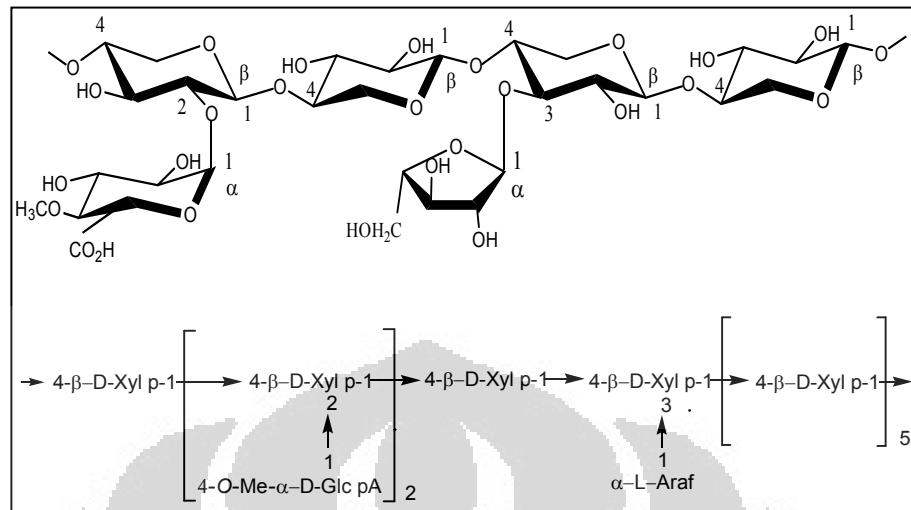
dan kaku.^{1,12} Molekul-molekul selulosa mempunyai kecenderungan kuat membentuk ikatan-ikatan hidrogen intramolekular dan intermolekular yang menyebabkan polimer ini menjadi lebih rigid dan kuat.



Gambar 2.4. Struktur selulosa

2.2.3. Hemiselulosa

Hemiselulosa ditemukan bersama-sama dengan selulosa di dalam dinding sel tanaman. Berbeda dengan selulosa yang homopolisakarida, hemiselulosa merupakan heteropolisakarida.¹ Hemiselulosa terdiri atas gula rantai pendek yang mempunyai 150-200 unit monomer. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang umumnya berupa polimer gula-gula pentosa seperti D-xilosa dan L-arabinosa.¹ Pada sebagian besar sel tanaman, komponen utama hemiselulosa adalah berupa D-xilan.



Gambar 2.5. Struktur dasar arabinoglucoronoxilan

2.3. Xilosa¹³

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

Berikut adalah sifat fisika dari xilosa:

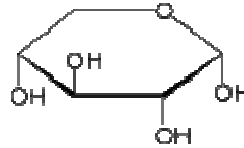
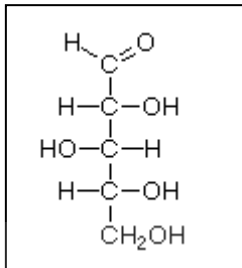
Nama Kimia : Xilosa

Rumus Kimia : $C_5H_{10}O_5$

Berat Molekul : 150,13 g/mol

Titik Leleh : 144-145°C

Densitas : 1,52 g/cm³



Gambar 2.6. Struktur xilosa

Gambar 2.7. Struktur xilosa
berbentuk cincin

2.3. Xilitol

Xilitol, pertama kali berhasil diisolasi dari serpihan kayu *birch* oleh ahli kimia Jerman Prof Dr Emil Herman Fisher (pemenang Nobel kimia 1902) dan asistennya Rudolf Stahel pada September 1890.¹⁴ Xilitol ini kemudian dipopulerkan di Eropa sebagai gula yang aman bagi penderita diabetes karena tidak mempengaruhi tingkat insulin.

Xilitol merupakan gula alami yang mempunyai rumus molekul C₅H₁₂O₅. Xilitol banyak ditemukan di alam dalam buah-buahan dan sayuran. Xilitol merupakan gula alkohol yang non kariogenik dan berpotensi sebagai pemanis rendah kalori. Tingkat kemanisan xilitol sama dengan sukrosa tetapi memiliki tingkat energi lebih rendah yaitu 2,4 kal/g dibandingkan sukrosa sebesar 4 kal/g.¹⁵ 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 mengkonsumsi atau mendegradasinya sebagai sumber energi. Oleh karena itu, xilitol banyak digunakan untuk mencegah karies pada gigi.¹⁶

Sifat fisik dan kimia dari xilitol adalah sebagai berikut:

Rumus Molekul : $C_5H_{12}O_5$

Berat Molekul : 152,15 g / mol

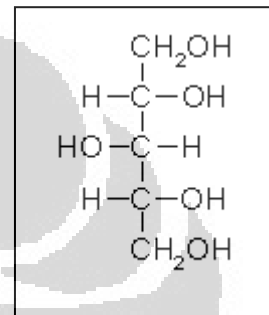
Wujud : Kristal putih

Titik Leleh : 92-96°C

Titik Didih : 126°C

Jumlah Kalori : 2,4 kal / g

Densitas : 1,52 g / cm³



Gambar 2.8. Struktur xilitol

Proses pembentukan xilitol dari xilosa dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan cara kimiawi dan enzimatik. 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.¹⁷ 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 secara enzimatik 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 murah karena berasal dari sel khamir dan *yield* yang didapat relatif tinggi (60-80%).¹⁸

2.5. Hidrolisis Hemiselulosa dengan Katalis Asam

Hidrolisis merupakan pemecahan molekul besar menjadi bagian yang lebih kecil (monomer dari senyawa itu), melalui adisi oleh air.¹⁹ Untuk mendegradasi polimer ini dapat digunakan katalis asam atau enzim.²⁰ Hidrolisis lignoselulosa dengan enzim akan menghasilkan produk yang lebih spesifik, namun monomer gula yang dihasilkan lebih sedikit karena enzim sulit menembus bagian lignin yang merupakan pembentuk dinding sel yang kokoh. Hidrolisis dengan asam akan menghasilkan hasil berupa campuran, karena asam tidak hanya menghidrolisis hemiselulosa, tetapi juga selulosa dan senyawa monosakarida lainnya menjadi bentuk lain.

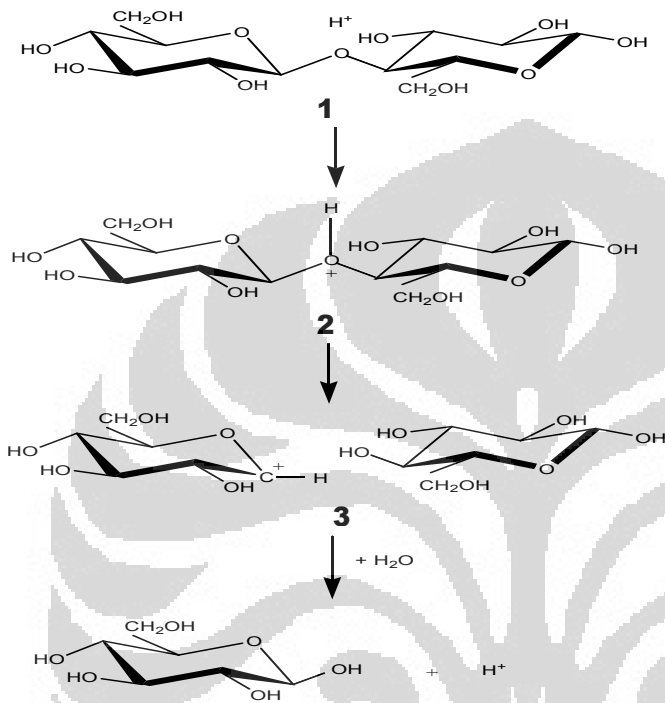
Asam yang biasa digunakan pada hidrolisis adalah asam sulfat. Asam ini akan melepaskan proton yang memecahkan ikatan eter heterosiklik antara monomer gula dalam rantai polimer yang dibentuk oleh hemiselulosa dan selulosa. Produk yang dihasilkan merupakan senyawa campuran berupa xilosa, arabinosa, dan glukosa. Selain itu dihasilkan produk samping berupa oligomer, furfural, dan asam asetat.²¹ Senyawa furfural dapat menghambat pertumbuhan beberapa mikroorganisme sehingga harus dihilangkan dari hidrolisat. Sedangkan asam yang tersisa harus dinetralkan karena dapat

menginhibisi 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 yang terbentuk selama proses hidrolisis 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 ditingkatkan¹⁹. Oleh karena itu, perlu adanya minimalisasi degradasi xilosa dengan memberikan perlakuan sebelum hidrolisis. Metode yang dapat digunakan untuk mengurangi inhibitor adalah dengan memberikan perlakuan dengan alkali terlebih dahulu sebelum proses hidrolisis. Alkali akan melarutkan dan memisahkan lignin serta gugus asetil dan mengekstrak senyawa-senyawa yang akan menginhibisi proses fermentasi dengan khamir²⁰. Selain kedua metode tersebut, pengurangan konsentrasi senyawa-senyawa beracun dalam hidrolisat dapat dilakukan dengan pemberian karbon aktif²¹.

Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida yang terdiri atas tiga tahap. Pada tahap pertama, proton sebagai katalis asam, berinteraksi dengan oksigen glikosida (ikatan glikosida) yang menghubungkan dua unit 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.¹⁷



Gambar 2.9. Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida¹⁷

2.6. *Candida*

Saat ini terdapat lebih dari 250.000 spesies fungi yang telah teridentifikasi. Kingdom fungi ini terbagi menjadi tiga, yaitu khamir (organisme yang terdiri dari satu sel), kapang (organisme yang berfilamen), dan jamur (organisme yang berkumpul membentuk struktur makroskopik atau lendir).¹⁷

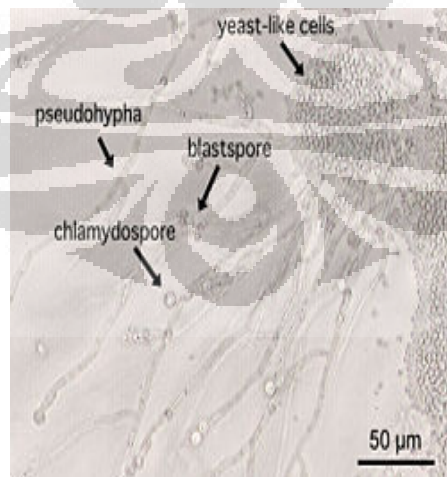
Khamir merupakan mikroorganisme anaerob fakultatif atau dapat hidup dalam kondisi anaerob. Khamir ini bersel satu, kebanyakan berbentuk

oval dan bereproduksi secara aseksual dengan cara *budding* atau pertunasan meskipun ada sebagian dengan cara pembelahan biner.^{22,23}

Salah satu genus khamir adalah *Candida*, dimana *Candida* ini 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. guilliermondii* ; *C.parapsilosis*



Gambar 2.10 Foto mikroskopik khamir dari genus *Candida*

Candida yang digunakan pada penelitian ini adalah *Candida fukuyamaensis* UICC Y – 247. *Candida* ini dapat menghasilkan enzim *xilosa reductase* dan *xilitol dehidrogenase* sehingga dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, khamir ini merupakan penghasil xilitol terbaik dibandingkan dengan khamir yang lain.⁸ Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna putih agak krem, permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap seperti mentega; profil dan tepi koloni menggunung, lurus. Khamir ini mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, D – xilosa, dan L – arabinosa. Khamir ini mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikurutug.²⁴

2.7. Metabolisme Xilosa menjadi Xilitol

Menurut Vongsuvanlert dan Tani (1998), xilitol dapat diproduksi melalui dua jalur metabolisme oleh sel khamir. Xilosa akan direduksi menjadi xilitol oleh NADH atau NADPH *dependent xilose reductase* atau melalui isomerisasi D-xilosa menjadi D-xilulosa oleh D-xilosa isomerase baru kemudian D-xilulosa akan direduksi menjadi xilitol oleh NADH-*dependent xilitol dehidrogenase*.

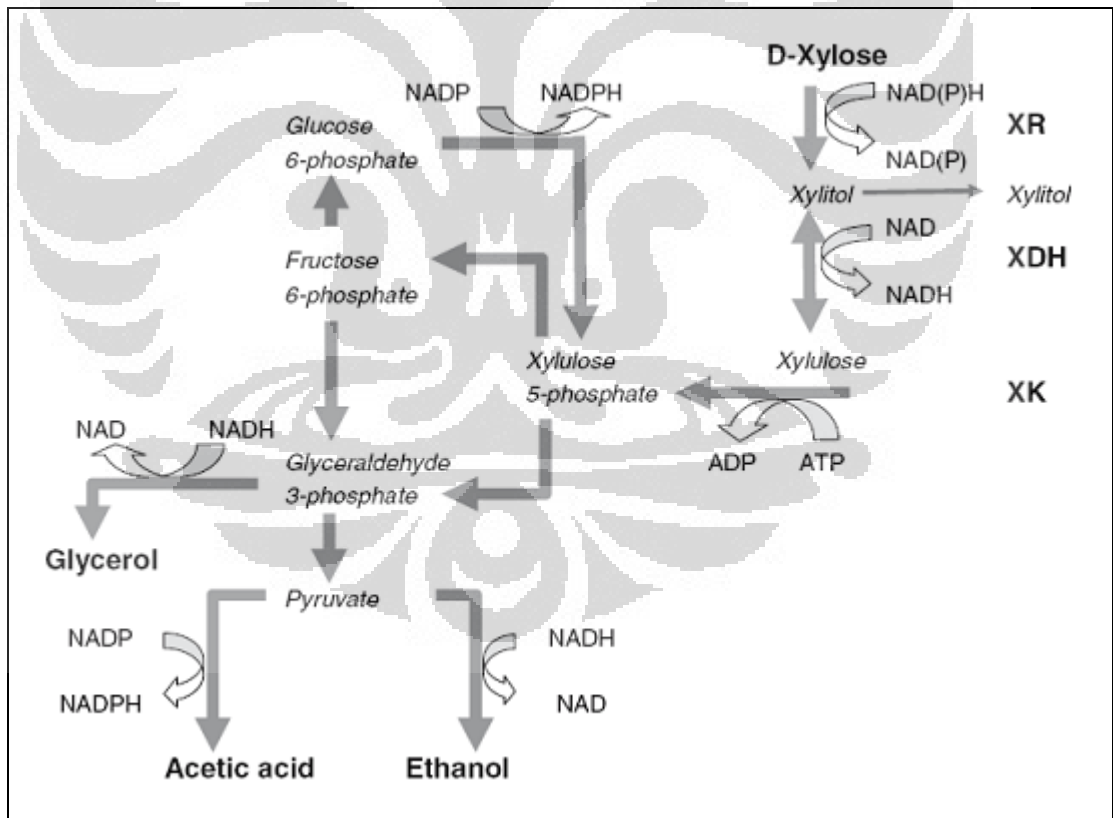
Mekanisme xilosa menjadi xilitol secara umum biasanya melibatkan khamir dari genus *candida*. Dalam hal ini, xilosa akan masuk ke dalam jalur metabolisme *candida* yang selanjutnya akan diubah menjadi xilitol. Jalur

katabolisme D – xilosa melibatkan tiga buah enzim kunci yakni *xilose reductase* (XR), *xilitol dehidrogenase* (XDH) dan *xilulokinase* (XK). Pertama, D – xilosa direduksi menjadi xilitol oleh enzim XR. Xilitol yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi D – xilulose oleh XDH. Akhirnya, D – xilulose difosforilasi menjadi xilulosa – 5 fosfat oleh XK yang kemudian masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP). Jalur ini menggunakan energi berupa ATP. *Xilose reductase* memerlukan kofaktor baik NADH maupun NADPH tetapi *xilitol dehidrogenase* bergantung pada NAD.^{25,26} Di lain pihak enzim *xilulokinase* memerlukan ATP sebagai kofaktornya⁴.

D-xilosa dapat berisomerisasi menjadi D-xilulosa oleh *xylose isomerase* atau dapat direduksi menjadi xilitol oleh XR dengan adanya NADPH atau NADH. Xilitol yang diproduksi dapat terdehidrogenasi menjadi D-xilulosa oleh XDH dengan adanya NADP⁺ atau NAD⁺ yang disebabkan reaksi sebelumnya. Bila khamir ini memiliki enzim *xylose isomerase*, maka xilitol yang terbentuk dapat dengan mudah diubah menjadi xilulosa, yang nantinya dapat digunakan sebagai energi untuk hidup, karena dapat memasuki jalur metabolisme penguraian xilulosa.

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktivitas enzim *xylose reductase* dan *xilitol dehidrogenase*. Untuk meningkatkan produksi xilitol dapat dengan cara 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 *xilose 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 meningkat⁴. Tingginya konsentrasi NADH dalam sel menaikkan aktivitas enzim *xilose reductase* dan menyebabkan akumulasi xilitol .



Gambar 2.11. Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa⁴

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 Penelitian Xilitol

Proses biokonversi xilitol dengan khamir pada mulanya menggunakan glukosa. Jalur metabolisme yang pertama kali diusulkan adalah glukosa diubah menjadi D – arabitol dan kemudian membentuk D – xilulosa, akhirnya D – xilulosa direduksi menjadi xilitol. Dibandingkan dengan reaksi reduksi D – xilosa menjadi xilitol yang hanya melalui satu tahap reaksi, pembentukan xilitol menggunakan glukosa menjadi kurang diminati karena *yield* xilitol yang diperoleh rendah.^{17,27}

Penelitian selanjutnya menemukan bahwa aktivitas enzim *xilose reductase* berperan dalam pembentukan xilitol dari xilosa²⁸. Seiring berjalannya waktu, penelitian pembentukan xilitol ini berkembang dari mencari jalur metabolisme pembentukan hingga bagaimana menaikkan *yield* xilitol yang didapat.²⁹

Penelitian kemudian diarahkan pada mutasi gen penyandi enzim kunci dalam fermentasi xilosa yakni *xilitol dehidrogenase* yang mengkatalisis oksidasi xilitol menjadi xilulosa pada *Candida tropicalis*. Adanya mutasi pada gen penyandi *xilitol dehidrogenase* menyebabkan penggunaan xilosa sebagai

sumber energi tidak dimungkinkan. Sehingga perlu ditambahkan sumber karbon lain, seperti glukosa, sebagai sumber energi bagi sel. Jadi xilosa hanya digunakan sebagai penghasil xilitol tanpa digunakan oleh sel sebagai sumber energi.³⁰

Pada tahun 1998, dilakukan penelitian untuk menaikkan *yield* xilitol dengan menambahkan glukosa sebagai kosubstrat dan diperoleh kenaikan *yield* xilitol dari 82% saat digunakan xilosa saja menjadi 93% saat menggunakan kedua gula dengan perbandingan glukosa/xilosa 15% dan khamir yang digunakan adalah *Candida tropicalis*. Penambahan glukosa dapat menaikkan *yield* xilitol namun hingga konsentrasi tertentu.³¹ Penambahan glukosa diatas 10 g/L akan menghibisi aktivitas enzim *xilose reductase* sehingga xilitol yang dihasilkan berkurang. Inhibisi ini terjadi karena dihasilkannya etanol sebagai metabolit samping.

Akhir-khir ini penelitian berkembang kepada penggunaan bahan baku yang tersedia dari alam yakni tongkol jagung, sekam/jerami padi, ampas tebu, dan batang gandum.³² Kesemuanya menghasilkan *yield* yang berbeda – beda karena komposisi masing – masing hemiselulosanya pun berbeda.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan Kimia

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: labu Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, pipet volumetrik, pipet tetes, *beaker glass*, batang pengaduk, corong gelas, tabung *centrifuge*, labu didih, kondensor, cawan Petri, botol semprot, pipet tetes, pipet mikro, propipet (bulb), tabung reaksi, jarum ose.

Instrumentasi yang digunakan yaitu: blender, *disk mill*, autoklaf, alat *centrifuge*, timbangan analitis, penyaring vakum, pompa vakum, alat *degassing*, *heating* mantel, penangas air, shaker, penyaring milipor, *syringe*, HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, dan detector Refraktif Indeks (RID-10A), pompa LC-20AB, pH meter.

3.1.2. Bahan-bahan kimia yang digunakan

Standar glukosa, xilosa, arabinosa, jerami padi (batang dan merang), H_2SO_4 , air suling, ekstrak khamir, ammonium sulfat, magnesium sulfat, KH_2PO_4 , glukosa, pepton, *malt extract*, agar-agar, NaOH, aquabidest,

alkohol 70%, kertas lakmus merah dan biru, karbon aktif, kertas saring, resin penukar kation dan anion, filter membran nitroselulosa nitrat 0.45 μ m

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Pembuatan Sampel Jerami Padi

Jerami (batang dan merang) dijemur dan dipotong kecil-kecil. Kemudian di oven pada 60°C selama 16 jam. Kemudian dihancurkan/digiling sampai halus. Hasil dari penggilingan ini disaring lagi agar dihasilkan serbuk jerami yang lebih halus. Sampel serbuk halus kulit jerami ini selanjutnya digunakan untuk pengujian berikutnya.

3.2.2 Delignifikasi sampel

Sampel jerami di atas di dewax dengan cara Ekstraksi benzene-etanol (2:1, v/v) selama 8 jam (dengan sokslet). Kemudian endapannya ditambahkan dengan NaOH 1 % pada 55 °C dengan perbandingan Solid:liquid 1:25 selama 2 jam. Setelah itu padatannya diambil dan dinetralkan dengan aquades.

3.2.3 Detoksifikasi Hidrolisat sebelum Fermentasi

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

3.2.4. Pembuatan Larutan Standar

3.2.4.1. Larutan Standar Xilosa

Larutan induk xilosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg xilosa kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat deret larutan standar xilosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 50, 100, 250 dan 500 ppm. Deret larutan standar xilosa ini dianalisis menggunakan HPLC dengan kondisi kecepatan alir 1 mL/menit, suhu oven 80 °C, dan fase gerak yang digunakan adalah aquabides. 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.

3.2.4.2 Larutan Standar Xilitol

Larutan induk xilitol 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg xilitol, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan

aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar xilitol berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 25, 50, dan 100 ppm.

3.2.4.3. Larutan Standar Glukosa

Larutan induk glukosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg glukosa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar glukosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 100, 250, dan 500 ppm.. Langkah pekerjaan selanjutnya, sama seperti tahap 3.2.2.1 di atas.

3.2.4.4. Larutan Standar Arabinosa

Larutan standar arabinosa 500 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg arabinosa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan air sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar arabinosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 100, 250, dan 500 ppm.. Langkah pekerjaan selanjutnya, sama seperti tahap 3.2.2.1 di atas.

3.2.5. Pembuatan Hidrolisat

Serbuk jerami sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 30 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 250°F (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.

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, merupakan kolom penukar kation terdiri dari kalsium dengan kopolimer stiren divinilbenzena.

3.2.6. Sterilisasi alat

Semua alat-alat gelas yang digunakan untuk fermentasi dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 150°C selama 2 jam. Sedangkan alat plastik (*tip*) dan media yang akan digunakan dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf (tekanan 2 atm pada suhu 160°C selama 15 menit).

3.2.7 Penyiapan Inokulum

- Dalam proses ini digunakan sel mikroba berupa ragi dari spesies *Candida fukuyamaensis* yang didapat dari laboratorium mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Center).
- Medium agar yang digunakan untuk pertumbuhan adalah medium YMA dengan komposisi glukosa 10 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L, pepton 5 g/L dan agar 15 g/L
- Kultur – kultur yang didapat dimurnikan dengan metode cawan gores yakni:
 - * Petri berisi medium agar dibagi menjadi empat daerah.
 - * Secara aseptik, biakan yang berada dalam agar miring dipindahkan dengan cara menggesekkan jarum ose sebanyak satu kali.

- * Secara aseptik, jarum ose berisi biakan tadi digores bolak – balik kedalam permukaan petri berisi medium yang telah disiapkan pada bagian tepi daerah pertama.
- * Jarum ose dipijarkan di dalam api dan digunakan untuk menggores petri lagi.
- * Kali ini goresan berikutnya berasal dari permukaan yang telah di gores sebelumnya, tegak lurus dengan tepi petri daerah berikutnya.
- * Goresan dilakukan sama seperti poin sebelumnya terhadap daerah berikutnya hingga keempat daerah tergores semua.

Petri yang telah digores tadi diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 30 °C selama 2 hari. Setelah hari kedua, biakan dalam petri dilakukan pengamatan. Secara aseptis biakan yang dianggap berasal dari sel tunggal diambil dan dipindahkan kedalam agar miring yang telah disiapkan. Biakan dalam agar miring tadi diinkubasi selama 2 hari suhu 30 °C untuk dilakukan fermentasi.

3.2.8 Perhitungan Jumlah Sel Khamir (TPC)

Pada metode ini, sejumlah suspensi diencerkan sampai konsentrasi tertentu dengan air steril, kemudian ditanam dengan metode cawan tuang di atas medium yang sesuai. Suspensi sel khamir (10 mL) *Candida*

Fukuyamaensis diambil sebanyak 1 mL dan dituangkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL air steril. Tabung tersebut merupakan tabung yang berisi suspensi sel khamir dengan pengenceran 10^{-1} kali. Kemudian selanjutnya dari tabung tersebut, dilakukan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-5} kali. Dari tiap tabung hasil pengenceran 10^{-3} dan 10^{-5} suspensi sel khamir tersebut, diambil masing-masing sebanyak 1 mL dan 0,1 mL. Pengambilan volume suspensi 0,1 mL dari pengenceran 10^{-3} merupakan pengenceran 10^{-4} kali, sedangkan pengambilan volume suspensi 0,1 mL dari pengenceran 10^{-5} merupakan pengenceran suspensi sel 10^{-6} kali. Masing-masing pengenceran ini (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) diinkubasi dalam cawan petri yang mengandung medium YMA selama 2 hari. Setelah 2 hari dilakukan perhitungan koloni yang diperoleh (diambil yang berjumlah 30 s.d 300 koloni sel).

3.2.9 Fermentasi

Komposisi medium yang digunakan untuk fermentasi yaitu xilosa 20 g/L, yeast ekstrak 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 diatur 6.

1. Sebelum fermentasi, dilakukan pembuatan suspensi sel terlebih dahulu yakni:
 - Secara aseptik, 9 mL akuades steril dituang kedalam agar miring berisi biakan hasil pemurnian sebelumnya.

- Secara aseptik, jarum ose digoreskan kedalam tabung reaksi tadi dan suspensi yang didapat ditempatkan didalam erlenmeyer steril.
 - Suspensi yang didapat diaduk menggunakan *vortex*.
2. Setelah mendapatkan suspensi sel, suspensi sel sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam 100 mL medium fermentasi yang sebelumnya telah disterilisasi.
 3. Medium fermentasi berisi suspensi sel dan kontrol sebagai pembanding, diinkubasi pada suhu 30 °C selama 2 hari dengan laju guncangan 110 rpm.
 4. Fermentasi dihentikan setelah 2 hari dengan cara memanaskannya dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan diambil filtratnya lalu ditambahkan resin penukar anion dan kation, kemudian disaring dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dan xilitol menggunakan HPLC.

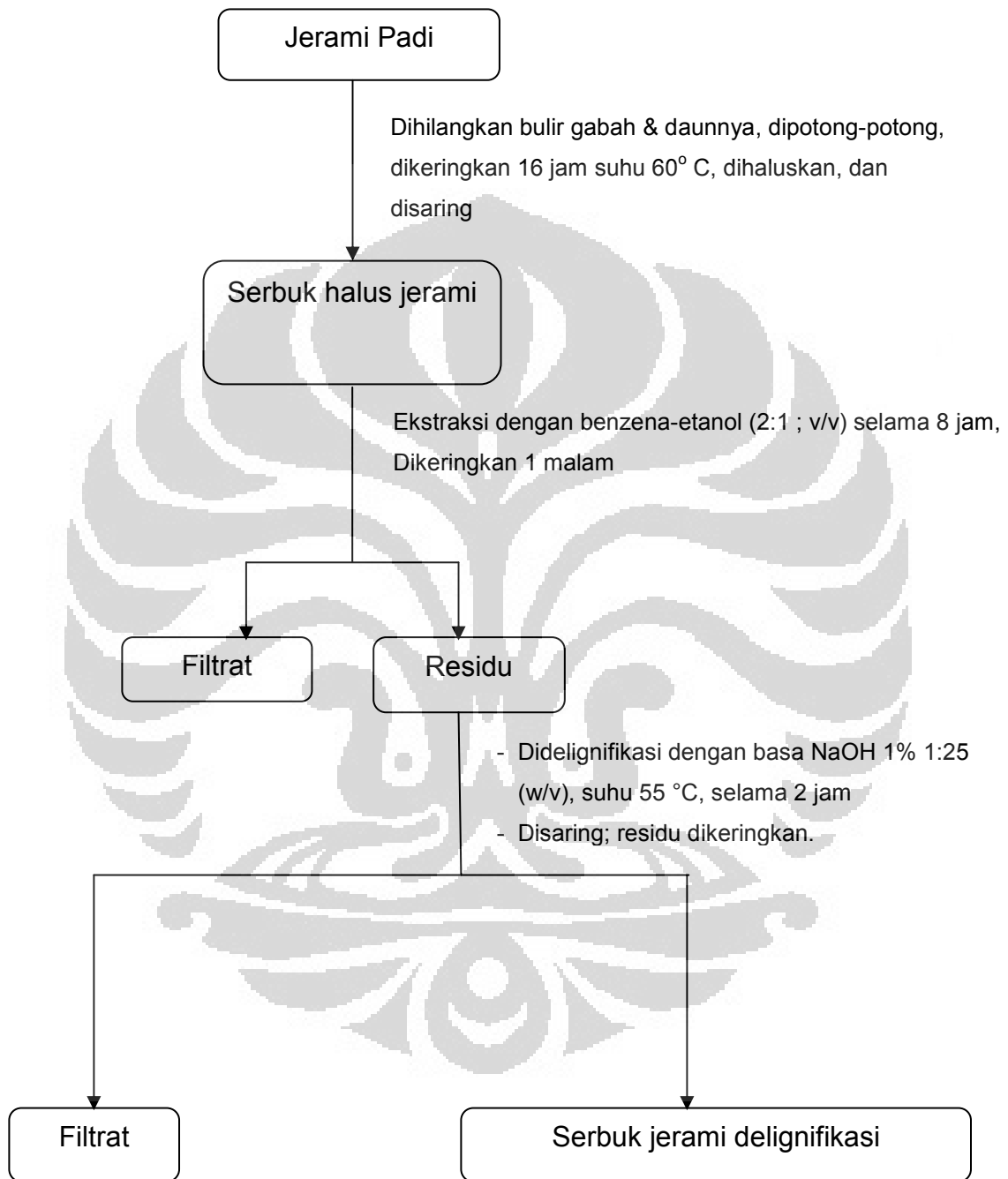
3.2.10 Variasi Kondisi

1. Variasi jenis sampel yang digunakan (serbuk awal tanpa treatment dan sampel delignifikasi).
2. Variasi sampel yang tidak mengalami dan mengalami detoksifikasi
3. Variasi waktu hidrolisis
4. Variasi sampel (batang dan merang)

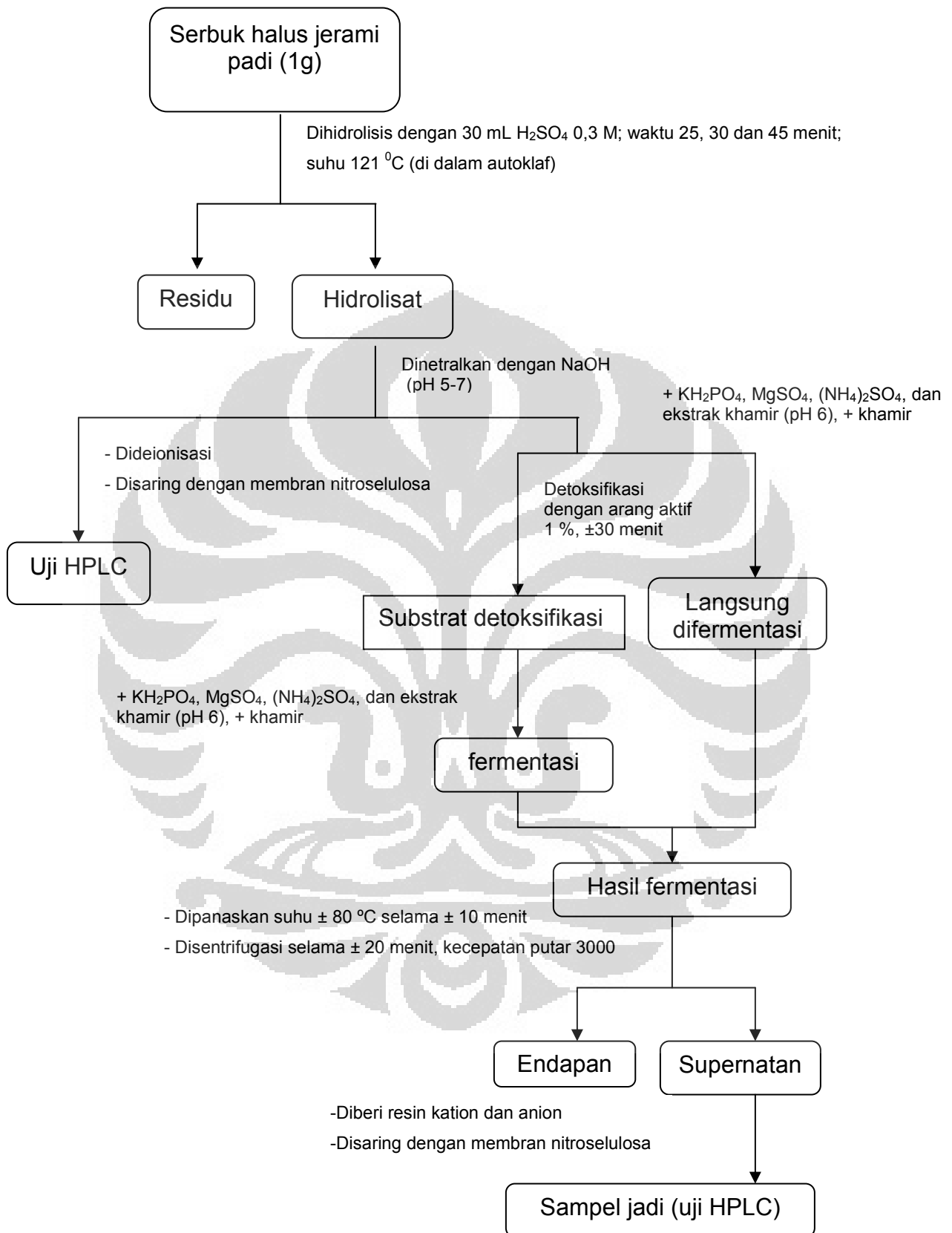
3.2.11 Analisis Produk dengan Alat HPLC Shimadzu dengan Kolom Kalsium Karbohidrat dan Fasa Gerak Akuabides

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, dan suhu kolom 80°C.

3.2.12 Bagan Kerja



Gambar 3.1 Bagan Kerja Delignifikasi



Gambar 3.2 Bagan kerja hidrolisis, detoksifikasi, dan fermentasi

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai kandungan xilosa hasil hidrolisis hemiselulosa yang terdapat pada jerami padi (*Oryza sativa L*) menggunakan katalis asam sulfat untuk menghasilkan xilosa. Xilosa yang dihasilkan digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol dengan metode fermentasi menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR) yaitu dari spesies *Candida fukuyamaensis* UICC Y – 247. Spesies *Candida* ini dipilih berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang menghasilkan xilitol dengan kadar paling tinggi. Spesies *Candida* ini didapatkan dari koleksi UICC yang diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

4.1 Sampling Jerami Padi

Jerami padi yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari tanaman padi yang berasal dari daerah Madiun, Jawa Timur. Jerami padi yang berasal dari Madiun ini jumlahnya cukup berlimpah. Alasan pemilihan jerami padi sebagai sumber hemiselulosa adalah kadar hemiselulosa jerami padi yang cukup tinggi, yaitu sekitar 33,8 %. Selain itu, jerami padi setiap tahunnya dihasilkan dengan jumlah yang besar, sedangkan pemanfaatannya masih

rendah. Oleh sebab itu, jerami padi sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan pembuat xilitol, dan memungkinkan untuk dilakukan dalam skala industri. Jerami padi pada penelitian ini dibedakan menjadi bagian batang dan merang. Hal ini bertujuan untuk mengetahui bagian manakah yang menghasilkan xilosa yang lebih tinggi, yang berpotensi sebagai bahan baku pembuatan xilitol.



Gambar 4.1 Jerami padi A.gambar batang B. merang

4.2 Pembuatan sampel Jerami Padi

Jerami padi yang berasal dari persawahan kemungkinan besar terkena lumpur, oleh karena itu harus dicuci terlebih dahulu sampai bersih. Jerami dibersihkan dari bulir-bulir gabah untuk meminimalisir amilum yang terdapat pada gabah. Selain itu kulit padi/sekam padi juga mengandung

hemiselulosa, sehingga akan menurunkan keakuratan pehitungan xilosa yang terdapat pada jerami. Kemudian jerami padi ini dipotong kecil-kecil dan dipisahkan antara batang dan merang sebagai variasi bagian jerami padi.

Batang dan merang yang sudah dipotong dikeringkan selama 16 jam pada suhu 60° C. Pengeringan ini bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur pada jerami padi selama penyimpanan, karena media yang mengandung kadar gula dan air sangat tinggi rentan untuk ditumbuhi jamur. Jerami padi yang sudah kering ini kemudian dihaluskan menggunakan blender. Penghalusan ini dilakukan untuk memperbesar luas permukaan sehingga mempermudah proses hidrolisis, karena semakin besar luas permukaan, maka semakin besar kontak antara substrat dengan asam. Setelah dihaluskan, batang dan merang padi yang sudah halus tersebut disaring dengan penyaring tepung agar ukurannya menjadi lebih homogen. Sampel ini merupakan sampel tanpa perlakuan lanjutan.

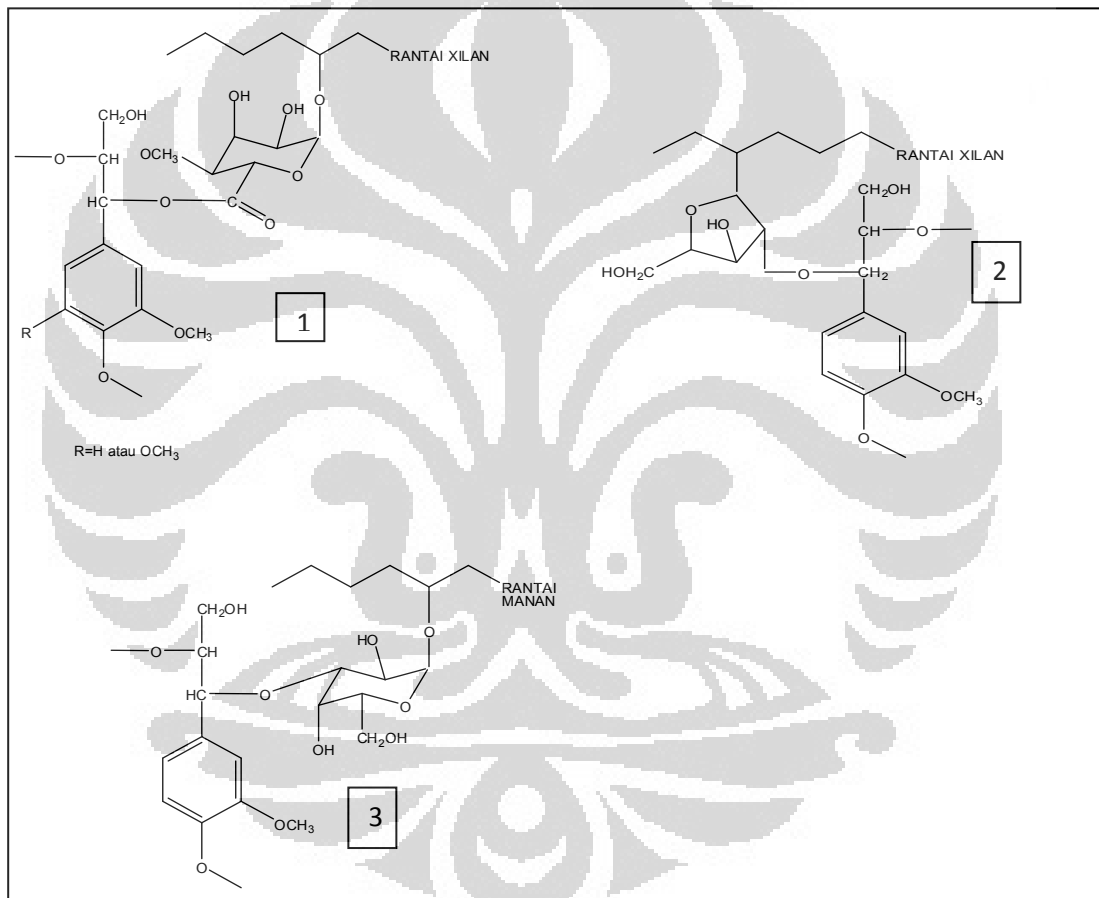
4.3 Delignifikasi Serbuk Jerami Padi

Delignifikasi merupakan upaya untuk menghilangkan lignin yang terdapat pada substrat yang bisa menghambat terlepasnya hemiselulosa pada reaksi hidrolisis. Delignifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan larutan alkali. Delignifikasi substrat dilakukan sebelum hidrolisis agar hasil degradasi lignin berupa senyawa-senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan khamir dapat dihilangkan pada tahapan ini, selain itu ditujukan

juga agar kontak asam dan hemiselulosa lebih mudah dengan hilangnya lignin. Perlakuan pertama sebelum delignifikasi adalah mengekstrak serbuk jerami dengan soklet menggunakan benzena-etanol untuk menghilangkan lemak, minyak, dan kandungan lilin pada batang dan merang padi. Pada proses ekstraksi digunakan campuran benzena-etanol karena campuran tersebut memiliki kepolaran yang hampir sama dengan lemak, minyak, dan lilin sehingga zat tersebut dapat terlepas dari jerami dan larut dalam campuran benzena-etanol. Selain itu titik uap campuran tersebut tidak jauh berbeda dan tidak begitu tinggi, sehingga mudah dihilangkan dari substrat dengan penguapan.

Serbuk jerami hasil perlakuan diatas kemudian didelignifikasi dengan larutan alkali. Larutan alkali yang digunakan adalah NaOH 1 % dengan perbandingan 1:25 (w/v).³³ Larutan ini dijaga dengan suhu konstan 55°C selama 2 jam, agar reaksi delignifikasi berjalan sempurna. Setelah 2 jam, larutan serbuk batang dan merang dengan alkali yang awalnya berwarna kuning bening berubah menjadi coklat tua. Hal ini menunjukkan adanya zat yang terlepas dalam larutan ini. Lignin merupakan polimer dari unit-unit fenil propana yang bersifat asam. Lignin dapat bereaksi dengan NaOH menghasilkan monomer-monomer fenil propana. Larutan NaOH yang bersifat basa bereaksi dengan lignin yang terkandung dalam sampel batang dan jerami padi dengan memutus ikatan-ikatan eter antara unit-unit fenil propana menjadi monomer-monomernya, menurunkan berat molekul, dan

menghasilkan gugus-gugus fenolik bebas. Dengan demikian, reaksi dengan alkali akan menaikkan hidrofilitas lignin, sehingga lebih mudah larut dalam air. Bersamaan dengan degradasi lignin, kemungkinan beberapa karbohidrat juga terdegradasi dan ikut larut. Pemecahan ikatan-ikatan glikosida karbohidrat oleh alkali biasanya lebih lambat bila dibandingkan dengan hidrolisis yang dikatalisis oleh asam.¹



Gambar 4.2. Contoh-contoh ikatan antara lignin dan karbohidrat: ikatan ester dengan xilan melalui asam 4-O-metil glukuronat sebagai gugus penghubung (1), ikatan eter dengan xilan melalui unit arabifuranosa (2), dan ikatan eter galaktoglukomanan melalui unit galaktopiranososa.¹

Sampel yang sudah diberi NaOH ini kemudian dipisahkan antara filtrate dan residunya. Residu yang dihasilkan dinetralkan dengan air, setelah itu dikeringkan kembali. Sampel ini disebut sampel delignifikasi yang kemudian akan dihidrolisis menggunakan asam.

4.4 Hidrolisis Jerami Padi

Reaksi hidrolisis digunakan untuk memecah ikatan hemiselulosa. Hidrolisis jerami padi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Alat autoklaf digunakan sebagai alternatif agar reaksi hidrolisis dapat berlangsung pada suhu tinggi lebih dari 100°C dan tekanan yang tinggi.² Variasi yang digunakan dalam proses hidrolisis adalah variasi waktu hidrolisis dan substrat yang digunakan.

Hemiselulosa merupakan senyawa heteropolisakarida sehingga hasil hidrolisisnya dengan asam akan menghasilkan produk campuran, karena asam memecah ikatan glikosida pada polisakarida secara acak. Asam yang digunakan untuk hidrolisis adalah asam sulfat, karena asam sulfat merupakan katalis yang baik untuk reaksi hidrolisis. Konsentrasi asam yang digunakan adalah 0,3 M karena pada konsentrasi ini hemiselulosa sudah dapat dihidrolisis, sedangkan selulosa belum sempat terhidrolisis semua karena ikatan hemiselulosa lebih lemah dibanding selulosa.²¹ Hal ini berkaitan dengan struktur hemiselulosa yang berbentuk amorf sehingga lebih mudah dihidrolisis. Sedangkan selulosa berbentuk mikrofibril yang kristalin,

teratur memiliki rigiditas yang tinggi, sehingga lebih sulit dihidrolisis dibanding hemiselulosa.¹⁶

Proses hidrolisis pada penelitian ini menghasilkan hidrolisat yang berwarna coklat tua, berbau harum, dan residu yang berupa endapan. Residu ini diperkirakan masih mengandung hemiselulosa, selulosa, dan lignin yang belum terhidrolisis. Ikatan glikosida mudah dipecah oleh asam, sehingga pada hidrolisat atau filtrat kemungkinan mengandung monomer-monomer gula yang sebagian berasal dari hemiselulosa dan sebagian lain dari selulosa. Filtrat dan residu dipisahkan melalui penyaringan.

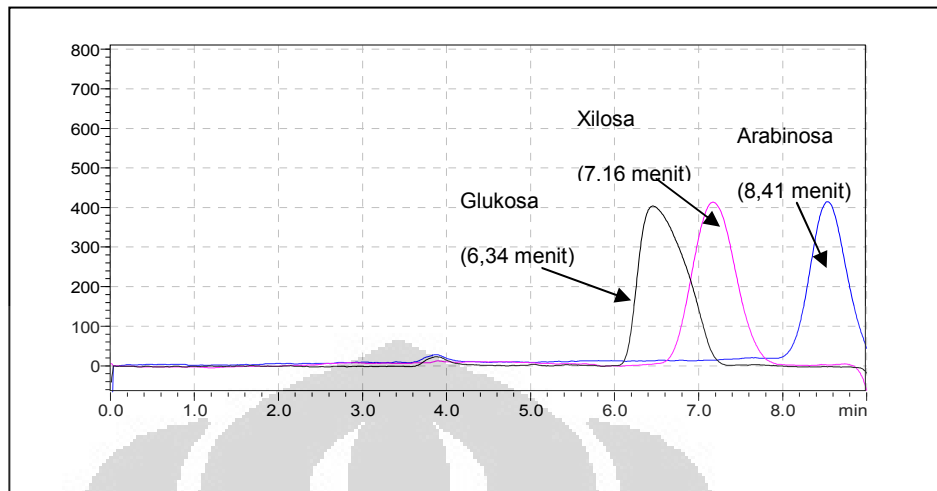
Hidrolisat yang bersifat asam dinetralkan dengan larutan NaOH hingga mencapai pH 5-7. Penetralkan ini dimaksudkan agar kelebihan asam tidak dapat menghidrolisis hemiselulosa yang mungkin belum terhidrolisis sempurna, sehingga dapat mempengaruhi konsentrasi gula yang dihasilkan. Selain itu, untuk mencegah proses degradasi gula menjadi senyawa furfural oleh katalis asam. Reaksi antara NaOH dengan hidrolisat berdasarkan reaksi penetralan atau reaksi asam basa, yaitu ion sulfat dan ion H^+ bereaksi dengan NaOH menghasilkan Na_2SO_4 dan air. pH hidrolisat tidak lebih dari 7 karena jika hidrolisat bersifat basa dikhawatirkan cincin karbohidrat yang ada akan rusak.³¹ Hidrolisat yang dihasilkan merupakan larutan bening dan berwarna kuning kecoklatan.

Hasil hidrolisis ini kemudian dideionisasi. Resin kation dan anion ditambahkan secara bergantian hingga larutan akhir hidrolisat bersifat netral. Penambahan resin bertujuan agar pada larutan hidrolisat bersifat netral dan

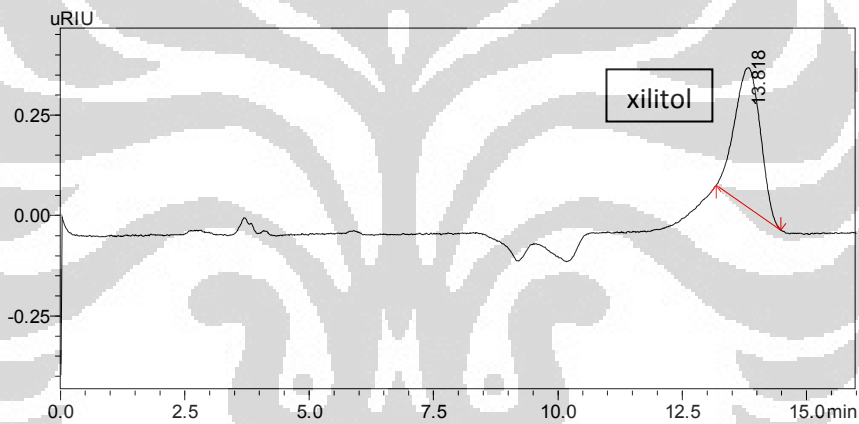
tidak mengandung ion logam agar tidak merusak kolom kromatografi. Untuk mengetahui kadar gula hasil hidrolisis, maka pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Pelarut yang digunakan adalah aquabides, karena pelarut ini dianggap sebagai pelarut yang terbaik untuk memisahkan gula-gula seperti xilosa dan glukosa menggunakan kolom kalsium untuk karbohidrat. Suhu kolom dijaga 80°C untuk menurunkan viskositas gula karbohidrat. Laju alir yang digunakan adalah 0,1mL/menit.

4.5 Identifikasi Standar Karbohidrat

Masing-masing standar karbohidrat diukur menggunakan HPLC Shimadzu Prominence-20 dengan kolom kalsium untuk karbohidrat dengan detektor Refraktif Indeks (RID-10A) untuk menentukan kandungan hasil hidrolisis. Uji kualitatif mengacu pada waktu retensi masing-masing jenis karbohidrat. Sedangkan untuk uji kuantitatif dapat diketahui dengan melihat luas area peak 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 gambar kromatogram, xilosa ditunjukkan dengan adanya puncak pada waktu sekitar 7 menit, glukosa pada waktu sekitar 6 menit, dan fruktosa pada waktu sekitar 8 menit. Berikut ini adalah kromatogram HPLC untuk setiap standar karbohidrat.



Gambar 4.3 Kromatogram standar karbohidrat

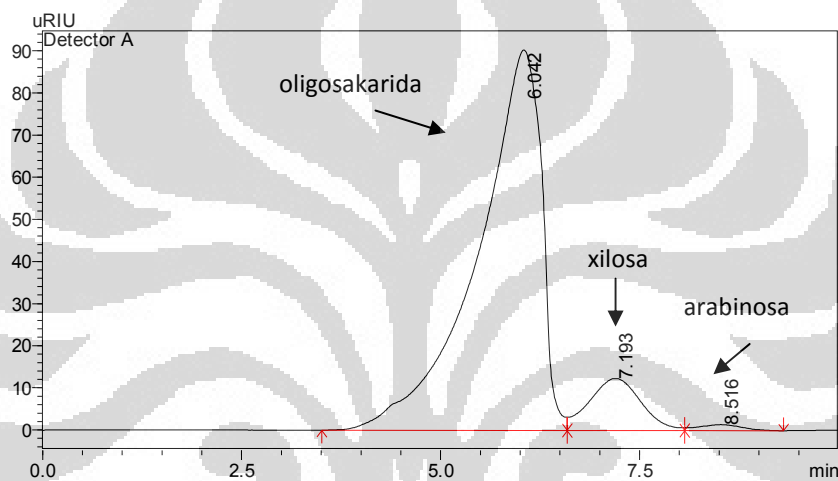


Gambar 4.4 Kromatogram standar xilitol 100 ppm

Semua hasil pengukuran HPLC berupa kromatogram dan grafik deret standar tertera pada lampiran 1 dan 2.

4.6 Hasil Hidrolisis Jerami Padi

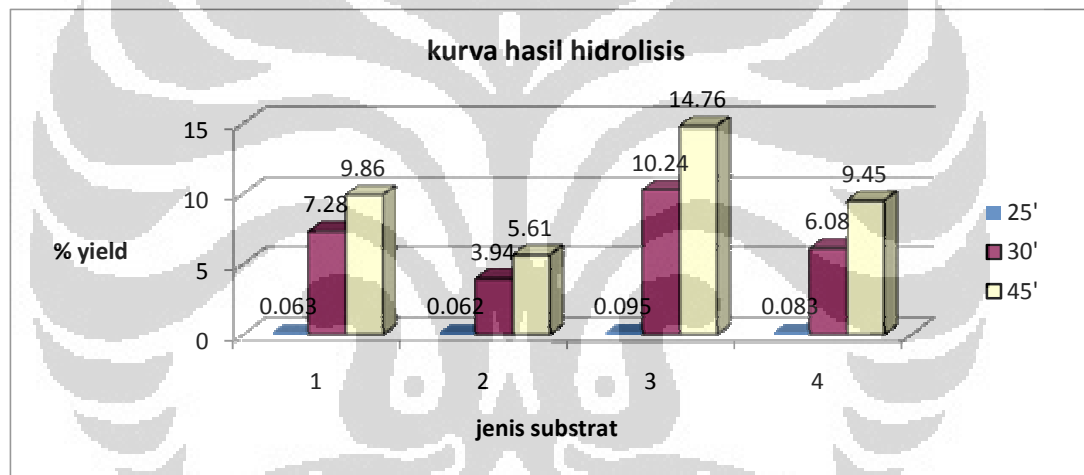
Pada hidrolisis kali ini hanya dilakukan variasi waktu dan jenis substrat, sedangkan perlakuan yang lain merupakan kondisi optimum pada penelitian sebelumnya. Gambar kromatogram hasil hidrolisis dapat dilihat dibawah ini.



Gambar 4.5 Kromatogram hidrolisat

Hidrolisis jerami padi menghasilkan produk xilosa, arabinosa. Sedangkan puncak yang paling besar diperkirakan sampel karbohidrat (hemiselulosa dan selulosa) yang belum terhidrolisis berupa oligosakarida. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis xilan, sedangkan arabinosa berasal dari hidrolisis cabang rantai induk xilan. Pada kromatogram tidak ada puncak glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi asam yang rendah, selulosa belum terhidrolisis karena ikatan pada selulosa lebih kuat dibanding ikatan pada hemiselulosa.^{1,12}

Variasi waktu hidrolisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah 25, 30 dan 45 menit, serta variasi substrat berupa merang-batang awal dan merang-batang delignifikasi. Konsentrasi asam yang digunakan semua sama, yaitu 0,3 M. Dari variasi tersebut, xilosa didapatkan paling banyak pada waktu hidrolisis 45 menit. Waktu 45 menit ini masih belum bisa disimpulkan sebagai waktu optimum hidrolisis karena diatas waktu hidrolisis ini belum diketahui kadar xilosa menjadi naik atau turun. Data dapat dilihat pada tabel berikut.



Gambar 4.6 Kurva hasil hidrolisis

1. batang awal
2. batang delignifikasi
3. merang awal
4. merang delignifikasi

Semakin lama waktu berlangsungnya proses hidrolisis kimiawi, maka semakin banyak ikatan-ikatan glikosida pada polisakarida yang terputus membentuk monomer-monomernya.³⁴ Hal ini sesuai dengan kecenderungan

kadar xilosa yang semakin meningkat seiring bertambahnya waktu hidrolisis. Berdasarkan dari penelitian sebelumnya, setelah mencapai waktu optimum kadar xilosa cenderung turun. Hal itu dikarenakan furfural dan HMF yang terbentuk semakin bertambah seiring dengan meningkatnya waktu hidrolisis, sehingga jumlah xilosa yang terdegradasi akan jauh lebih banyak, dibandingkan dengan penambahan dari masing-masing xilosa baru yang terbentuk.³²

Xilosa yang dihasilkan pada substrat yang awal memiliki kadar yang lebih tinggi dibanding substrat delignifikasi. Hal ini kemungkinan disebabkan beberapa molekul hemiselulosa terlepas pada saat proses delignifikasi, sehingga xilosa yang didapatkan pada hidrolisis juga lebih rendah dibanding substrat yang tanpa delignifikasi. Data di atas menunjukkan bahwa kandungan xilosa pada merang padi lebih tinggi dibanding pada batang padi. Diperkirakan hal tersebut berhubungan dengan kandungan hemiselulosa awal pada merang lebih tinggi dibanding pada batang.

4.7 Detoksifikasi hidrolisat dengan arang aktif

Proses hidrolisis terhadap substrat selain mendegradasi polisakarida, ternyata bisa menghasilkan beberapa senyawa pengotor yang bersifat toksik bagi sel khamir seperti hidroksi-metil-furfural dan furfural (degradasi produk gula monosakarida), asam asetat (substansi yang dilepaskan dari struktur hemiselulosa), beberapa senyawa aromatik dan fenolik (produk degradasi

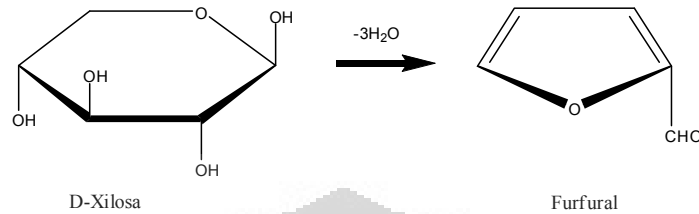
lignin) dan inhibitor yang berasal dari logam atau mineral dalam jerami.²⁰

Selain masalah toksisitas, reaksi oksidasi fenol selama penetralan hidrolisat menghasilkan pigmen berwarna coklat yang dapat menurunkan kualitas dari makanan.

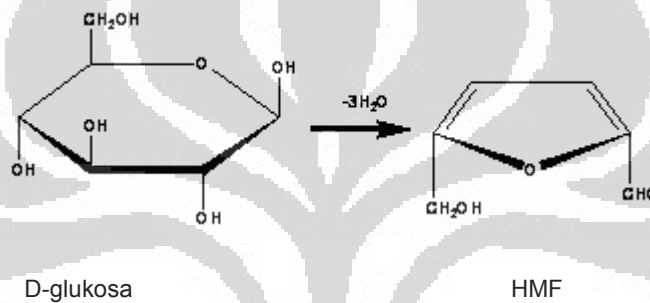
Senyawa-senyawa di atas harus dihilangkan karena dapat bersifat racun (inhibitor) bagi mikroorganisme. Bila senyawa-senyawa furfural ini tidak dihilangkan maka dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme sehingga mengganggu proses fermentasi dan menurunkan hasil biokonversi xilosa menjadi xilitol. Oleh karena itu, sebelum proses fermentasi perlu perlakuan detoksifikasi dengan menambahkan arang aktif pada hidrolisat untuk meminimalisir kadar senyawa beracun pada hidrolisat dengan cara adsorpsi sehingga senyawa-senyawa di atas bisa tertarik ke dalam pori-pori karbon aktif.²⁷

Dalam penelitian ini, proses detoksifikasi dilakukan dengan menambahkan 1% arang aktif (w/v) ke dalam hidrolisat sampel serbuk kayu dan dikocok dengan *shaker* selama 30 menit. Menurut penelitian terdahulu, metode detoksifikasi dengan 1 % arang aktif, dapat mengadsorpsi sebagian besar komponen toksik pada hidrolisat, tanpa adanya xilosa yang hilang.²⁰ Setelah beberapa saat, maka filtrat dan endapannya disaring menggunakan kertas saring biasa (rangkap dua). Filtrat ini menjadi lebih bening dari sebelumnya, kemungkinan dikarenakan senyawa-senyawa pengotor di atas telah berkurang.

Degradasi xilosa menjadi furfural dan glukosa menjadi hidroksi-metil-furfural dapat dilihat pada Gambar berikut.



Gambar 4.7 Reaksi β -D-xilopiranososa menjadi furfural



Gambar 4.8 Reaksi β -D-glukopiranososa menjadi HMF

4.8 Fermentasi

Peralatan dan media yang akan digunakan untuk fermentasi menggunakan mikroba sebelumnya harus disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme yang lain.

Media yang digunakan sebagai media tumbuh khamir ini adalah YMA (*Yeast Malt Agar*) yang terdiri dari: ekstrak khamir, ekstrak malt, pepton, glukosa, dan agar. Sebelum digunakan untuk fermentasi, isolat khamir yang didapat dipurifikasi dengan metode cawan gores menggunakan media di atas dan diinkubasi selama 3 hari. Metode ini merupakan cara yang paling umum

dan mudah untuk pemurnian mikroorganisme dari kontaminasi mikroorganisme lain. Hasil pemurnian dengan metode cawan gores kemudian dipindahkan dan dinkubasi pada media agar miring dan digunakan sebagai *stock culture*. Waktu inkubasi pada agar miring ini adalah selama 2 hari.

Proses biokonversi menggunakan Khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 yang dapat menghasilkan enzim *xylose* yang dapat mengkatalisis *NADH-dependent xylose reductase*, sehingga dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Selain itu, berdasarkan penelitian sebelumnya, *Candida fukuyamaensis* merupakan penghasil xilitol yang terbaik dibandingkan dengan khamir yang lain. Inokulum khamir yang berumur 2 hari dibuat suspensi dengan menambahkan air steril 10 mL. Inokulum ini kemudian ditumbuhkan pada hidrolisat jerami padi yang mengandung xilosa sebagai sumber karbon dan ditambahkan senyawa kimia lain, yaitu: Ekstrak khamir sebagai sumber vitamin B, sumber C dan N, sedangkan KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ merupakan sumber mineral. pH media diatur pada pH 6 karena pH ini merupakan pH optimal untuk pertumbuhan khamir.

Media fermentasi disterilisasi terlebih dahulu sebelum ditambahkan inokulum. Garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ disterilisasi secara terpisah dengan media lainnya. Hal ini dilakukan untuk mencegah reaksi antara ion ammonium dengan gula yang ada pada media. Reaksi ini disebut reaksi *Maillard*²⁷ yaitu reaksi pencoklatan (*browning reaction*) yang menyebabkan terjadinya

pencoklatan dan rasa pahit pada makanan. Munculnya reaksi Maillard menunjukkan bahwa ada beberapa struktur karbohidrat yang telah rusak.

Suspensi khamir sebanyak 2,5 mL yang mengandung $6,45 \times 10^7$ sel khamir diinokulasikan ke dalam 50 mL hidrolisat jerami yang sudah ditambah media fermentasi. Media ini kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* agar suhu fermentasi tetap terjaga. Penggunaan *shaker* bertujuan untuk homogenisasi reaksi serta untuk penyebaran substrat dan media fermentasi. Fermentasi dilakukan selama 3 hari dan diambil setiap 12 jam untuk diukur dengan HPLC. Hal ini dilakukan untuk mendapat kurva produk sehingga dapat diketahui kapan tercapainya kondisi optimum pembentukan xilitol.

4.9 Hasil Fermentasi

Hidrolisat hasil fermentasi berwarna kuning keruh dan lebih kental dibanding hidrolisat awal. Kemungkinan perubahan tekstur tersebut dikarenakan adanya pertumbuhan sel khamir dan produksi metabolit hasil samping fermentasi. Untuk menghentikan proses fermentasi dilakukan dengan memanaskan sampel hasil fermentasi pada suhu 80°C selama 10 menit. Pemanasan ini ditujukan untuk mengurangi aktivitas khamir tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada.

Produk fermentasi yang di dapat disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit karena pada kecepatan ini sel khamir telah memisah

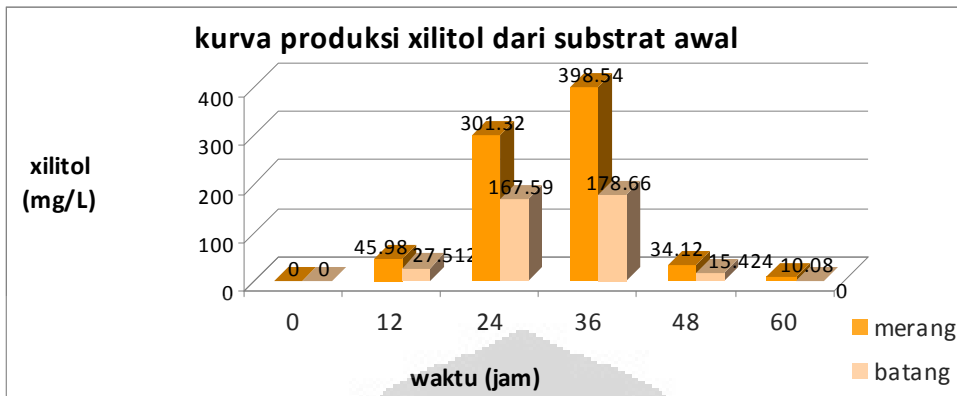
dari media dan metabolitnya, kemudian disentrifugasi ini dipisahkan dengan cara dekantasi dan kemudian dideionisasi untuk selanjutnya dianalisis kadar xilosa dan xilitol dengan menggunakan alat HPLC. Hasil kromatogram yang didapat dari pengukuran ditentukan luas areanya dan besarnya dibandingkan dengan luas area standar xilosa dan xilitol yang sebelumnya telah diketahui. Kromatogram dan data perhitungan hasil fermentasi tertera Lampiran 4 dan Lampiran 6.

Pada penelitian ini dilakukan variasi terhadap substrat jerami padi yang dipisahkan menjadi dua kelompok utama, yaitu merang dan batang. Masing-masing substrat ini kemudian divariasikan menjadi

1. substrat awal,
2. substrat detoksifikasi dengan arang aktif,
3. substrat delignifikasi,
4. substrat detoksifikasi dan delignifikasi.

Hasil Fermentasi substrat awal (standar)

Hal pertama yang dilakukan adalah pengecekan terhadap hasil fermentasi merang dan awal (standar). Maksud dari substrat awal adalah sampel serbuk merang dan batang langsung dihidrolisis tanpa mengalami perlakuan terlebih dahulu dan langsung difermentasi. Substrat awal ini dijadikan standar bagi substrat dengan berbagai perlakuan berikutnya.

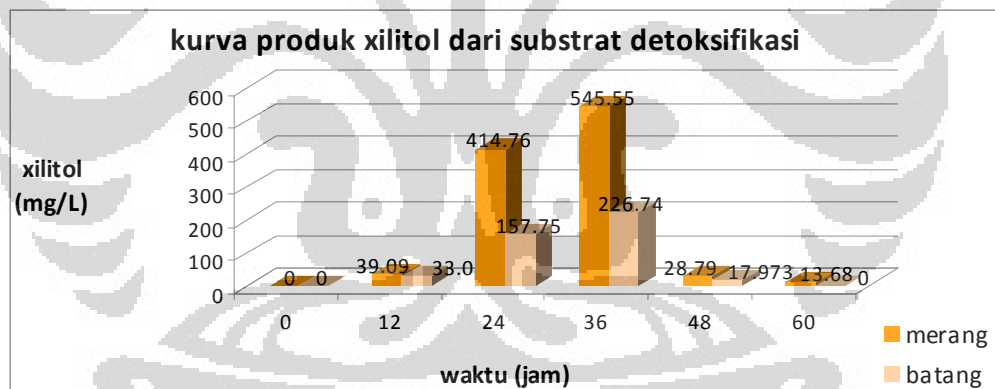


Gambar 4.9 Kurva produksi xilitol dari substrat awal

Dari data di atas, fermentasi pada merang menghasilkan kandungan xilitol yang lebih tinggi dibanding pada batang, karena kandungan xilosa pada merang lebih banyak dibanding pada batang. Waktu optimum xilitol yang di dapat baik merang maupun batang adalah berada pada jam ke-36, yaitu 398,5 mg/L pada merang dan 178,7 mg/L pada batang. Setelah waktu optimum, xilitol yang dihasilkan mengalami penurunan. Hal ini disebabkan sumber karbon pada hidrolisat yaitu xilosa sudah mulai berkurang sehingga khamir mulai merubah xilitol menjadi xilulosa yang kemudian akan masuk ke jalur *pentose phosphate pathway* (PPP) yang hasil terakhirnya akan menjadi etanol.^{1,24,25}

4.9.2 Hasil Fermentasi Substrat dengan Perlakuan Detoksifikasi

Berdasarkan penjelasan sebelumnya, setelah substrat dihidrolisis, selain dihasilkan senyawa yang diinginkan, juga dihasilkan senyawa-senyawa yang bersifat toksik. Oleh karena itu, substrat perlu didetoksifikasi menggunakan arang aktif untuk mengadsorpsi senyawa toksik. Arang aktif ini ditambahkan pada hidrolisat sebanyak 1% dan di kocok dengan *shaker* selama 30 menit. Kemudian setelah penyaringan, hidrolisat langsung difermentasi. Hasil xilitol yang di dapat adalah sebagai berikut:



Gambar 4.10 Kurva produksi dari substrat detoksifikasi

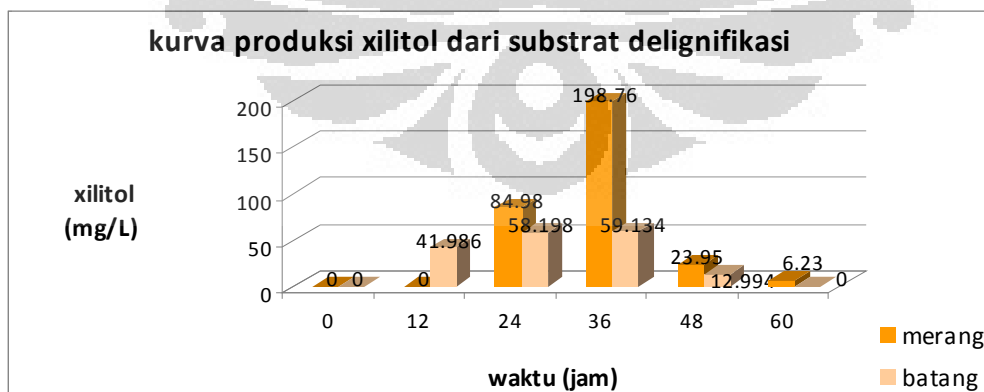
Dari data di atas xilitol pada kondisi optimum merang detoksifikasi adalah 545,6 mg/L dan batang 226,7 mg/L. Kondisi yang dihasilkan masih sama dengan fermentasi substrat tanpa perlakuan, dimana pada kondisi optimum substrat merang menghasilkan xilitol

yang lebih banyak dibanding batang. Waktu optimum yang dihasilkan masih berada pada jam ke-36.

Kandungan xilitol yang di dapat lebih tinggi dibanding substrat standar. Hal ini disebabkan senyawa-senyawa toksik yang ada pada hidrolisat diadsorpsi oleh karbon aktif sehingga konversi xilosa ke xilitol lebih besar. Selisih % konversi substrat detoksifikasi dengan standar (kondisi optimum) adalah 3,83 % untuk merang dan 2,04 % untuk batang.

4.9.3 Hasil Fermentasi Substrat dengan Perlakuan Delignifikasi

Substrat merang dan batang setelah dihaluskan diberi perlakuan delignifikasi. Degradasi lignin dapat mengganggu proses fermentasi, oleh karena itu sebelum dihidrolisis lignin harus dihilangkan terlebih dahulu. Hasil xilitol ditunjukkan pada Gambar 4.11



Gambar 4.11 Kurva produksi xilitol dari substrat delignifikasi

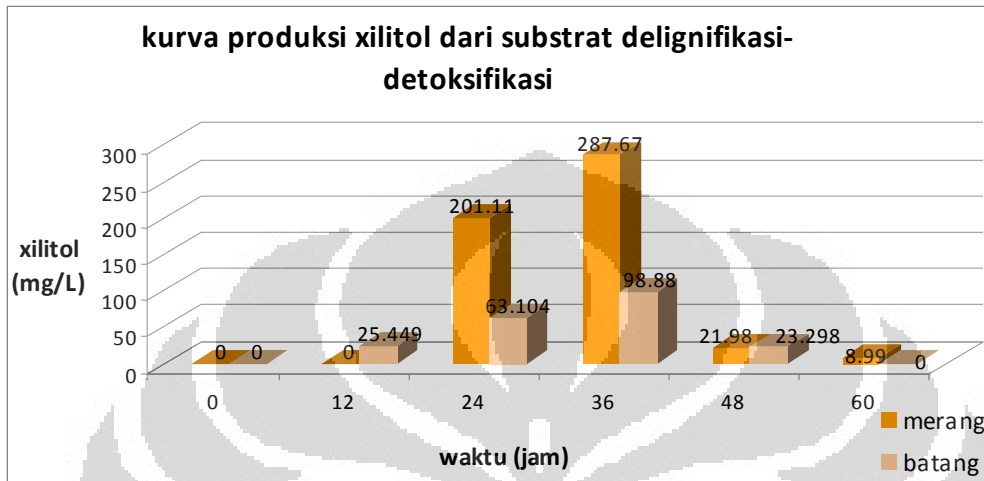
Pada perlakuan delignifikasi ini xilosa pada substrat lebih kecil dibanding substrat tanpa delignifikasi. diperkirakan sebagian xilosa terlepas pada saat proses delignifikasi sehingga tercampur dalam larutan. Xilitol yang dihasilkan juga lebih rendah dibanding substrat tanpa delignifikasi. Pada perlakuan delignifikasi, xilitol pada kondisi optimum yang dihasilkan merang tetap lebih tinggi dibanding batang. Hasil xilitol optimum pada merang adalah 198,8 mg/L dan batang 59,1 mg/L. Pada penelitian ini waktu optimum xilitol terbentuk adalah pada jam ke-36.

Pada perlakuan delignifikasi ini menghasilkan % konversi yang lebih tinggi dibanding standar. Hal ini sesuai dengan pernyataan sebelumnya bahwa proses delignifikasi dapat menghilangkan lignin yang mengganggu proses fermentasi. Selisih % konversi xilitol hasil perlakuan delignifikasi dengan xilitol standar adalah 1,89% untuk merang dan 0,32 % untuk batang.

4.9.4 Hasil Fermentasi Substrat dengan Perlakuan Delignifikasi & Detoksifikasi

Pada perlakuan ini digabungkan metode delignifikasi substrat awal dan metode detoksifikasi setelah dihidrolisis. Tujuan dari perlakuan ini agar konversi xilosa ke xilitol lebih tinggi dibandingkan

perlakuan yang lain karena diasumsikan bahwa senyawa toksik pada hidrolisat sebelum fermentasi sudah hilang.

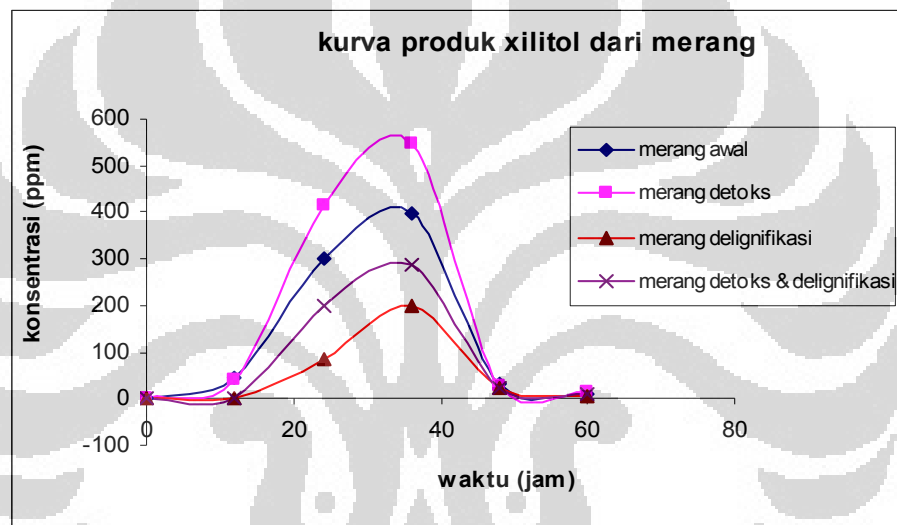


Gambar 4.12 Kurva produksi xilitol dari substrat delignifikasi-detoksifikasi

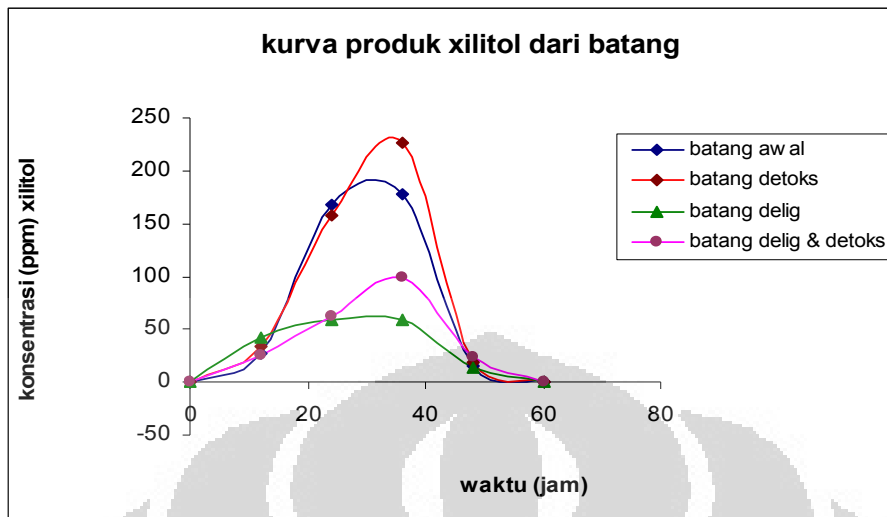
Pada metode ini xilitol yang dihasilkan xilitol dari substrat merang lebih tinggi dibanding pada batang. Kadar xilosa pada merang adalah 287,7 mg/L dan batang 98,9 mg/L. Dengan metode ini, xilitol yang dihasilkan lebih rendah dibanding standar karena sebagian xilosa hilang pada saat perlakuan delignifikasi. Pada perlakuan ini waktu optimum xilitol terbentuk masih sama dengan perlakuan sebelumnya yaitu pada jam ke-36.

Persen konversi yang didapatkan pada perlakuan ini lebih besar dibanding standar. Selisih % konversi dengan standar adalah 6,81 % pada merang dan 2,50 % pada batang.

Dari berbagai perlakuan, dapat kita bandingkan hasil fermentasi xilitol dari substrat merang dan batang agar dapat diambil suatu kesimpulan. Berbagai variasi di atas Fermentasi dilakukan untuk mengetahui perlakuan mana yang akan menghasilkan xilitol paling banyak dan persen konversi yang paling tinggi. Hasil fermentasi variasi substrat di atas dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 4.13 Perbandingan xilitol pada variasi substrat merang



Gambar 4.14 Perbandingan xilitol pada variasi substrat batang

Berdasarkan perhitungan persen konversi xilitol terhadap sampel awal didapatkan bahwa perlakuan substrat dengan detoksifikasi menghasilkan persen konversi xilitol yang paling optimum dibanding dengan perlakuan lain, yaitu pada merang 1,6% dan pada batang 0,7%, sedangkan kadar xilitol adalah 545,6 mg/L pada merang dan batang 226,7 mg/L.

Pada proses kurva diatas terlihat bahwa substrat merang dan batang detoksifikasi menghasilkan xilitol dengan konsentrasi yang paling tinggi. Kemungkinan hal ini disebabkan xilosa awal pada substrat detoksifikasi cukup tinggi, sebanding dengan substrat awal tetapi lebih tinggi dibanding substrat delignifikasi dan detoksifikasi. Pada substrat detoksifikasi, beberapa senyawa beracun yang bersifat inhibitor bagi khamir dapat diserap oleh karbon aktif sehingga xilitol yang dihasilkan lebih tinggi dibanding substrat awal tanpa detoksifikasi. Sedangkan pada substrat delignifikasi dan

substrat delignifikasi & detoksifikasi memiliki kandungan xilitol yang lebih rendah karena xilosa yang didapat dari hidrolisis juga mempunyai kandungan yang lebih rendah dibanding substrat tanpa delignifikasi. Hal ini diperkirakan karena pada substrat delignifikasi sebagian xilosa yang terkandung dalam hemiselulosa ikut terlepas bersama NaOH pada tahap delignifikasi. Substrat yang mengalami proses delignifikasi & detoksifikasi menghasilkan xilitol yang lebih tinggi dibanding merang delignifikasi tanpa detoksifikasi karena khamir dapat bekerja lebih optimum dengan hilangnya senyawa beracun dari hidrolisat.

Pertumbuhan *C. fukuyamaensis* sangat berpengaruh terhadap produksi xilitol karena produksi xilitol akan optimal hanya pada saat pertumbuhan sel berada dalam fase eksponensial. Pada fase ini pertumbuhan sel terjadi dengan cepat dan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya, seperti kandungan nutrisi, kondisi lingkungan, dan kandungan senyawa inhibitor.³⁵ Perlakuan di atas akan menghasilkan kondisi lingkungan yang berbeda-beda dan hal inilah yang menyebabkan xilitol yang dihasilkan juga berbeda.

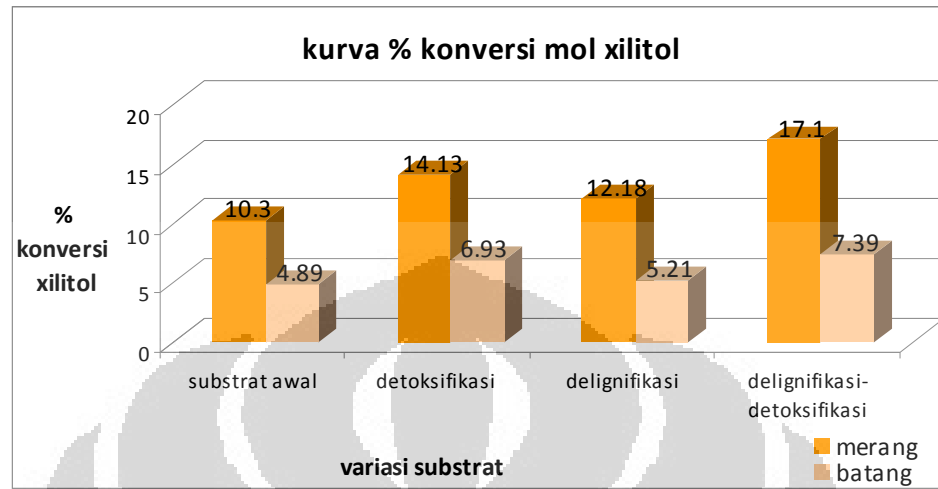
Dari Gambar 4.13 dan 4.14 terlihat bahwa produk berupa xilitol mulai terbentuk pada jam ke 12. Pada jam ke 12 merupakan awal dari fase eksponensial, dimana sel melakukan metabolisme untuk penyimpanan cadangan energi. Pada fase ini mulai terbentuk metabolit seperti xilitol karena kandungan NADH dalam sel mengalami akumulasi. Salah satu penyebab terjadinya akumulasi NADH adalah kandungan oksigen yang terbatas pada

medium. Terakumulasinya NADH menyebabkan aktivitas dari enzim *xilose reductase* lebih dominan dibandingkan enzim *xilitol dehidrogenase*. Aktivitas enzim *xilose reductase* dipengaruhi oleh jumlah NADH dalam sel. Tingginya aktivitas enzim *xilose reductase* juga dapat terlihat pada konsumsi xilosa yang tinggi.⁴

Fase eksponensial ini berlangsung sampai jam ke-36, dimana metabolit (xilitol) yang dihasilkan mengalami peningkatan hingga mencapai kondisi maksimum. Setelah jam ke-36 hingga jam ke-60 mengalami fase stasioner yang ditunjukkan dengan penurunan kurva produk. Fase stasioner terjadi karena xilosa sebagai sumber karbon telah menipis, padahal xilosa terlebih dahulu digunakan oleh *C. fukuyamaensis* untuk memenuhi kebutuhan akan sumber karbon. Akibatnya pada saat kebutuhan sel akan sumber karbon sudah terpenuhi, hanya tinggal sedikit xilosa yang dapat dikonversi menjadi xilitol sehingga produksi xilitol menurun. Selain itu pada saat sumber karbon terbatas, khamir akan mengkonsumsi xilitol yang telah di produksinya jika pada saat itu jumlah xilosa hampir habis.³⁵

Xilitol yang dihasilkan seharusnya memiliki perbandingan sama dengan xilosa yang tersedia. Akan tetapi, tidak semua xilosa dikonversi menjadi xilitol karena sebagian xilosa digunakan untuk pertumbuhan khamir.

Persen konversi xilitol terhadap xilosa awal menunjukkan bahwa substrat dengan perlakuan delignifikasi dan detoksifikasi memberikasin hasil yang paling tinggi. Berikut ini adalah kurva % konversi xilitol pada substrat merang dan batang.



Gambar 4.15 Kurva % konversi xilitol substrat pada kondisi optimum

Persen konversi dari kurva di atas paling tinggi adalah pada perlakuan delignifikasi-detoksifikasi adalah sebesar 17,10% pada merang dan 7,49 % pada batang. Pernyataan diatas sesuai dengan hipotesis bahwa delignifikasi dan detoksifikasi dapat menghilangkan senyawa-senyawa beracun pada substrat baik sebelum maupun sesudah hidrolisis sehingga kemampuan khamir dalam mengkonversi xilitol paling optimum dibanding perlakuan yang lain.

Dari hasil fermentasi dapat disimpulkan bahwa perlakuan delignifikasi-detoksifikasi menghasilkan persen konversi xilosa menjadi xilitol yang paling tinggi. Akan tetapi, karena delignifikasi banyak menghilangkan xilosa pada prosesnya maka xilitol yang dihasilkan lebih kecil dibanding perlakuan detoksifikasi saja. Hal inilah yang menyebabkan perlakuan detoksifikasi menghasilkan xilitol paling tinggi diantara perlakuan yang lain.

4.10 Hasil Samping Fermentasi Substrat Jerami

Semakin lama waktu fermentasi, xilosa sebagai sumber karbon akan semakin habis. Xilitol yang telah dihasilkan dapat dikonversi menjadi xilulosa jika xilosa mulai menipis. NADH dari pemecahan glukosa kemudian digunakan akan digunakan untuk menghasilkan etanol. Pembentukan etanol dibantu oleh enzim etanol dehidrogenase.³⁶ Untuk membuktikan telah terbentuknya produk etanol pada proses fermentasi xilosa menjadi xilitol, dilakukan pengecekan terhadap kadar etanol dalam substrat dengan menggunakan GC (Gas Chromathography).

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

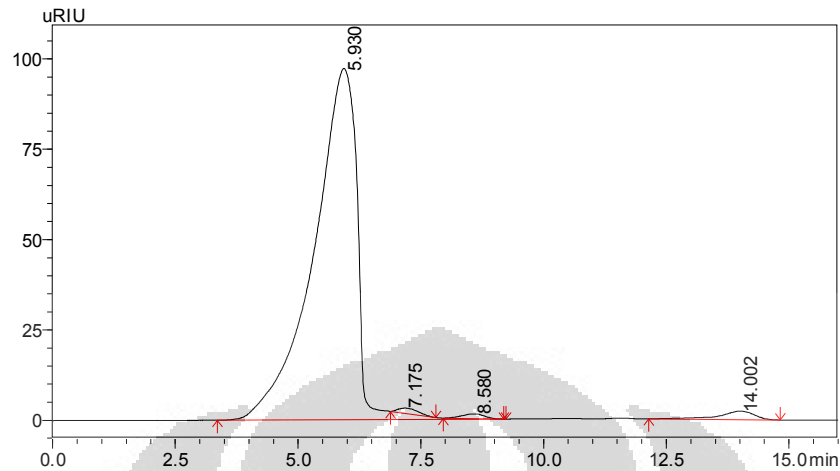
Tabel 4.1 Data kadar etanol dalam substrat batang awal

Waktu	% etanol
0	0
12	0
24	0
36	1,27
48	1,41
60	11,95

Pada jam ke-0 sampai jam ke-24, kemungkinan NADH masih digunakan untuk mengubah xilosa menjadi xilitol, sehingga etanol belum dihasilkan. Etanol mulai dihasilkan pada jam ke-36 disaat persediaan xilosa tinggal sedikit, sehingga NADH yang tidak digunakan untuk mengubah xilosa menjadi xilitol akan digunakan enzim *alcohol dehidrogenase* untuk membentuk etanol. Etanol mulai meningkat tajam setelah jam ke-48 hingga jam ke 60. Hal ini disebabkan xilosa sudah habis sehingga hampir seluruh NADH digunakan untuk membentuk etanol.

4.11 Kelompok Kontrol

Selain melakukan fermentasi terhadap hidrolisat, dalam penelitian ini juga dilakukan proses fermentasi menggunakan xilosa murni sebagai kelompok kontrol. Hal ini dilakukan untuk menguji kemampuan khamir dalam mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Kontrol ini diukur per 12 untuk melihat kemampuan khamir dalam kemampuan khamir memproduksi xilitol. Untuk kontrol xilosa murni ini, konsentrasinya dibuat mendekati konsentrasi xilosa yang terkandung dalam sampel agar dapat dibuat perbandingannya.



Gambar 4.16 Kromatogram hasil fermentasi menggunakan xilosa murni

Berikut ini adalah data perhitungan kadar xilosa menjadi xilitol per 12 jam dan % konversi xilosa menjadi xilitol.

Tabel 4.2 Hasil fermentasi xilitol dari xilosa murni

Kontrol xilosa			
Waktu	Xilosa Sisa	Xilitol	% Konversi
0	3000	0	0
12	1740	38,56	1,29
24	1130	547,68	18,26
36	56,2	654,36	21,81
48	-----	253,47	8,45
60	-----	133,89	4,46
72	-----	71,25	2,38

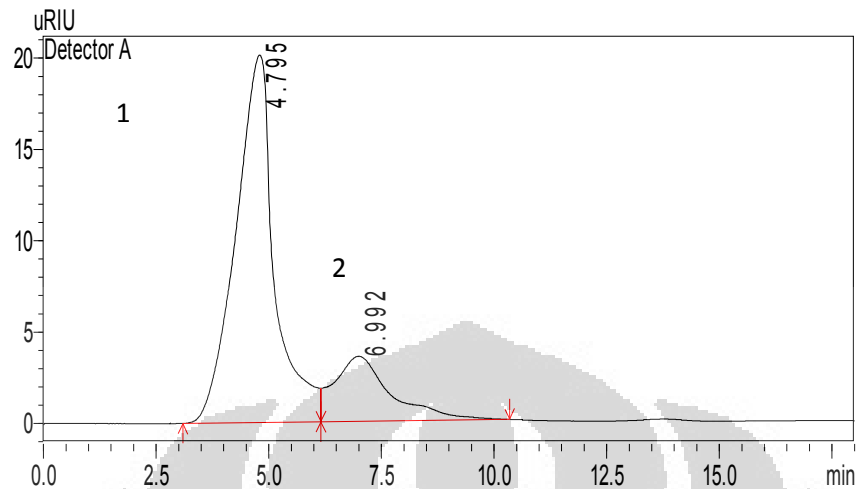
Dari data yang diperoleh, dapat diketahui bahwa produk xilitol mulai terbentuk pada jam ke-12. Adanya aktivitas enzim untuk metabolisme

menyebabkan mulai terbentuknya xilitol sebagai hasil metabolisme xilosa. Produk xilitol bertambah pada jam ke-24, dan mencapai konsentrasi tertinggi pada jam ke-36, dengan % konversi sebesar 21,81%. Hal ini disebabkan karena konsumsi xilosa sebagian besar ditujukan untuk produksi xilitol dan hanya sedikit yang digunakan untuk pertumbuhan. Setelah jam ke-36, terjadi penurunan konsentrasi xilitol mulai jam ke-48.

Xilitol akan diubah menjadi xilulosa oleh enzim *xilitol dehidrogenase*, yang kemudian difosforilasi oleh enzim xilulokinase dan masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP). Penurunan konsentrasi xilitol disebabkan karena sumber karbon yang berupa xilosa telah habis, sehingga xilitol dipakai sebagai sumber karbon oleh khamir.

Berdasarkan data diatas dapat kita simpulkan bahwa fermentasi dengan xilosa murni menghasilkan kurva produksi yang hampir sama dengan fermentasi pada substrat jerami dimana waktu optimum terbentuknya xilitol adalah pada jam ke-36 dan setelah itu mengalami penurunan.

Selain fermentasi dengan xilosa murni, pada penelitian ini dibuat juga kelompok kontrol menggunakan hidrolisat tanpa menggunakan khamir dan selanjutnya diberi perlakuan yang sama dengan kelompok sampel fermentasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya kontaminasi dari mikroba lain.



Gambar 4.17 Kromatogram hidrolisat tanpa penambahan khamir
1. oligosakarida, 2. Xilosa

Dari kromatogram terlihat bahwa tidak ada perbedaan antara hidrolisat awal (gambar 4.5) dengan hidrolisat tanpa penambahan khamir yang telah diberi perlakuan sama dengan sampel, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada kontaminasi dari mikroorganisme lain.

4.11 Perhitungan Jumlah Sel Khamir dengan Metode TPC

Pada fermentasi, jumlah sel khamir yang digunakan dapat mempengaruhi hasil biokonversi xilosa menjadi xilitol. Umumnya semakin banyak jumlah sel khamir, maka hasil fermentasi yang terbentuk juga semakin banyak. Namun, jumlah sel khamir yang terlibat fermentasi juga memiliki batas optimum, artinya bila jumlah sel khamir yang terlibat terlalu banyak, maka hasil fermentasi yang didapatkan juga tidak akan optimum,

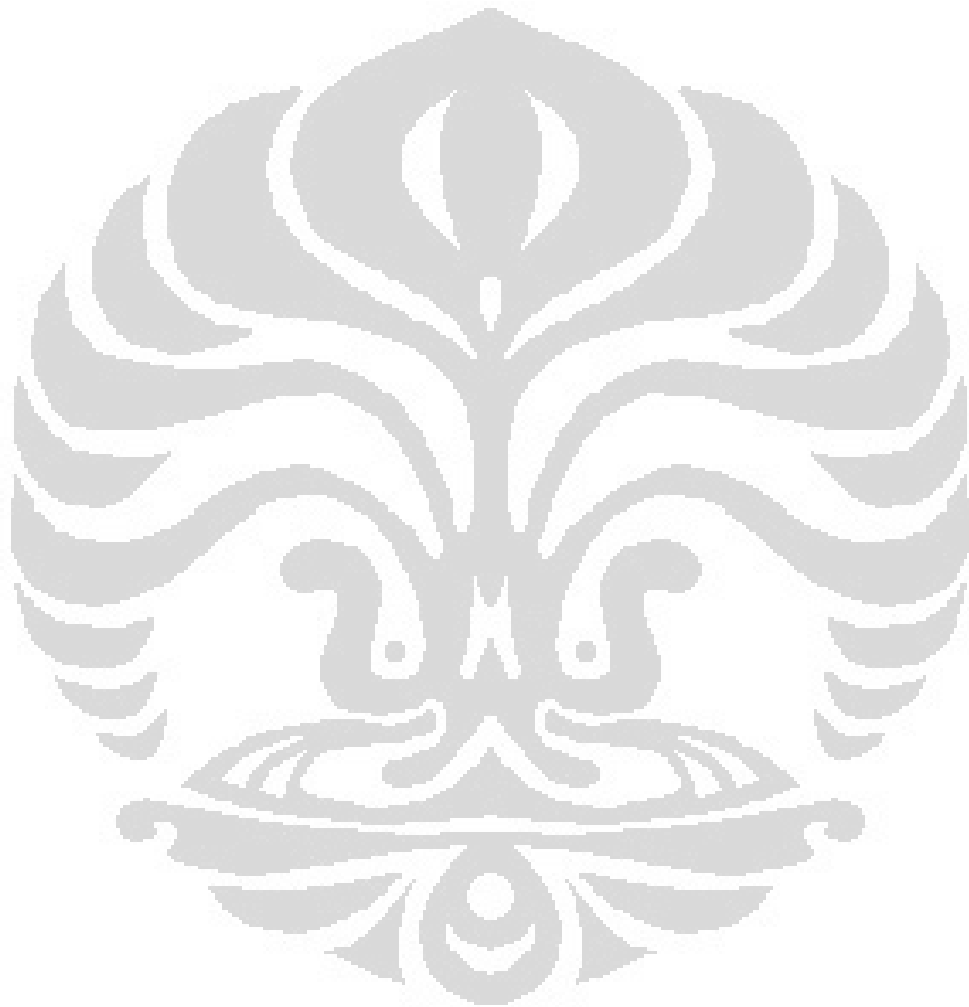
karena sel khamir ini akan berkompetisi dengan sesamanya untuk mendapatkan nutrisi untuk hidup.

Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk menghitung jumlah sel dalam suspensi adalah metode TPC (*Total Plate Count*).



Gambar 4.18 Hasil TPC *Candida fukuyamaensis*

Dengan metode TPC perhitungan hanya dapat dilakukan jika koloni berada dalam rentang 30-300 cfu. Apabila jumlah koloni melebihi rentang tersebut maka data yang dihasilkan tidak lagi representatif. Kekurangan dari metode TPC adalah tidak dapat digunakan untuk menghitung inokulasi, tetapi metode ini dapat menghitung organisme yang hidup. Pada perhitungan diperoleh jumlah sel (pada pengenceran 10^5 kali) untuk *Candida fukuyamaensis* adalah sebanyak 258 (setelah dirata-ratakan dari 275 dan 241). Sehingga jumlah sel yang terdapat dalam 1 mL suspensi khamir adalah $2,58 \times 10^7$ sel khamir.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kondisi optimum hidrolisis jerami padi menggunakan H_2SO_4 0,3 M, suhu 121°C yang didapatkan pada penelitian ini adalah hidrolisis selama 45 menit dengan jenis substrat merang awal, yaitu sebesar 4918,7 mg/L xilosa (14,76% yield).

Produk xilitol optimum hasil fermentasi didapatkan pada waktu fermentasi 36 jam setelah itu produksi xilitol mengalami penurunan. Pada fermentasi menggunakan *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247, perlakuan substrat dengan detoksifikasi menghasilkan kadar xilitol yang paling tinggi dibandingkan xilitol dari perlakuan substrat yang lain. Kadar xilitol optimum yang didapatkan adalah sebesar 226,7 mg/L untuk substrat batang dan 545,6 mg/L untuk substrat merang. Namun, persen konversi mol paling tinggi dihasilkan oleh substrat dengan perlakuan delignifikasi dan detoksifikasi, yaitu sebesar 17,104 % pada merang dan 7,49 % pada batang, sedangkan persen konversi terhadap substrat awal (*raw material*) menghasilkan xilitol optimum dengan perlakuan detoksifikasi yaitu sebesar 1,6% pada merang dan 0,7% pada batang .

Proses fermentasi hidrolisat ternyata menghasilkan produk samping berupa etanol. Seiring dengan lamanya waktu fermentasi, etanol yang dihasilkan semakin banyak. Etanol optimum pada jam ke-60 adalah sebesar 11,95%.

5.2 Saran

1. Perbedaan hasil perlakuan terhadap substrat ini tidak terlalu jauh sehingga untuk perlakuan delignifikasi dan detoksifikasi ini perlu untuk dioptimasi terlebih dahulu.
2. Untuk mendapatkan xilosa yang lebih banyak perlu dicari bahan baku alternatif lain yang lebih efektif dan efisien.
3. Untuk mengoptimalkan xilitol yang terbentuk, perlu dilakukan penambahan glukosa pada hidrolisat sebelum fermentasi untuk dijadikan sebagai sumber karbon.

DAFTAR PUSTAKA

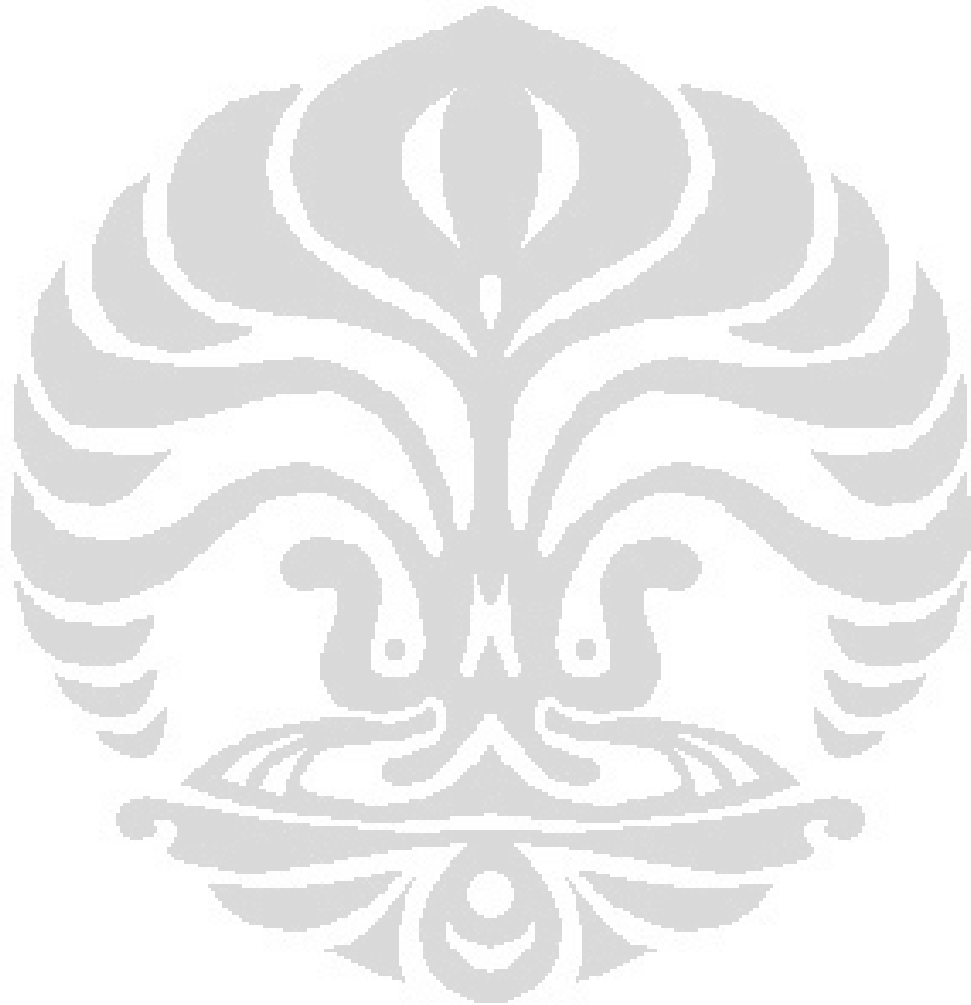
1. Sjostrom, E. 1995. Kimia Kayu, Dasar – Dasar dan Penggunaan, terjemahan dari *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, oleh Sastrohamidjoyo, H. Gajah Mada University Press, Yogyakarta: vii +390 halaman.
2. Roberto, I. C., I. M. Mancilha, C.A. de Souza, M.G.A. Felipe, S. Sato, H. F. de Castro. 1994. "Evaluation of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysisate in Production of xylitol by *Candida guilliermondii*". University of Sao Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences. Brazil
3. Richana, N. 2005. Mencari Alternatif Bahan Baku Gula. <http://www.republika.co.id>, Agustus 2005, pk 9:00.
4. 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.
5. Peldyak, J. 1996. Xylitol Sweeten Your Smile : 49 hlm. www.new-project/booksoft.com, 14 November 2005, pk 13.00.
6. UK Wholesalers on line. 2003. Xylitol Sugar Substitute. <http://www.ukwholesalers.com>, November 2005, pk. 19.00.
7. Saha, C. B. 2003. "Hemicellulose Biocoverion." *J Ind, Microbial Biotech*, (30): 279-291.
8. Eka Putri, Niezha. 2008. "Produksi Xilitol dari Hidrolisat Tongkol Jagung oleh Khamir Penghasil Enzim". FMIPA Universitas Indonesia, Depok.

9. "Membangun Kemandirian Agrobisnis".<http://www.sinartani.com>. 17 Mei 2009 19.30
10. Sinar Tani."Amoniasi Jerami Padi sebagai Pakan Ternak"
<http://www.sinartani.com> 14 Januari 2009, pukul 14.16.
11. "hemiselulosa" <http://en.wikipedia.org/wiki/hemiselulosa> 7 Januari 2009, pukul 14.39
12. Goodwin, T.N., E.I. Mercer. 1993." Introduction to Plant Biochemistry".Pergamon Press, New York: 62-70
13. "Safety data for d-(+)-xylose. "
[http://www.psychem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-\(+\)-xylose.html](http://www.psychem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-(+)-xylose.html). 28 Januari 2008, pukul 14.50.
14. "xylitol". <http://en.wikipedia.org/wiki/Xylitol> 5 Januari 2009, pukul 10.51."xilitol,Pemanis Alami Pelindung Gigi".
15. <http://www.kompas.com-cetak/0202/03/iptek/xili22.htm> 7 Januari 2009, pukul 12.02.
16. 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.
17. 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.

18. Granstrom, T.B. 2002. *Biotechnological Production of Xylose with Candida yeast*. Technical Biochemistry Report.
19. "Yeast". [http:// en.wikipedia.org/wiki/yeast](http://en.wikipedia.org/wiki/yeast). 14 Januari 2009, pukul 13.43
20. Mussatto, Solange I., Roberto, Inês C. 2004. "Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production." *Biotechnol. Prog.* (20): 134-139.
21. Faisal,Ahmad.2008.Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim *Xylitol Dehydrogenase* (XDH) dari Hasil Hidrolisis Ampas Tebu. FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
22. Ingraham, J. L. & C.A. Ingraham. 2000. *Introduction of Microbiology 2nd Ed.* Brooks/Cole – Thomson learning. California. USA.
23. Pelczar, M. Chan, E, C, S. 1986. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
24. Fitrianiingsih. 2005. *Inventariasi dan Identifikasi Khamir Dari Serasah di Taman Nasional Gunung Halimun*. Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
25. Bruinberg, P. M., Peter H.M., Johannes P. & Alexander S. 1984. NADH – linked Aldose Reductase: The Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.*19: 256-260.
26. Karhuman, Kaisa, Romain F. & Marie F. 2007. High Activity of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Improves Xylose Fermentation

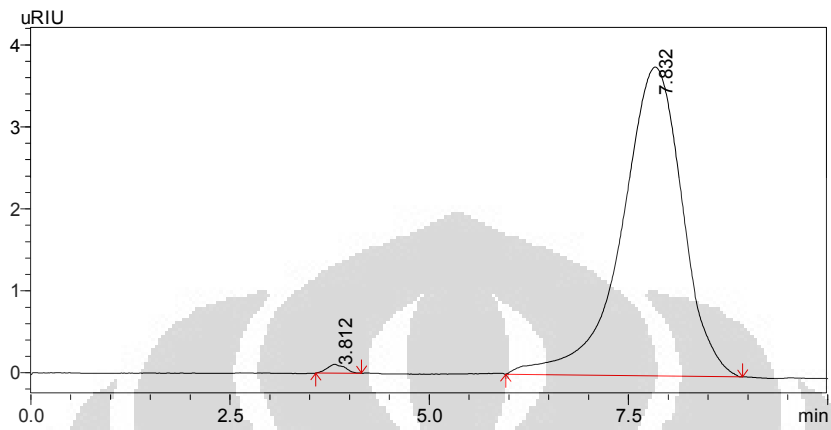
- by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 1039 – 1046 .
27. www.Food-info.net/uk/color/Maillard.htm 5 Juni 2008 pkl 10.00
28. Bruinberg, P. M., Peter H.M., Johannes P. & Alexander S. 1984. NADH – linked Aldose Reductase: The Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 19: 256-260.
29. Giron, F, Amalia P. & Amarai M.T. 1989. Enzymatic and Physiological Study of D – Xylose Metabolism by *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32: 199 – 204.
30. Ko, B.S., Kim J. & Kim J.H. 2006. Production of Xylitol from D – xylose by a Xylitol Dehydrogenase Gene – Disrupted Mutant of *Candida tropicalis*. *Appl and Environment Microbiol.* 72: 4207 – 4213.
31. Solange I. Musatto dkk. 2004. *Optimal experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. Department of Biotechnology. Brazil.*
32. Neureiter, M.H., H. Danner, C. Thomasser, dan R. Bran. *Dilute Acid Hydrolysis of Softwood Chips for the Production of Hemicellulose sugars.* 2 hal.
<http://bioproduct.bioenergy.gov/pdfs/bcotal/abstract/12/2386.pdf> 27 Januari 2002, pukul 08.47

33. Sun,R.C, J. Tomkinson, P.L. Ma, S.F. Liang. *Comparative Study Hemicellulose fromRice Straw by Alkali and Hydrogen Peroxide Treatments*. University of Wales, Bangor.1999
34. Canilha, L., Carvalho W. & Silva J.B. 2005. Influence of Medium Composition in Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *World J. Microbiol Biotechnol.* 21: 1087 – 1093.
35. Wahyuni, Ari Susilowati, Ratna Setyaningsih. Optimasi Produksi Xilitol dengan Variasi Konsentrasi Hidrolisat Hemiselulosa Bagase oleh *Candida Tropicalis*. Jurusan Biologi,UNS. Surakarta.2003
36. Gottschalk, Gerhard. *Bacterial Metabolism*. Springer Verlag, New York. 1979

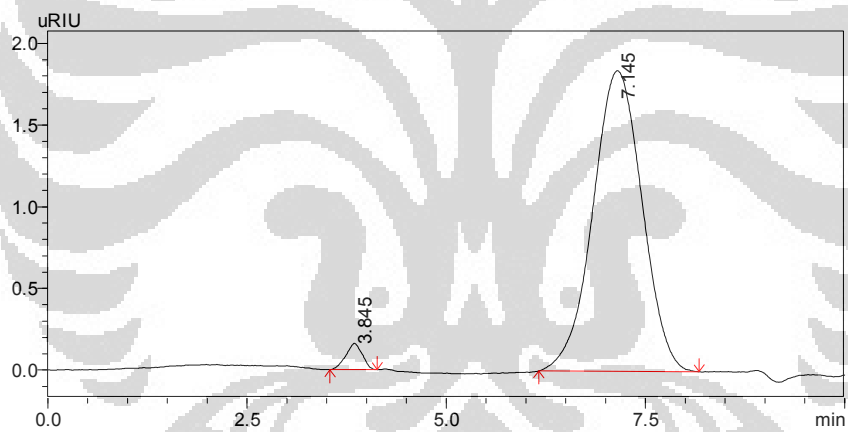


LAMPIRAN 1 : Kromatogram standar xilosa

1. 1000 ppm

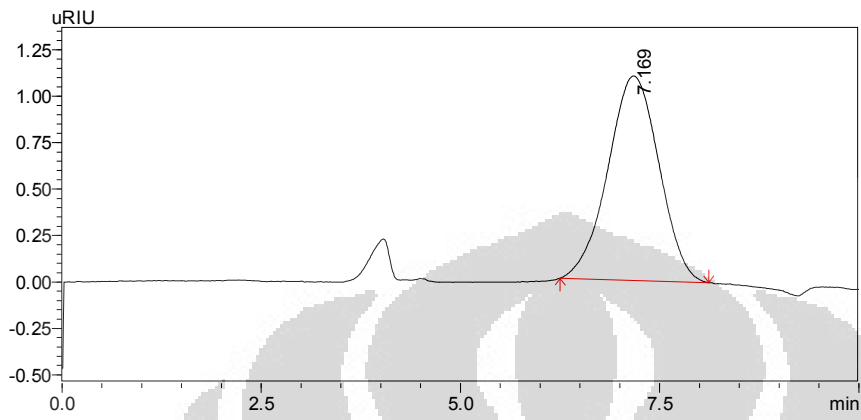


2. 500 ppm

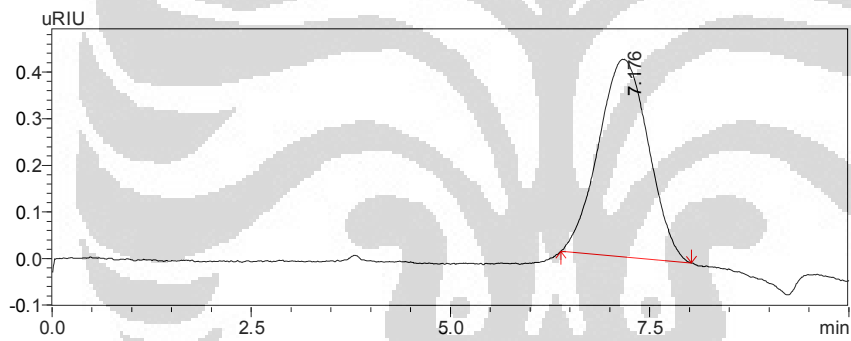


LAMPIRAN 1 : Lanjutan

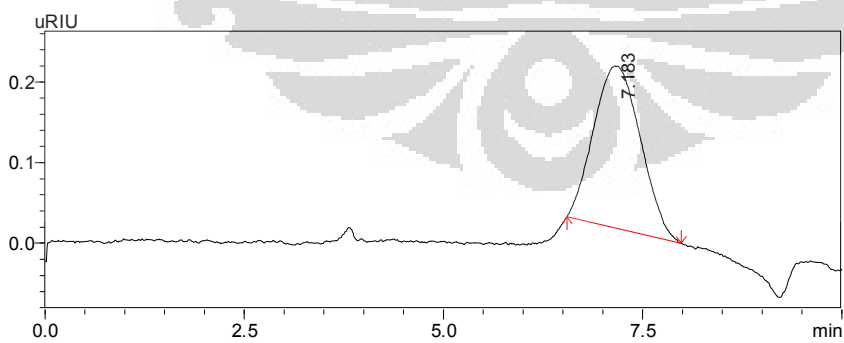
3. 250 ppm



4. 100 ppm



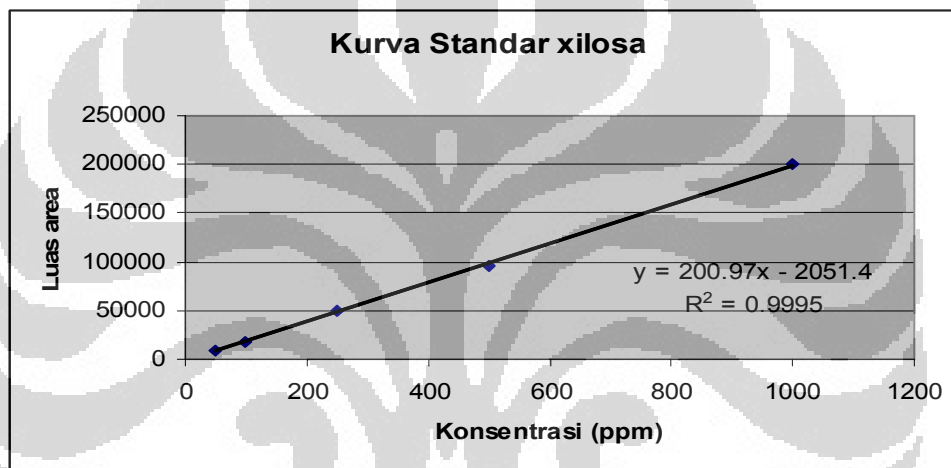
5. 50 ppm



LAMPIRAN 1 : Lanjutan

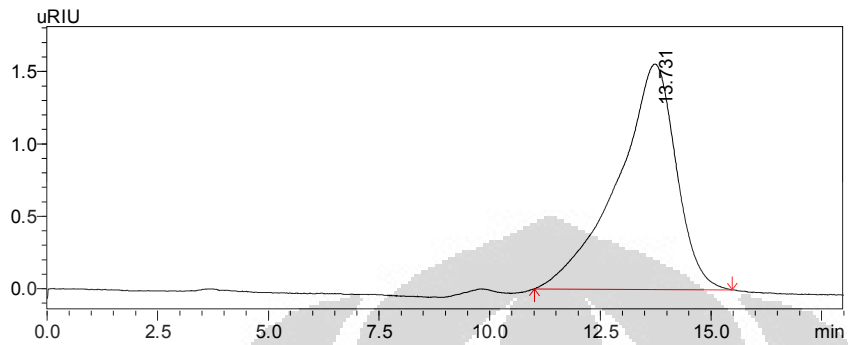
Grafik standar xilosa

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

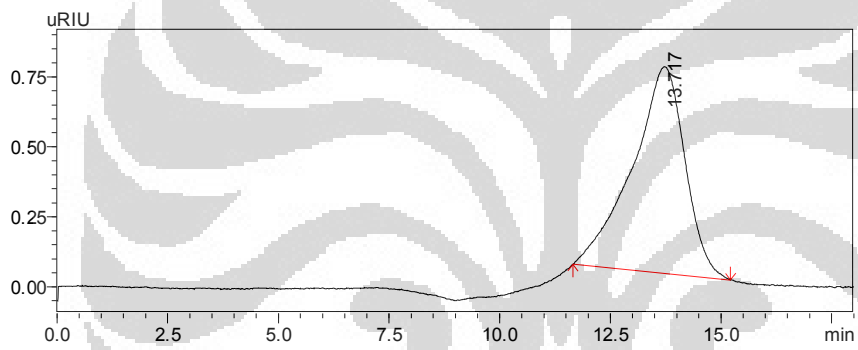


LAMPIRAN 2 : Kromatogram standar xilitol

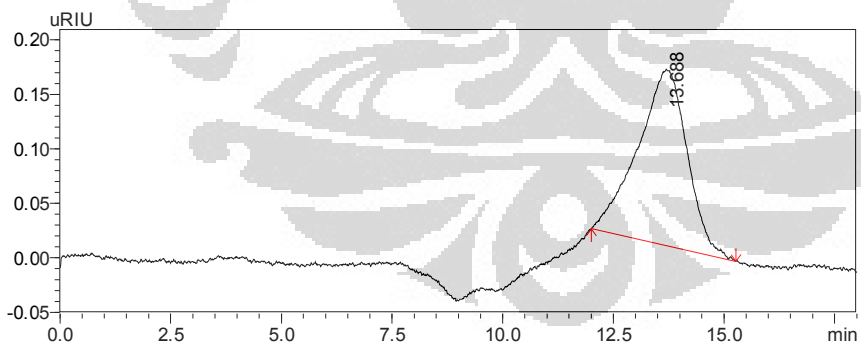
1. 1000 ppm



2. 500 ppm

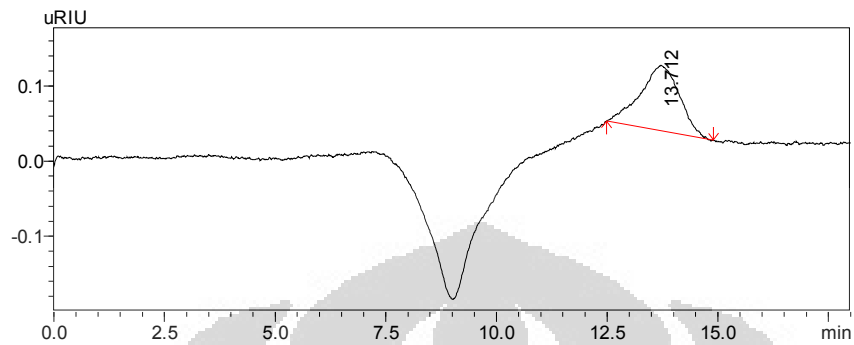


3. 100 ppm

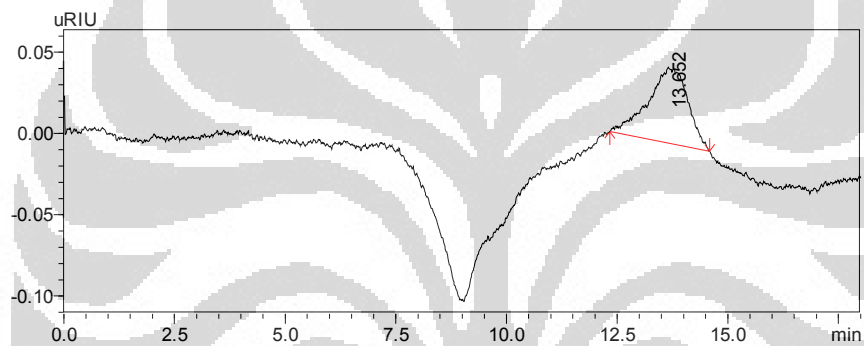


LAMPIRAN 2 : Lanjutan

4. 50 ppm



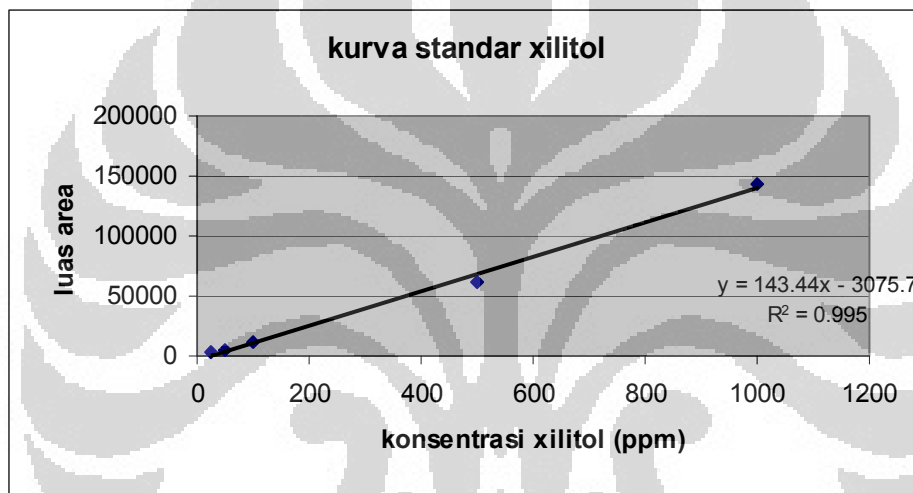
5. 25 ppm



LAMPIRAN 2 : Lanjutan

Grafik standar xilitol

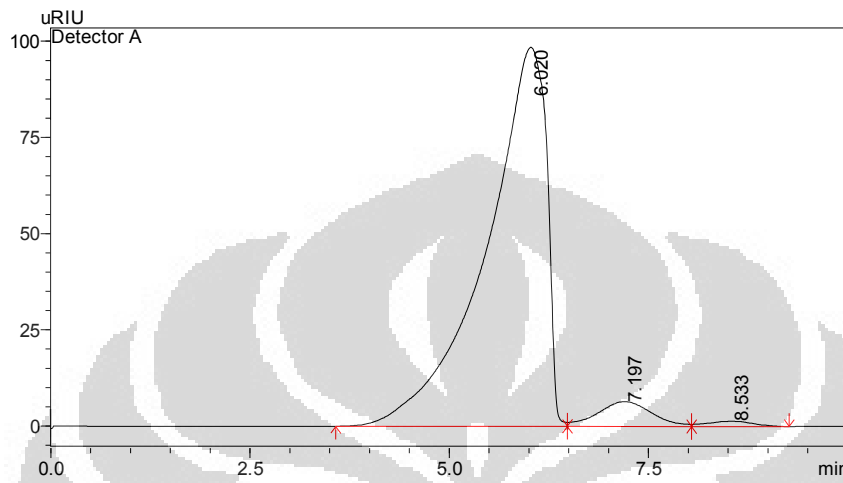
Konsentrasi (ppm)	Luas area
25	2509
50	4803
100	12471
500	61238
1000	143860



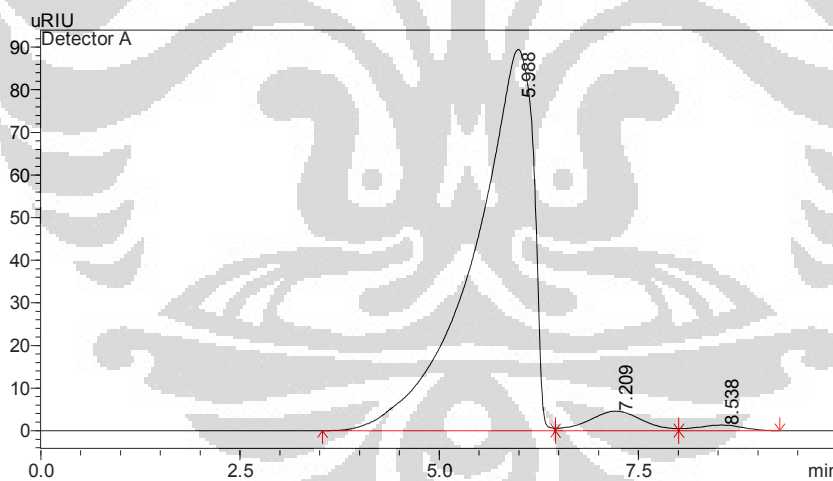
LAMPIRAN 3 : Kromatogram hidrolisat dengan variasi waktu.

1. Waktu hidrolisis 25 menit,

a. substrat merang



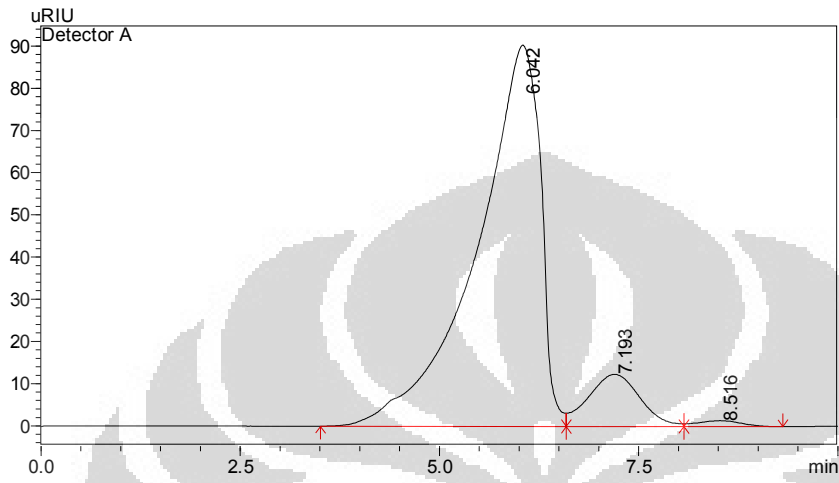
b. substrat batang



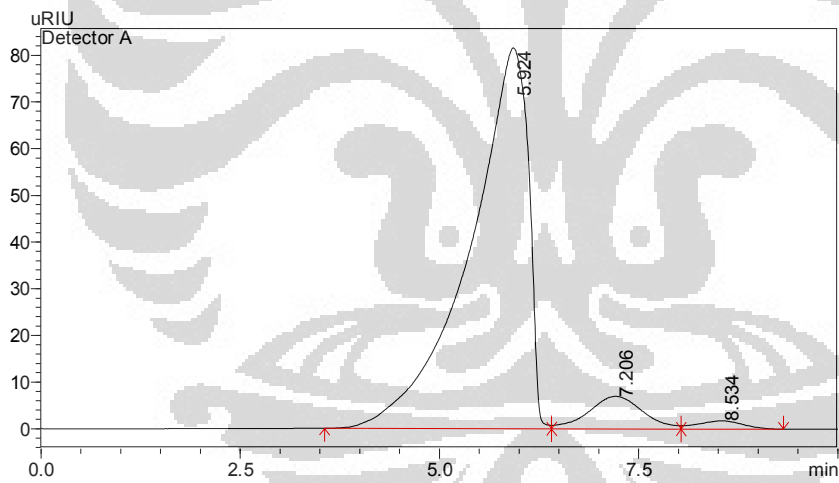
LAMPIRAN 3 : Lanjutan

2. waktu hidrolisis 30 menit

a. substrat merang



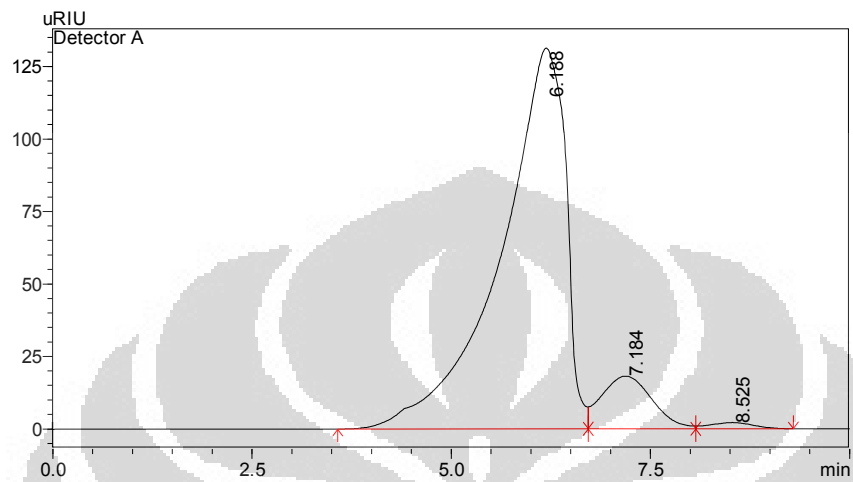
b. substrat batang



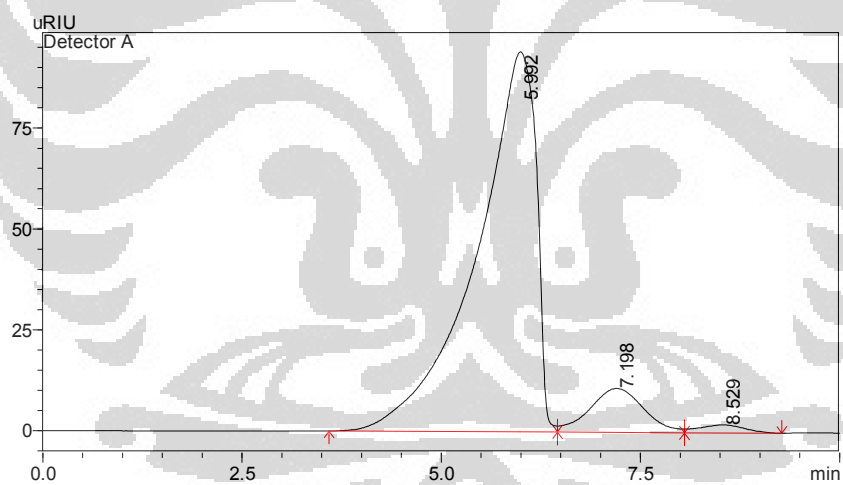
LAMPIRAN 3 : Lanjutan

3. waktu hidrolisis 45 menit

a. substrat merang



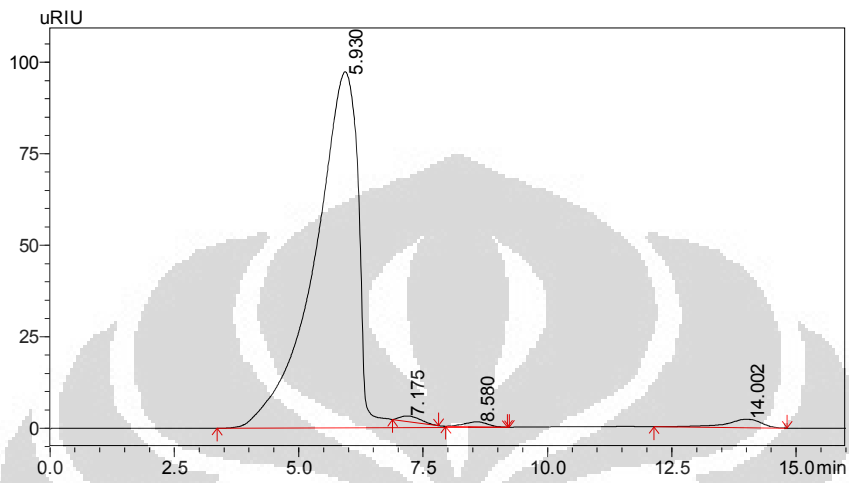
b. substrat batang



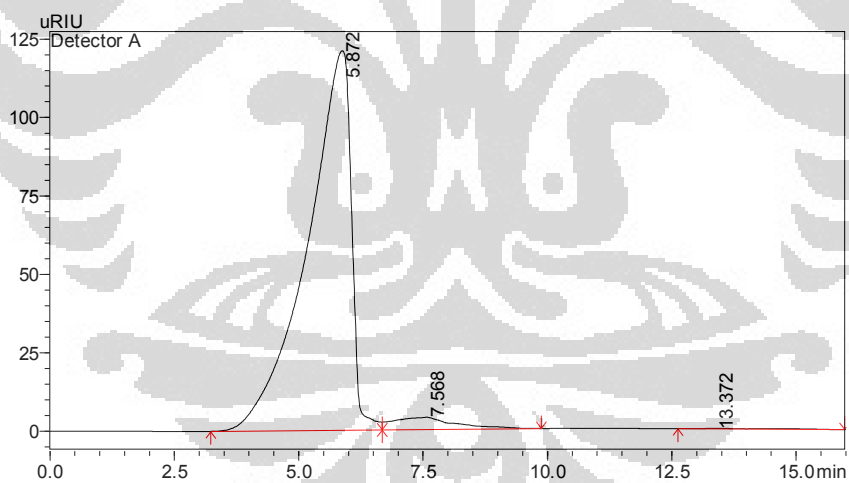
LAMPIRAN 4 : Kromatogram hasil fermentasi

1. hasil fermentasi substrat awal

a. merang



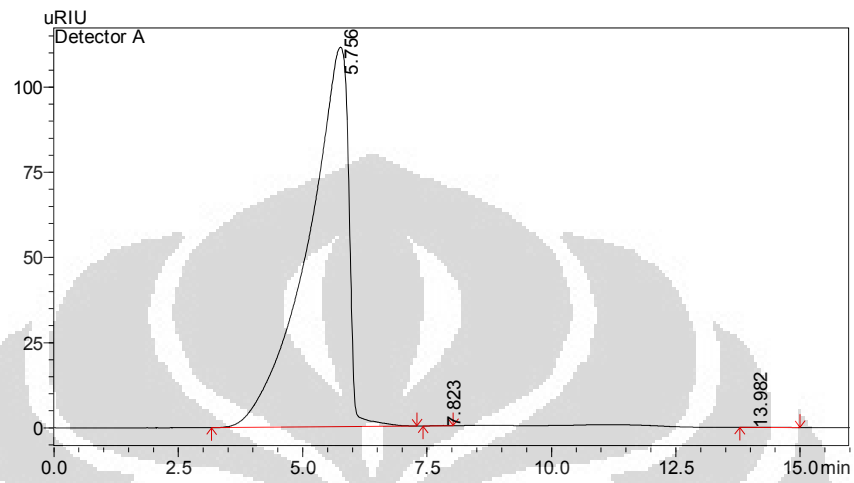
b. batang



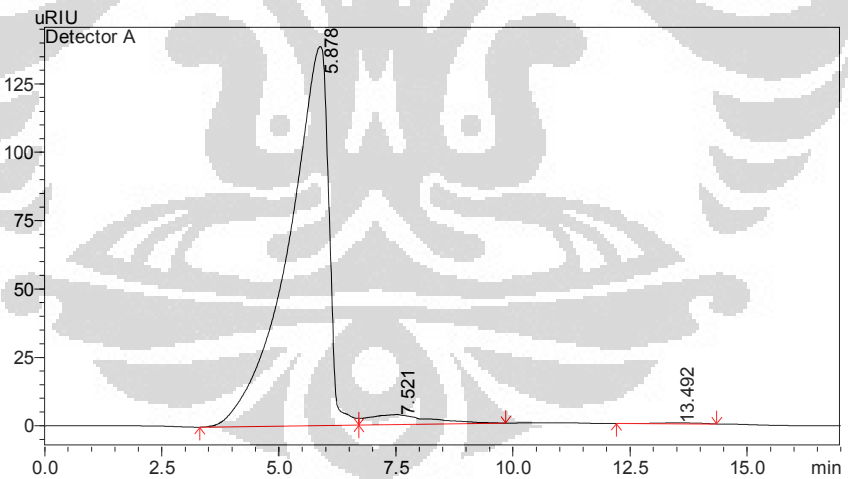
LAMPIRAN 4 : Lanjutan

2. hasil fermentasi substrat detoksifikasi

a. merang



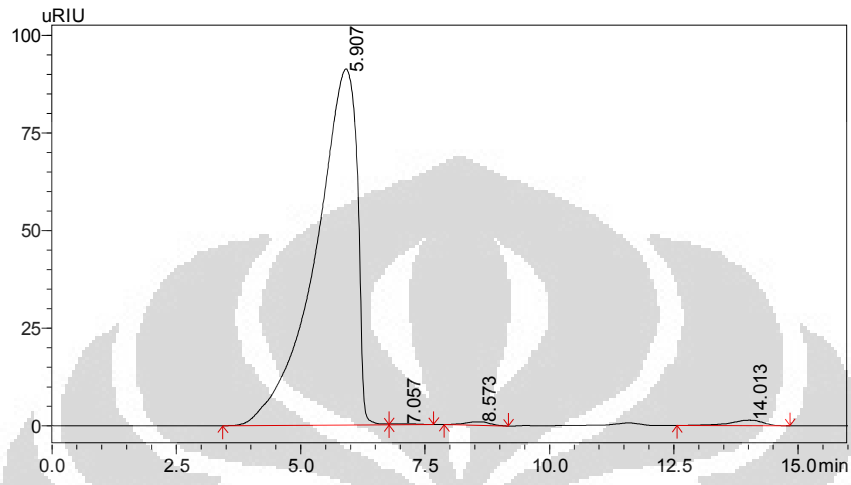
b. batang



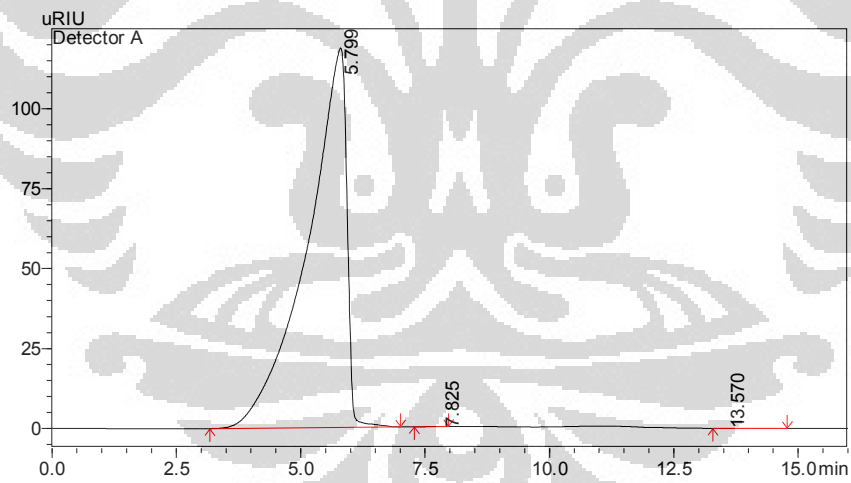
LAMPIRAN 4 : Lanjutan

3. hasil fermentasi substrat delignifikasi

a. merang



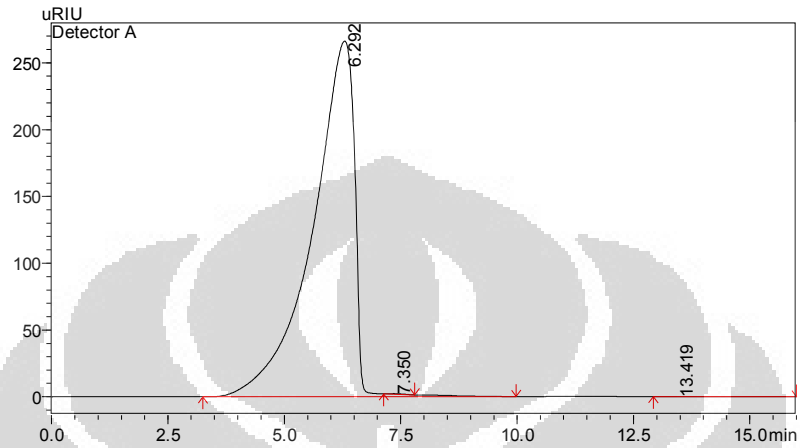
b. batang



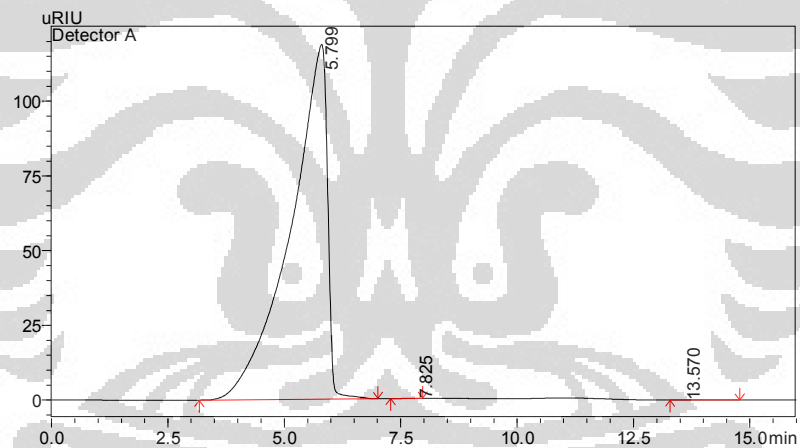
LAMPIRAN 4 : Lanjutan

4. hasil fermentasi substrat treatment delignifikasi dan detoksifikasi

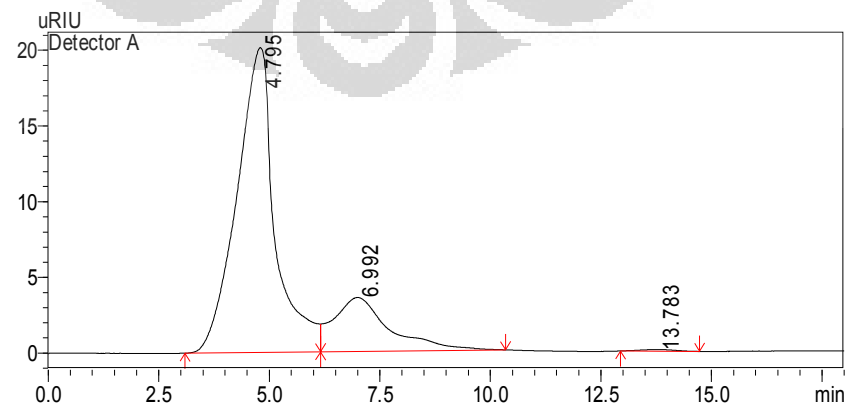
a. merang



b. batang

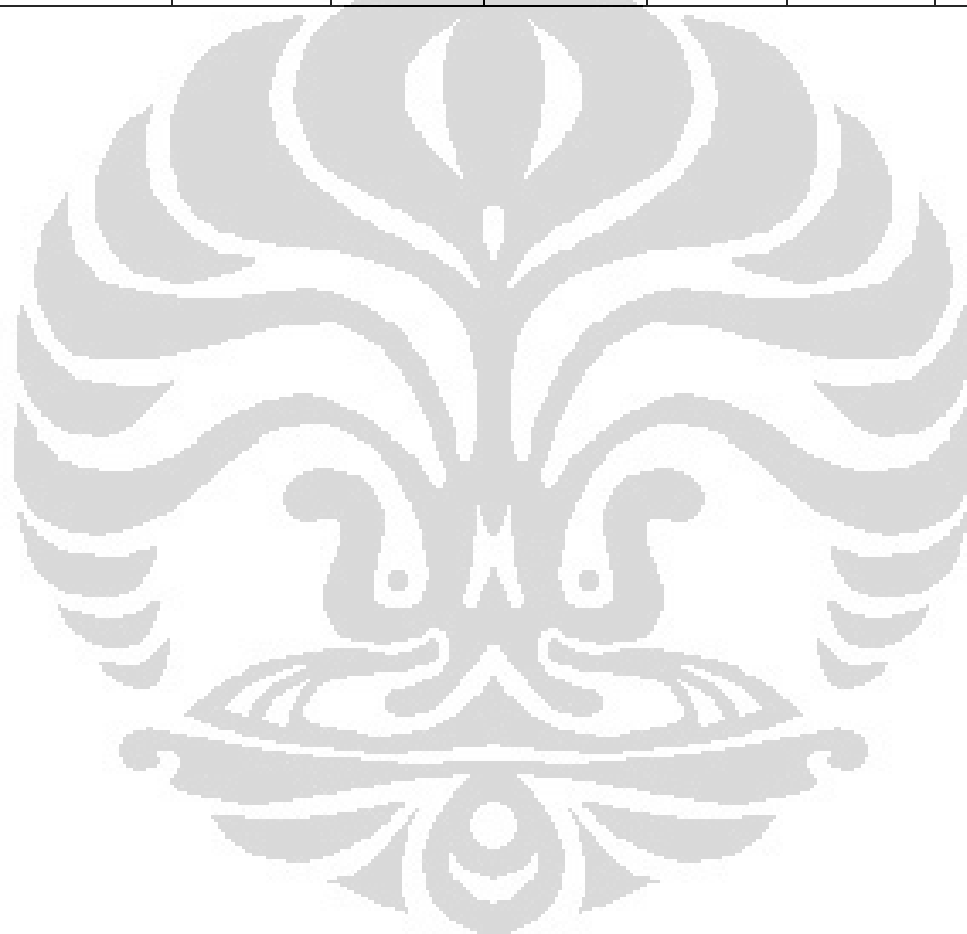


5. hasil fermentasi dari xilosa murni (kontrol)



LAMPIRAN 5 : Tabel hasil pengukuran HPLC untuk substrat dengan variasi waktu hidrolisis

SUBSTRAT	25 menit		30 menit		45 menit	
	Luas peak	Ppm	Luas peak	ppm	luas peak	ppm
batang awal	833	20.9	393099	2425.99	533411	3286.27
batang delinifikasi	801	20.7	211431	1312.15	302340	1869.53
merang awal	2591	31.7	554161	3413.49	799656	4918.68
merang delignifikasi	1908	27.5	328222	2028.22	510935	3148.47



LAMPIRAN 6 : Tabel perhitungan kadar xilosa dan xilitol hasil fermentasi

1. hasil fermentasi pada substrat merang

Merang awal

Waktu	Xilosa (mg/L)	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	3869.75	0.1160925	0.000763766	0	0	0	0	0
12	2878.89	0.0863667	0.000568202	45.98	0.0013794	9.075E-06	1.187827225	0.13794
24	1538.35	0.0461505	0.000303622	301.32	0.0090396	5.947E-05	7.784169193	0.90396
36	864.33	0.0259299	0.000170591	398.54	0.0119562	7.866E-05	10.29570818	1.19562
48	704.46	0.0211338	0.000139038	34.12	0.0010236	6.734E-06	0.881441168	0.10236
60	0	0	0	10.08	0.0003024	1.989E-06	0.260402315	0.03024

Merang detoksifikasi

Waktu	Xilosa(mg/L)	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	3861.11	0.1158333	0.000762061	0	0	0	0	0
12	2356.52	0.0706956	0.000465103	39.09	0.0011727	7.715E-06	1.012484459	0.11727
24	1081.87	0.0324561	0.000213527	414.76	0.0124428	8.186E-05	10.74285122	1.24428
36	765.89	0.0229767	0.000151163	545.55	0.0163665	0.0001077	14.13049109	1.63665
48	606.04	0.0181812	0.000119613	28.79	0.0008637	5.682E-06	0.745700373	0.08637
60	0	0	0	13.68	0.0004104	0.0000027	0.354330709	0.04104

LAMPIRAN 6: LANJUTAN

Merang delignifikasi

Waktu	Xilosa Sisa	berat xilosa	mol xilosa	Xilitol	berat xilitol	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	1629.84	0.0488952	0.000321679	0	0	0	0	0
12	1038.25	0.0311475	0.000204918	0	0	0	0	0
24	850.07	0.0255021	0.000167777	84.98	0.0025494	1.677E-05	5.208810069	0.25494
36	721.23	0.0216369	0.000142348	198.76	0.0059628	3.923E-05	12.18290291	0.59628
48	567.65	0.0170295	0.000112036	23.95	0.0007185	4.727E-06	1.46800425	0.07185
60	0	0	0	6.23	0.0001869	1.23E-06	0.381864989	0.01869

Merang delignifikasi-detoksifikasi

Waktu	Xilosa Sisa	berat xilosa	mol xilosa	Xilitol	berat xilitol	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	1681.91	0.0504573	0.000331956	0	0	0	0	0
12	1123.45	0.0337035	0.000221734	0	0	0	0	0
24	849.34	0.0254802	0.000167633	201.11	0.0060333	3.969E-05	11.95565155	0.60333
36	703.65	0.0211095	0.000138878	287.67	0.0086301	5.678E-05	17.1014981	0.86301
48	617.89	0.0185367	0.000121952	21.98	0.0006594	4.338E-06	1.306674065	0.06594
60	0	0	0	8.99	0.0002697	1.774E-06	0.534440393	0.02697

LAMPIRAN 6 : Lanjutan

2. hasil fermentasi pada substrat batang

Batang awal

Waktu	Xilosa Sisa	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	3604.42	0.1081326	0.0007209	0	0	0	0	0
12	2776.32	0.0832896	0.0005553	27.512	0.00082536	5.43E-06	0.753120666	0.082536
24	2124.64	0.0637392	0.0004249	167.59	0.0050277	3.308E-05	4.587652383	0.50277
36	108.596	0.00325788	2.172E-05	178.66	0.0053598	3.526E-05	4.890685451	0.53598
48	23.6787	0.000710361	4.736E-06	15.424	0.00046272	3.044E-06	0.4222206	0.046272
60	0	0	0	0	0	0	0	0

Batang detoksifikasi

Waktu	Xilosa (mg/L)	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	3231.47	0.0969441	0.0006463	0	0	0	0	0
12	2979.03	0.0893709	0.0005958	33.08	0.0009924	6.529E-06	1.010672967	0.09924
24	2922.03	0.0876609	0.0005844	157.75	0.0047325	3.113E-05	4.819639074	0.47325
36	895.383	0.02686149	0.0001791	226.74	0.0068022	4.475E-05	6.927448265	0.68022
48	84.6045	0.002538135	1.692E-05	17.973	0.00053919	3.547E-06	0.549118054	0.053919
60	0	0	0	0	0	0	0	0

LAMPIRAN 6 : Lanjutan

Batang delignifikasi

Waktu	Xilosa (mg/L)	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	1120.2	0.033606	0.000224	0	0	0	0	0
12	632.47	0.0189741	0.0001265	41.986	0.00125958	8.287E-06	3.699424342	0.125958
24	66.934	0.00200802	1.339E-05	58.198	0.00174594	1.149E-05	5.127878289	0.174594
36	29.816	0.00089448	5.963E-06	59.134	0.00177402	1.167E-05	5.210350094	0.177402
48	0	0	0	12.994	0.00038982	2.565E-06	1.144913064	0.038982
60	0	0	0	0	0	0	0	0

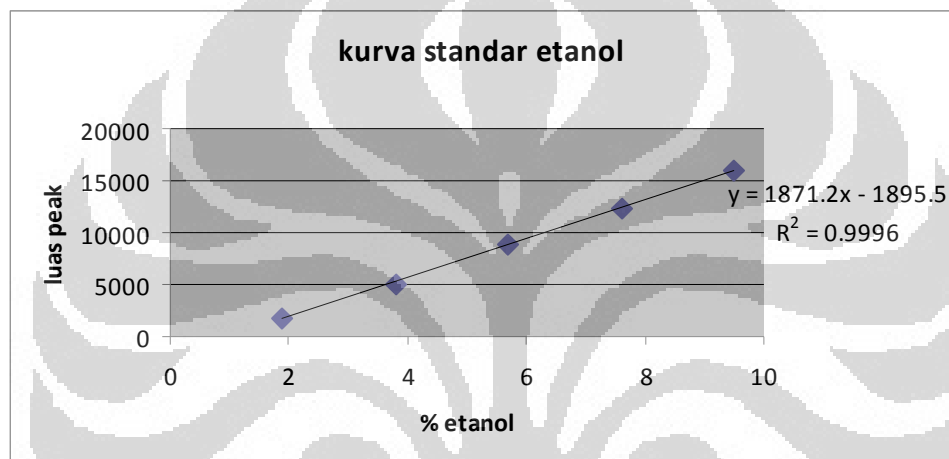
Batang delignifikasi-detoksifikasi

Waktu	Xilosa (mg/L)	berat xilosa (g)	mol xilosa	Xilitol (mg/L)	berat xilitol (g)	mol xilitol	% konversi mol	% konversi xilitol dari substrat awal
0	1320.2	0.039606	0.000264	0	0	0	0	0
12	873.44	0.0262032	0.0001747	25.449	0.00076347	5.023E-06	1.902586722	0.076347
24	98.933	0.00296799	1.979E-05	63.104	0.00189312	1.245E-05	4.717703349	0.189312
36	69.344	0.00208032	1.387E-05	98.88	0.0029664	1.952E-05	7.392344498	0.29664
48	0	0	0	23.298	0.00069894	4.598E-06	1.741776316	0.069894
60	0	0	0	0	0	0	0	0

LAMPIRAN 7: Hasil Samping Etanol

Grafik Standar etanol

% etanol	luas area
1.9	1740
3.8	5064
5.7	8871
7.6	12257
9.5	15920



Hasil % etanol dari substrat batang

waktu (jam)	luas area	% etanol
0	0	0
12	0	0
24	0	0
36	474	1.266168
48	736	1.4062
60	20460	11.94816

LAMPIRAN 8 : Cara Perhitungan

Contoh cara perhitungan:

1. Xilosa

Persamaan regresi linier dari grafik std xilosa $y = 152,95x + 1372,4$; y = luas area dan x = konsentrasi xilosa (ppm)

Misal pada sampel 0,3 M => Luas area (y) = 701723, maka konsentrasi xilosa (x) = $(701723-1372,4)/152,95 = 4578,95$ ppm

Karena terjadi pengenceran 2,5 x, maka dalam larutan terdapat:

$4578,95 \text{ ppm} \times 2,5 = 11447,37 \text{ ppm} = 0,0114 \text{ g/mL} = 11,45 \text{ g/L}$

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

$0,0114 \text{ g/mL} \times 30 \text{ mL} = 0,3434 \text{ g}$

Sehingga% yield xilosa dalam 1 g tongkol jagung = $(0,3434\text{g}/1 \text{ g}) \times 100 \% = 34,34\%$ (w/w).

2. Xilitol

Persamaan regresi linier dari grafik std xilitol $y = 134,75x - 5634,8$; y = luas area dan x = konsentrasi xilitol (ppm)

Misal pada sampel *C. fukuyamaensis* => Luas area (y) = 24862, maka konsentrasi xilitol (x) = $(24862+5634,8)/134,75 = 226,39$ ppm = $0,23 \text{ g/L} = 0,00023 \text{ g/mL}$

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

$0,00023 \text{ g/mL} \times 30 \text{ mL} = 0,00679 \text{ g}$

Sehingga % yield xilitol dari 1 g tongkol jagung = $(0,00679 / 1 \text{ g}) \times 100 \% = 0,67916 \%$ (w/w)

Konsentrasi awal xilosa dalam hidrolisat = 6,30 g/L

Persen konversi xilosa menjadi xilitol = $(0,23 \text{ g/L}/6,30 \text{ g/L}) \times 100 \% = 3,59 \%$.