



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI XILITOL OLEH KHAMIR PENGHASIL ENZIM
XYLOSE REDUCTASE, *CANDIDA FUKUYAMAENSIS* UICC
Y-247 DARI HIDROLISAT LIMBAH SORGUM (*Sorghum
bicolor. L*) ZH-30**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

**WURYANINGRUM
0806422012**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Wuryaningrum

NPM : 0806422012

Tanda Tangan :

Tanggal : 14 Juli 2010

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini telah disetujui oleh

Dr.Endang Saepudin

Pembimbing

Prof.Dr.Wahyudi Priyono Suwarso

Ketua Penguji

Dr.Asep Saefumillah,M.Si

Sekretaris Penguji

Dr.Budiawan

Anggota Penguji

Dr.Agustino Zulys

Anggota Penguji

Program Studi Magister Ilmu Kimia
Program Pascasarjana FMIPA-UI
Ketua

Dr.Endang Saepudin

NIP.195712251986021002

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Wuryaningrum
NPM : 0806422012
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul Tesis : Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim
Xylose Reductase, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-
247 dari Hidrolisat Limbah Sorgum (*Sorghum
bicolor. L*) ZH-30

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr.Endang Saepudin (.....)
Penguji : Prof.Dr.Wahyudi P.S (.....)
Penguji : Dr.Asep Saefumillah,M.Si (.....)
Penguji : Dr. Budiawan (.....)
Penguji : Dr.Agustino Zulys (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 14 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wata'ala, karena atas berkat, rahmat dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis yang berjudul “Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reductase, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 dari Hidrolisat Limbah Sorgum (*Sorghum bicolor.L*) ZH-30” tepat pada waktunya. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Ilmu Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- (1) Dr Endang Saepudin, selaku pembimbing, sekaligus sebagai Ketua Program Pasca Sarjana Program Studi Ilmu Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam pengerjaan dan penyelesaian tesis ini.
- (2) Dr.Ir.Antonius Heri Cahyana selaku Pembimbing Akademis penulis yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama masa perkuliahan.
- (3) Drs.H.Suharto,M.Si,M.Pd selaku Kepala SMA Negeri 30 Jakarta yang telah memberika izin dan kesempatan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan pendidikan S2.
- (4) Pemerintah Republik Indonesia melalui Dinas Pendidikan DKI Jakarta yang telah member izin serta biaya dalam mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Indonesia.
- (5) Dr.Ir.Supriyanto selaku Kepala *Service Laboratory* SEAMEO BIOTROP Tajur Bogor,yang telah menyediakan material tanaman Sorgum untuk dijadikan bahan penelitian penulis,serta segala penjelasan beliau mengenai tanaman tersebut.

- (6) Dr.Ridla Bakri selaku Ketua Departemen Ilmu Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- (7) Seluruh dosen dan staff karyawan Departemen Kimia FMIPA UI.
- (9) Pak Rasyid dan seluruh staf di Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI yang telah membimbing dan membantu penulis pada proses uji HPLC hasil penelitian.
- (9) Suami dan anak-anakku yang selalu memberi dorongan semangat dan do'a.
- (10) Ibu Emma yang telah bersedia membimbing penulis dalam pengenalan dan cara penanganan mikroorganisme.
- (11) Mbak Dilla "Biotek", yang telah dengan tulus mengajari penulis tentang teknik-teknik penulisan dengan microsoft office.
- (12) Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis ini, sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan.

Semoga Allah Subhanahu Wa Ta'ala memberikan balasan atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan penulis sangat berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya Ilmu Kimia

Depok, Juli 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wuryaningrum
NPM : 0806422012
Program Studi : S2
Departemen : Ilmu Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas tesis saya yang berjudul : Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reductase, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 dari Hidrolisat Limbah Sorgum (*Sorghum bicolor.L*) ZH-30, beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 14 Juli 2010
Yang menyatakan

(Wuryaningrum)

ABSTRAK

Nama : Wuryaningrum
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul : Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose
Reductase, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 dari Hidrolisat
Limbah Sorgum (*Sorghum bicolor.L*) ZH-30

Xilitol merupakan gula alkohol berkarbon lima, yang secara alami terdapat dalam buah-buahan dan sayuran, serta memiliki manfaat kesehatan diantaranya adalah antikariogenik dan memiliki indeks glikemik rendah. Xilitol dapat diproduksi dari xilosa, baik melalui proses kimiawi ataupun dengan fermentasi. Proses fermentasi dilakukan oleh khamir penghasil enzim xilosa reduktase, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247. Xilosa dihasilkan melalui proses hidrolisis hemiselulosa yang terkandung dalam limbah lignoselulosa seperti tanaman sorgum. Dalam penelitian ini dilakukan hidrolisis terhadap tangkai dan malai limbah sorgum untuk menghasilkan xilosa yang akan digunakan sebagai bahan baku pembuatan xilitol melalui proses fermentasi dengan penambahan D(-) arabinosa sebagai kosubstrat. Sebelum hidrolisis pada sampel dilakukan proses dewax dan delignifikasi untuk menghilangkan senyawa-senyawa ekstraktif dan memecahkan lignin yang dapat menghambat proses hidrolisis ataupun fermentasi. Hidrolisis dilakukan dengan asam sulfat 0,3 molar, suhu 121°C. Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan waktu optimum hidrolisis tangkai adalah 35 menit dan malai 45 menit, dengan masing-masing menghasilkan 4083,8 ppm atau 20,45% xilosa dari hidrolisat tangkai dan 4690,6 ppm atau 23,5% dari hidrolisat malai. Uji HPLC hasil fermentasi dalam penelitian ini, menunjukkan waktu optimum fermentasi adalah 12 jam. Konversi xilosa menjadi xilitol adalah 12,48%; 8,98% dan 2,66% masing-masing untuk hidrolisat malai, tangkai dan xilosa murni. Penambahan D(-) arabinosa sebagai kosubstrat menurunkan pembentukan xilitol.

Kata Kunci: sorgum ZH-30, xilosa, xilitol, hidrolisis, fermentasi, xilosa reduktase.

Xvi + 82 halaman; 41 gambar; 5 tabel; 14 lampiran

Bibliografi: (1978- 2010)

ABSTRACT

Name : Wuryaningrum
Program Study : Chemistry
Title : Xylitol Production with Xylose Reductase Producing Yeast, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247, from Hydrolysis of Sorghum (*Sorghum bicolor.L*) ZH-30 Waste.

Xylitol is a five-carbon sugar alcohol, which is naturally present in fruits and vegetables. It also has benefits for human health such as anticariogenic and has a low glycemic index. Xylitol can be produced from xylose, either through a chemical process or by fermentation. The fermentation process was carried out by producing xylose reductase-yeast, *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247. Xylose was produced through the hydrolysis of hemicellulose contained in lignocellulosic wastes such as crop sorghum. In this research, the hydrolysis of stems and panicles of sorghum waste would produce xylose which then was used as raw material for xylitol production by biotechnology processes with the addition of D(-) arabinose as co-substrate. Dewax and delignification process is carried out on sample before hydrolysis to remove extractive compounds and lignin that may inhibit the fermentation process. Hydrolysis carried out with 0,3 M sulfuric acid, at 121°C. Based on HPLC analysis, the optimum hydrolysis time is 35 minutes for stem and 45 minutes for panicle, each producing 4083,8 ppm or 20,45% xylose and 4690,6 ppm or 23,5% respectively. The HPLC analysis also showed that optimum time for fermentation is 12 hours. The conversion of xylose to xylitol is 12,48%; 8,98% and 2,66% respectively for the panicle, stem, and pure xylose. It was found that addition of D(-) arabinose as co-substrate reduced the formation of xylitol.

Key Words : sorghum ZH-30, xylose, xylitol, hydrolysis, fermentation, xylose reductase

Xvi + 82 pages; 41 pictures; 5 tables; 14 attachments

Bibliografi: (1978 - 2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.1.1 Xilitol.....	1
1.1.2 Sorgum.....	3
1.1.3 Pemanfaatan limbah pertanian.....	5
1.2 Tujuan penelitian	6
1.3 Rumusan masalah.....	6
1.4 Hipotesis.....	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Sorgum.....	8
2.1.1 Manfaat sorgum.....	8
2.1.2 Morfologi tanaman sorgum.....	9
2.1.3 Taksonomi tanaman sorgum.....	10
2.1.4 Sorgum ZH-30.....	11
2.2 Lignoselulosa.....	11
2.2.1 Selulosa.....	12
2.2.2 Lignin.....	14
2.2.3 Hemiselulosa.....	16

2.2.3.1	Xilan.....	16
2.2.3.2	Xilosa.....	17
2.3	Xilitol.....	18
2.4	Hidrolisis	19
2.4.1	Hidrolisis dengan katalis enzim.....	19
2.4.2	Hidrolisis hemiselulosa dengan katalis asam.....	20
2.5	Fermentasi	22
2.6	Khamir.....	23
2.6.1	<i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247.....	23
2.7	Enzim.....	24
2.7.1	Pengertian enzim	24
2.7.2	Cara kerja enzim	25
2.8	Substrat dan kosubstrat	26
2.8.1	Pengertian substrat dan kosubstrat.....	26
2.8.2	Arabinosa sebagai kosubstrat	27
2.9	Metabolisme xilosa pada khamir.....	28
2.10	Sejarah perkembangan pembuatan xilitol secara bioteknologi	30
2.11	Prospek diversifikasi pemanfaatan xilitol	32
3.	METODE PENELITIAN	34
3.1	Lokasi, alat dan bahan kimia	34
3.1.1	Lokasi penelitian.....	34
3.1.2	Alat –alat yang digunakan.....	34
3.1.3	Bahan-bahan kimia yang digunakan.....	34
3.1.4	Sampel penelitian.....	35
3.1.5	Mikroorganisme yang digunakan.....	35
3.2	Prosedur kerja.....	35
3.2.1	Pembuatan sampel dari malai dan tangkai sorgum.....	35
3.2.2	Dewax sampel.....	35
3.2.3	Delignifikasi.....	36
3.2.4	Pembuatan larutan standar.....	36
3.2.5	Pembuatan hidrolisat.....	37

3.2.6	Sterilisasi alat.....	38
3.2.7	Penyiapan inokulum.....	38
3.2.8	Perhitungan jumlah sel khamir.....	39
3.2.9	Pembuatan media starter.....	40
3.2.10	Fermentasi.....	40
3.2.11	Variasi kondisi.....	41
3.2.12	Analisis produk dengan HPLC.....	41
4.	PEMBAHASAN.....	45
4.1	Sampling tangkai malai dan tangkai sorgum.....	45
4.2	Pembuatan sampel dari malai dan tangkai sorgum.....	46
4.3	Dewax sampel.....	47
4.4	Delignifikasi.....	48
4.5	Pembuatan hidrolisat.....	51
4.6	Identifikasi standar karbohidrat.....	55
4.7	Hasil hidrolisis sampel sorgum.....	57
4.8	Detoxifikasi hidrolisat dengan arang aktif.....	59
4.9	Fermentasi.....	61
4.10	Hasil fermentasi	64
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	72
5.1	Kesimpulan.....	72
5.2	Saran.....	72
6	DAFTAR PUSTAKA	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Skema pembuatan xilitol.....	2
Gambar 2.1	Tanaman sorgum.....	9
Gambar 2.2	Ras <i>Sorgum bicolor</i>	10
Gambar 2.3	Lignoselulosa dalam sel tumbuhan.....	12
Gambar 2.4	Struktur selulosa.....	13
Gambar 2.5	Ikatan hidrogen pada selulosa.....	13
Gambar 2.6	Ikatan lignin dengan glukuronoxilan	14
Gambar 2.7	Struktur lignin.....	15
Gambar 2.8	Struktur dasar arabinoglukuronoxilan.....	17
Gambar 2.9	Struktur xilosa.....	18
Gambar 2.10	Struktur xilitol.....	19
Gambar 2.11	Mekanisme hidrolisis.....	21
Gambar 2.12	Skema perbandingan energi aktivasi reaksi tanpa dan dengan enzim.....	26
Gambar 2.13	Pathway L-arabinosa dan D-xilosa ke pentosa fosfat pathway (PPP) dalam metabolisme khamir	27
Gambar 2.14	Pathway L-Arabinosa menjadi xilitol dalam fungi.....	28
Gambar 2.15	Jalur metabolisme xilosa oleh khamir.....	30
Gambar 2.16	Konversi enzimatik xilitol menjadi gula jenis lain	32
Gambar 3.1	Bagan kerja delignifikasi.....	42
Gambar 3.2	Bagan kerja fermentasi per 12 jam	43
Gambar 3.3	Bagan kerja fermentasi per 6 jam dengan penambahan kosubstrat	44
Gambar 4.1	Tangkai dan malai sorgum.....	46
Gambar 4.2	Alat giling dan hasil penggilingan	47
Gambar 4.3	Filtrat hasil proses dewax.....	48
Gambar 4.4	Pemutusan ikatan oleh delignifikasi.....	50
Gambar 4.5	Monomer penyusun lignin.....	51

Gambar 4.6	Autoclave dan hasil hidrolisis.....	53
Gambar 4.7	Perubahan pentosa dan heksosa karena pengaruh asam.....	54
Gambar 4.8	Waktu retensi xilosa hasil kromatogram.....	56
Gambar 4.9	Waktu retensi xilitol hasil kromatogram.....	56
Gambar 4.10	Persamaan regresi larutan xilosa dan xilitol.....	57
Gambar 4.11	Contoh kromatogram hasil hidrolisis.....	57
Gambar 4.12	Kurva hasil hidrolisat sampel sorgum.....	59
Gambar 4.13	Hidrolisat sebelum dan setelah detoksifikasi.....	61
Gambar 4.14	Contoh reaksi Maillard.....	63
Gambar 4.15	Shaker.....	64
Gambar 4.16	Kurva produksi xilitol per 12 jam.....	65
Gambar 4.17	Xilosa hasil hidrolisat tangkai tanpa khamir.....	66
Gambar 4.18	Xilosa hasil hidrolisat malai tanpa khamir.....	67
Gambar 4.19	Konversi xilitol dari hidrolisat tangkai dan xilosa murni.....	69
Gambar 4.20	Konversi xilitol dari hidrolisat malai dan xilosa murni.....	69
Gambar 4.21	Biokonversi xilitol menjadi gula lain.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Kandungan nutrisi hasil pertanian.....	3
Tabel 1.2	Galur-galur sorgum.....	5
Tabel 4.1	Hasil dewax dan delignifikasi	50
Tabel 4.2	Xilosa hasil hidrolisis sampel berdasar waktu	58
Tabel 4.3	Data konversi xilitol pada penambahan kosubstrat D(-) arabinosa ...	68



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kromatogram larutan standar xilosa.....	80
Lampiran 2	Kromatogram larutan standar xilitol.....	84
Lampiran 3	Kromatogram larutan standar D(-) arabinosa dan glukosa.....	87
Lampiran 4	Kromatogram hasil hidrolisis tangkai.....	88
Lampiran 5	Kromatogram hasil hidrolisis malai.....	91
Lampiran 6	Kromatogram xilosa hidrolisat non detoks dan detoks.....	94
Lampiran 7	Kromatogram hasil fermentasi tangkai per 12 jam.....	96
Lampiran 8	Kromatogram hasil fermentasi malai per 12 jam.....	100
Lampiran 9	Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni	104
Lampiran 10	Kromatogram hasil fermentasi tangkai per 6 jam.....	107
Lampiran 11	Kromatogram hasil fermentasi malai per 6 jam.....	113
Lampiran 12	Contoh cara perhitungan.....	116
Lampiran 13	Tabel rekapitulasi data hasil fermentasi	121
Lampiran 14	Determinasi tanaman dari Pusat Penelitian Biologi	127

BAB I

PENDAHULUAN

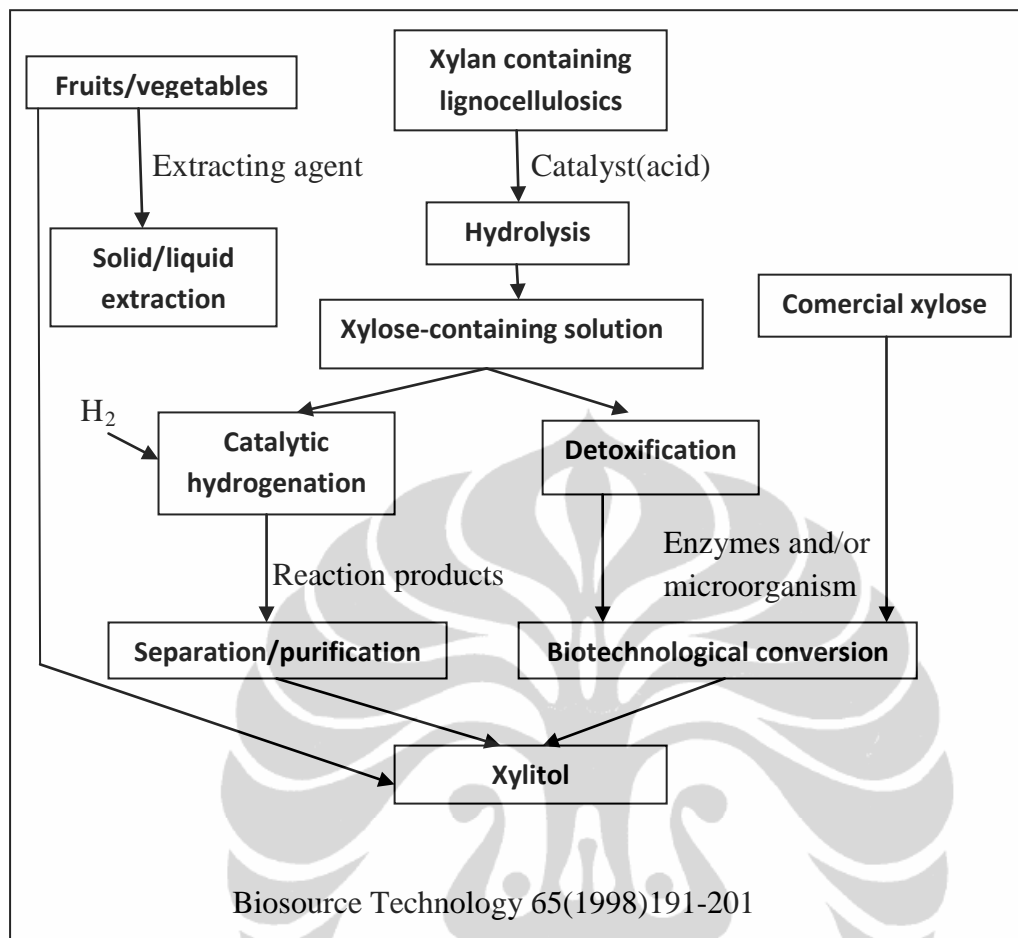
1.1 Latar Belakang Masalah

1.1.1 Xilitol

Xilitol merupakan gula polialkohol berkarbon lima dengan tingkat kemanisan setara sukrosa, tetapi mengandung hanya 2,4 kal/g, sementara sukrosa 4 kal/g. Xilitol sangat cocok dikonsumsi oleh penderita diabetes mellitus, karena memiliki indeks glukemik rendah (Brunzell; 1978). Secara alami xilitol terdapat dalam jumlah sedikit pada sayuran dan buah-buahan, misalnya kol, pisang dan stroberi. Xilitol juga terdapat sebagai senyawa antara pada metabolisme mamalia, orang dewasa memproduksi 5 sampai dengan 15 g/hari (Pepper and Olinger; 1988).

Dalam skala industri xilitol dibuat dengan cara kimia yaitu dengan mereduksi xilosa murni dengan gas hidrogen, pada suhu 80°C-140°C dan menggunakan katalis Raney nikel. Cara ini dapat mengubah 50 sampai dengan 60% xilosa menjadi xilitol, tetapi cara ini tidak ramah lingkungan karena akan menghasilkan polutan logam. Proses ini juga berbiaya tinggi karena xilosa yang didapat dari hidrolisis hemiselulosa harus dimurnikan terlebih dahulu (Nigam and Singh; 1995). Kini produksi xilitol dunia sekitar 20.000 sampai 40.000 ton per tahun dengan nilai 40 sampai 80 juta Euro (Granström *et al*; 2007).

Penggunaan beberapa spesies khamir untuk membuat xilitol dari xilosa secara bioteknologi telah banyak dipelajari sebagai alternatif (Parajö *et al*; 1998).



Gambar 1.1 Skema pembuatan xilitol.

Pembuatan xilitol dengan cara bioteknologi punya nilai lebih dibanding cara kimia. Keunggulan pembuatan xilitol dengan proses bioteknologi antara lain, tidak menimbulkan masalah lingkungan karena tidak terbentuk limbah logam, biaya yang relatif murah karena prosesnya berlangsung pada suhu kamar dan tekanan normal, juga banyak jenis mikroorganisme mampu menghasilkan enzim xilosa reduktase yang dapat mengubah xilosa menjadi xilitol antara lain khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 (Riki; 2008).

1.1.2 Sorgum

Indonesia sebagai Negara agraris dengan jumlah penduduk mencapai 209.597.000 (BKKBN; 2000) memerlukan ketersediaan pangan yang mencukupi. Tanaman sorgum yang dapat tumbuh di lahan marginal bisa dikembangkan di Indonesia untuk digunakan sebagai sumber karbohidrat alternatif selain beras, gandum dan jagung. Hal ini karena sorgum memiliki kandungan nutrisi yang baik, bahkan kandungan protein dan unsur-unsur nutrisi penting lainnya lebih tinggi daripada beras, seperti terlihat pada pada tabel 1.1 (DepKes RI; 1992).

Tabel 1.1 Kandungan nutrisi beberapa hasil pertanian

Unsur nutrisi	Kandungan/100 g				
	Beras	Jagung	Singkong	Sorgum	Kedele
Kalori(cal)	360	361	146	332	286
Protein(g)	6,8	8,7	1,2	11,0	30,2
Lemak(g)	0,7	4,5	0,3	3,3	15,6
Karbohidrat(g)	78,9	72,4	34,7	73,0	30,1
Kalsium(mg)	6,0	9,0	33,0	28,0	196,0
Besi(mg)	0,8	4,6	0,7	4,4	6,9
Phosfor(mg)	140	380	40	287	506
Vit B1(mg)	0,12	0,27	0,06	0,38	0,93

[Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI(1992)]

Sebagai pangan, kandungan gizi sorgum relatif baik, bahkan protein, kalsium dan vitamin B1 sorgum lebih tinggi daripada beras dan jagung. Diharapkan sorgum dapat membantu mengatasi masalah pangan dan gizi masyarakat, terutama di daerah rawan pangan yang wilayahnya kering dan tandus (Human; 2001).

Sorgum bukan merupakan tanaman asli Indonesia maka keragaman genetik sorgum yang ada masih sangat terbatas. Untuk itu perlu dilakukan pemuliaan tanaman sorgum agar diperoleh varietas yang cocok dengan keadaan alam di Indonesia serta sesuai pula dengan kebutuhan.

Beberapa varietas sorgum biji (*grain sorghum*) diintroduksi dari *International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics* (ICRISAT) dan dari beberapa negara seperti India, Thailand dan China. Setelah melalui proses pengujian adaptasi dan daya hasil selama beberapa generasi kemudian beberapa varietas introduksi tersebut oleh Departemen Pertanian dilepas menjadi varietas unggul nasional. Sampai saat ini Indonesia telah memiliki beberapa varietas sorgum unggul nasional seperti UPCA, Keris, Mandau, Higari, Badik, Gadam, Sangkur, Numbu dan Kawali. Varietas-varietas unggul nasional tersebut memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan pada lahan-lahan pertanian di Indonesia.

Sorgum tergolong tanaman berpenyerbuk sendiri (*selfpollinated crop*) dan diploid ($2x=2n=20$). Oleh karena itu, sistem pemuliaan tanaman sorgum kira-kira mirip dengan sistem pemuliaan tanaman padi, kedelai dan sebagainya. Seperti halnya pada padi, pemuliaan tanaman sorgum dapat diarahkan menuju perolehan varietas galur murni atau varietas hibrida. Di beberapa negara seperti Amerika Serikat, India dan China, sorgum hibrida telah banyak dikembangkan dan memiliki hasil sampai 15 ton/ha. Di masa depan, Indonesia mungkin perlu juga mengarah pada pengembangan sorgum hibrida apabila nanti budidaya sorgum telah memasyarakat, meluas dan komersial.

Keterbatasan ragam genetik sorgum memacu kita untuk mencari sumber-sumber genetik baru. Upaya tersebut dapat ditempuh melalui program pemuliaan tanaman dengan berbagai metoda seperti seleksi, introduksi, hibridisasi, mutasi, atau bioteknologi. Kombinasi antara metoda-metoda tersebut mungkin dapat dilakukan untuk memperoleh hasil optimal. Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR) Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) telah melakukan pemuliaan tanaman sorgum, khususnya dengan metoda kombinasi mutasi induksi dan hibridisasi untuk memperbaiki genotipe tanaman (Human; 2001).

PATIR BATAN telah berhasil mendapatkan beberapa galur baru *sorghum bicolor* suatu sorgum jenis grain dengan berbagai keunggulan melalui proses pemuliaan tanaman dengan iptek nuklir.

Tabel 1.2 Galur-galur sorgum hasil pemuliaan oleh PATIR BATAN

NOMOR GALUR	NAMA GALUR	KETERANGAN
1	B-100	Sinar Gamma 200 Gy
2	B-95	Sinar Gamma 300 Gy
3	B-92	Sinar Gamma 200 Gy
4	B-90	Sinar Gamma 200 Gy
5	B-83	Sinar Gamma 300 Gy
6	B-76	Sinar Gamma 200 Gy
7	B-75	Sinar Gamma 200 Gy
8	B-72	Sinar Gamma 200 Gy
9	B-69	Sinar Gamma 200 Gy
10	ZH-30	Sinar Gamma 300 Gy
11	CTY-33	Sinar Gamma 300 Gy
12	DURRA	Kontrol Induk BATAN
13	UPCA-S1	Kontrol Unggulan Nasional
14	MANDAU	Kontrol Unggulan Nasional
15	KAWALI	Kontrol Unggulan Nasional

[Sumber: Press Release SEAMEO BIOTROP Tajur Bogor]

BATAN bekerja sama dengan SEAMEO BIOTROP (Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology), telah melakukan penelitian uji adaptasi galur-galur sorgum BATAN pada lahan penelitian SEAMEO BIOTROP di Tajur Bogor. Pengujian budi daya sorgum yang dilakukan yaitu tumpang sari dengan jarak pagar dan jati, uji sosialisasi dengan mikorhiza, dan uji produksi dengan teknologi bio-charcoal.

1.1.3 Pemanfaatan Limbah Pertanian

Perkembangan dalam bidang pertanian dan industri pertanian di Indonesia, seringkali menyebabkan meningkatnya limbah pertanian yang sebagian besar merupakan limbah berlignoselulosa. Secara kimia limbah berlignoselulosa kaya akan komponen yang dapat diolah menjadi produk-produk yang lebih bernilai ekonomis. Limbah lignoselulosa ini meliputi jerami, serbuk gergaji, tandan kosong kelapa sawit, sabut, bagase, limbah hasil pertanian sorgum dan sebagainya.

Limbah pertanian yang tidak tertangani sering menimbulkan pencemaran lingkungan. Pada dasarnya limbah tidak punya nilai ekonomi, bahkan kadang memerlukan biaya tinggi untuk mengelolanya (Richana; 2004). Limbah pertanian sebagian besar merupakan lignoselulosa.

Sebagai bahan organik, lignoselulosa punya potensi untuk dijadikan bahan baku industri makanan, minuman, kertas dan tekstil. Fraksinasi limbah ini menjadi komponen penyusunnya akan meningkatkan daya guna dalam berbagai industri.

Salah satu sasaran pembangunan dalam pengembangan bioteknologi dan pengembangan agroindustri, adalah pemanfaatan mikroorganisme dalam biokonversi limbah sehingga menciptakan nilai tambah. Pemanfaatan limbah dengan menggunakan jasa mikroorganisme dapat menghasilkan berbagai senyawa turunan, antibiotik, enzim dan sebagainya (Howard *et al*; 2003).

Lignoselulosa tersusun atas fraksi lignin, selulosa dan hemiselulosa. Dari ke tiga fraksi ini, selulosa yang sudah banyak dimanfaatkan misalnya untuk industri kertas, sedangkan hemiselulosa belum banyak dimanfaatkan.

Komponen utama penyusun hemiselulosa adalah xilan yang memiliki ikatan rantai β -1,4-xilosida, dan biasanya tersusun atas 150-200 monomer xilosa (Kulkarni *et al*; 1999). Hidrolisis xilan menghasilkan xilosa yang merupakan bahan baku pembuatan xilitol.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan memanfaatkan limbah pertanian sorgum yang berupa tangkai dan malai untuk menghasilkan xilosa yang digunakan sebagai substrat pada produksi xilitol, dengan cara bioteknologi. Pada proses ini digunakan khamir *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 sebagai penghasil enzim xilosa reduktase.

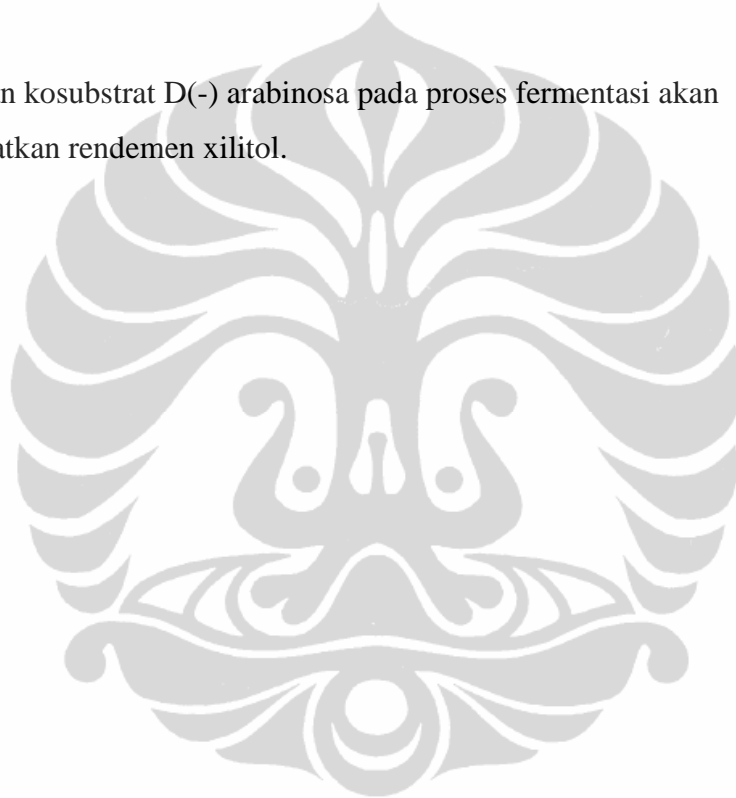
1.3 Perumusan Masalah

Pada penelitian ini, sampel tangkai dan malai sorgum ZH-30 dihilangkan wax dan ligninnya sebelum dihidrolisis. Hidrolisis dilakukan dengan variasi waktu untuk menghasilkan xilosa optimal. Detoksifikasi dilakukan pada hidrolisat sebelum proses fermentasi oleh khamir penghasil xilosa reduktase. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *batch* (curah).

Pengukuran sampel hasil penelitian dilakukan menggunakan alat HPLC dengan detektor Index Refraktif (RID).

1.4 Hipotesis

1. Tangkai dan malai sorgum mempunyai kandungan xilosa tinggi, sehingga bisa digunakan sebagai bahan baku pada pembuatan xilitol.
2. Terdapat perbedaan kandungan hemiselulosa sumber xilosa pada tangkai dan malai tanaman sorgum, sehingga akan memberikan rendemen xilitol yang berbeda.
3. Pemberian kosubstrat D(-) arabinosa pada proses fermentasi akan meningkatkan rendemen xilitol.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sorgum

2.1.1 Manfaat Sorgum

Sorgum (*Sorghum bicolor. L*) termasuk dalam tanaman serealia sumber karbohidrat asli Afrika yang memiliki potensi penting dalam ketahanan pangan dunia. Keunggulan sorgum sebagai tanaman yang dapat tumbuh pada lahan kering, lahan masam, dan lahan basa, sangat menjanjikan untuk ditanam pada lahan-lahan kritis atau marginal di wilayah-wilayah Indonesia yang mungkin telah lama tidak digarap (Human; 2001).

Selain dimanfaatkan sebagai sumber pangan, sorgum juga dimanfaatkan untuk pakan ternak, yaitu biji sorgum untuk bahan campuran ransum pakan ternak unggas, sedangkan batang dan daun sorgum untuk pakan ternak ruminansia. Batang sorgum manis banyak mengandung gula yang bisa digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol, juga ada jenis sorgum yang digunakan untuk membuat sapu.

Kandungan karbohidrat biji sorgum cukup tinggi sehingga sering digunakan sebagai bahan baku bermacam industri seperti industri beer, pati, gula cair (sirup), *jaggery* (semacam gula merah), etanol, lem, cat, kertas, *degradable plastics* dan lain-lain. Ada pula jenis sorgum yang batangnya mengandung kadar gula cukup tinggi dan disebut sorgum manis (*sweet sorghum*). Sorgum manis sangat ideal digunakan untuk pakan ternak ruminansia, gula cair (sirup), *jaggery* dan bioetanol (ICRISAT; 1990).

2.1.2 Morfologi Tanaman Sorgum

Tanaman sorgum (*Sorghum bicolor. L*) merupakan tanaman graminiae yang mampu tumbuh hingga 6 meter. Bunga sorgum termasuk bunga sempurna dimana kedua alat kelaminnya berada di dalam satu bunga. Bunga sorgum merupakan bunga tipe panicle (susunan bunga di tangkai). Rangkaian bunga sorgum berada di bagian ujung tanaman.

Bentuk tanaman ini secara umum hampir mirip dengan jagung yang membedakan adalah tipe bunga dimana jagung memiliki bunga tidak sempurna sedangkan sorgum bunga sempurna.

Morfologi tanaman sorgum adalah :

1. Akar : tanaman sorgum memiliki akar serabut
2. Batang : batang tunggal yang terdiri atas ruas-ruas
3. Daun : terdiri atas lamina (blade leaf) dan auricle
4. Rangkaian bunga sorgum yang akan menjadi bulir-bulir sorgum.

Pada daun sorgum terdapat lapisan lilin yang ada pada lapisan epidermisnya. Adanya lapisan lilin tersebut menyebabkan tanaman sorgum mampu bertahan pada daerah dengan kelembaban sangat rendah. Lapisan lilin tersebut menyebabkan tanaman sorgum mampu hidup dalam cekaman kekeringan.



Gambar 2.1 Tanaman sorgum

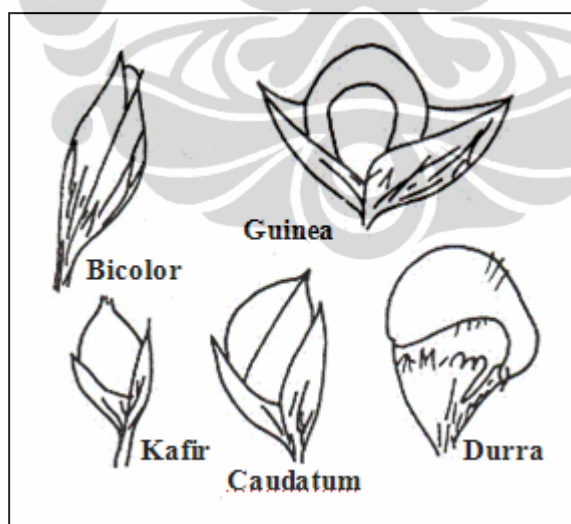
[Sumber: <http://www.mgel.msstate.edu/sorghum.htm>]

2.1.3 Taksonomi Tanaman Sorgum

Tanaman sorgum merupakan tanaman gramineae yang memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta
 Superdivision : Spermatophyta
 Division : Magnoliophyta
 Class : Liliopsida
 Subclass : Commelinidae
 Orde : Cyperales
 Family : Poaceae (Grass)
 Genus : Sorghum
 Spesies : *Sorghum bicolor*

Spesies *Sorghum bicolor* terdiri atas lima jenis ras berdasarkan tipe spikelet (tangkai biji), yaitu; bicolor, guinea, kafir, caudatum dan durra. Durra merupakan ras dari *Sorghum bicolor* yang dimanfaatkan kandungan tepungnya sebagai sumber karbohidrat (Human; 2010).



Gambar 2.2 Ras- ras *Sorghum bicolor*. L

[Sumber: <http://www.bsl-online.com/energi/archive/1.html>]

2.1.4 Sorgum Galur ZH-30

Sorgum ZH-30 merupakan sorgum ras durra hasil mutasi *Sorghum zhenzu* asal Cina (Santosa dan Human; 2009), yang dilakukan oleh PATIR (Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi) BATAN dengan tehnik radiasi sinar gamma. Produk mutan sorgum ZH-30 yang diidentifikasi memiliki ketahanan tumbuh di lahan kering, kualitas bulir yang lebih bagus, serta kadar tepung yang lebih tinggi daripada varietas induknya. Sorgum ZH-30 dihasilkan melalui proses seleksi dari beberapa generasi (Santoso dan Human; 2009). Sorgum ZH-30 menghasilkan biji yang lebih putih, serta memiliki kualitas tepung dan serat yang tinggi, sehingga bisa digunakan sebagai pengganti tepung terigu dalam industri makanan, misalnya untuk membuat muffin.

2.2 Lignoselulosa

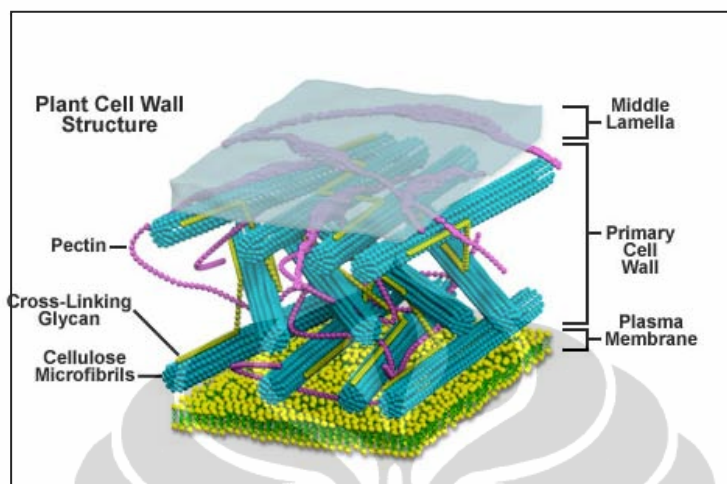
Lignoselulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tumbuhan. Dinding sel tumbuhan berfungsi untuk melindungi, mempertahankan bentuk, serta mencegah kehilangan air secara berlebihan. Adanya dinding sel yang kuat, menyebabkan tumbuhan dapat berdiri tegak dan kokoh melawan grafitasi bumi.

Dinding sel terletak pada bagian luar membran sel dan merupakan suatu eksoskeleton yang berperan untuk memberi bentuk pada sel, melindungi, sekaligus sebagai penyokong mekanik. Dinding sel juga berperan dalam memelihara kesetimbangan tekanan osmosis antara cairan intra seluler dan kecenderungan air untuk memasuki sel.

Dinding sel tersusun atas dinding sel primer dan dinding sel sekunder, diantara dinding sel primer suatu sel dengan dinding sel primer sel tetangganya terdapat lamela tengah. Lamela tengah merupakan perekat yang mengikat sel-sel secara bersama-sama untuk membentuk jaringan, dan oleh sebab itu dijumpai di antara dinding- dinding sel primer yang berdekatan.

Lignoselulosa merupakan komponen utama dinding sel tanaman dan merupakan sumber bahan organik yang dapat diperbarui. Lignoselulosa terdiri dari selulosa (35-40%), hemiselulosa (30-35%), lignin (14-15%), dan

beberapa bahan ekstraktif lain (Sjöström; 1993). Selulosa dan hemiselulosa dapat dikonversi menjadi monomer-monomer penyusunnya melalui proses hidrolisis.



Gambar 2.3 Lignoselulosa dalam dinding sel tumbuhan
[Sumber: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>]

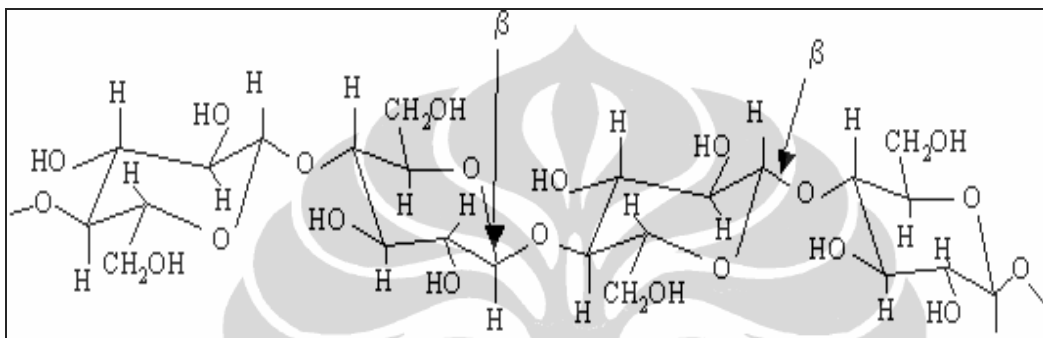
2.2.1 Selulosa

Dinding sel primer tersusun atas selulosa, yaitu suatu polimer β -glukosa dengan ikatan β -1,4. Kurang lebih 8000-15000 gugus β -glukosa secara bersama-sama membentuk suatu rantai selulosa (Krengel and Dijkstra; 1996). Kurang lebih 40-70 rantai molekul selulosa terdapat dalam kelompok-kelompok yang sejajar membentuk mikrofibril. Mikrofibril saling berkelompok membentuk serat dengan diameter $\pm 0,5 \mu$ (Thorpe; 1983). Di dalam dinding sel, mikrofibril dilapisi oleh hemiselulosa yang selanjutnya dihubungkan ke hemiselulosa lain oleh pektin.

Pada rantai selulosa, unit glukosa membentuk cincin segi enam yang disebut cincin piran. Antar cincin piran dihubungkan oleh satu atom oksigen (ikatan glikosida) melalui C-1 suatu piranosa dengan C-4 cincin piran berikutnya setelah alkohol dan hemiasetal bereaksi untuk membentuk asetal dengan melepas molekul air.

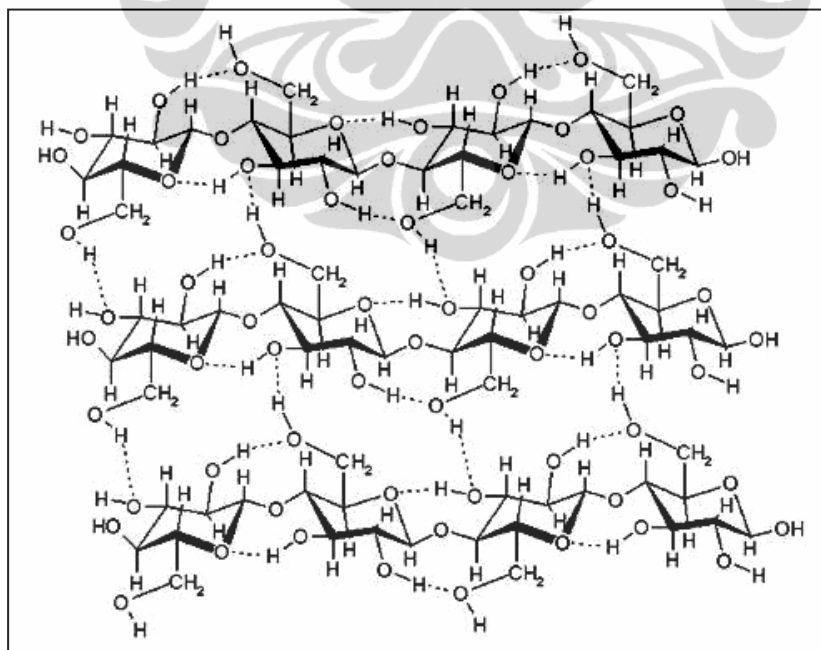
Selulosa merupakan polimer yang tidak bercabang dan membentuk serat mikrofibril. Bentuk polimer ini memungkinkan serat-serat selulosa saling menumpuk atau terikat silang membentuk struktur yang sangat

kuat (Mosier; 2005). Selulosa merupakan komponen terbesar di dalam dinding sel tumbuhan, yaitu antara 35- 40%. Selulosa terdiri dari unit-unit β -D-glukopiranososa dengan ikatan β -1,4-glikosida, membentuk homopolisakarida yang tersusun linier dan memiliki kecenderungan untuk membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dan intermolekuler yang menyebabkan polimer ini menjadi lebih kuat dan kaku.



Gambar 2.4 Struktur selulosa

[Sumber: <http://www.paperonweb.com/dict.htm>]



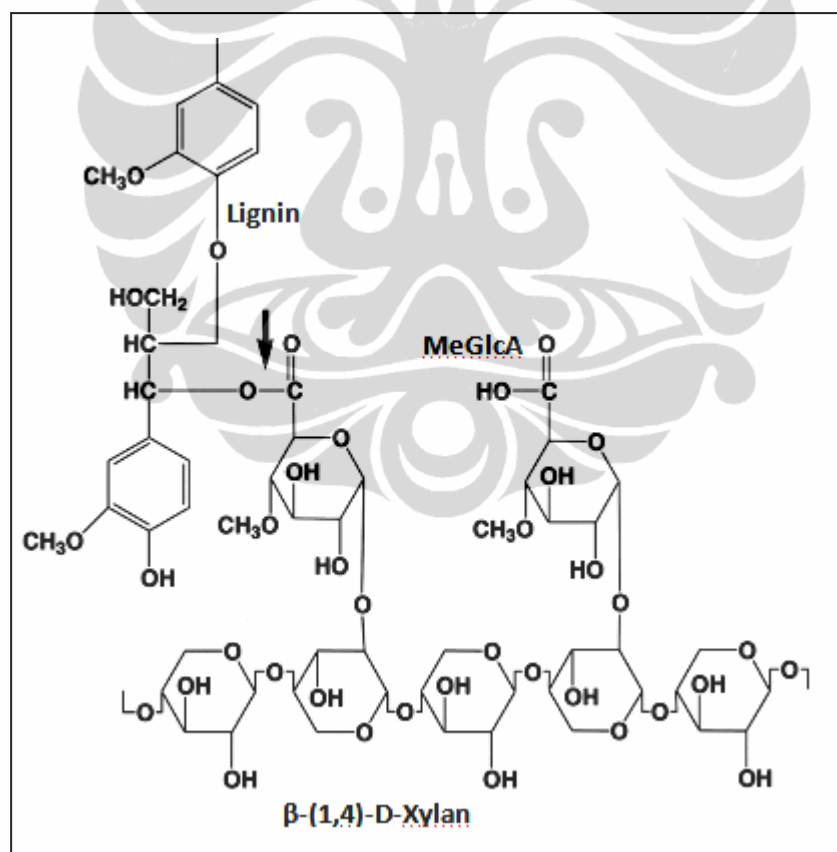
Gambar 2.5 Ikatan hidrogen pada selulosa

[Sumber: http://andersonlab.qb3.berkeley.edu/Tutorials/Bare_Bones_Biochemistry.htm]

Selulosa alami mempunyai bentuk amorf dan kristalin serta bersifat tidak larut dalam kebanyakan pelarut. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan enzim atau asam (Howard *et al*; 2003).

2.2.2 Lignin

Lignin merupakan komponen dinding sel tanaman paling keras dan berfungsi sebagai penguat dan pembentuk dinding sel yang kokoh dan biasanya mengisi dinding sel sekunder. Lignin merupakan polimer dari unit fenilpropanoid tiga dimensi yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Lignin berikatan kovalen dengan hemiselulosa dan berikatan silang dengan polisakarida lain pada tanaman, sehingga meningkatkan kekuatan mekanis dari dinding sel tumbuhan secara keseluruhan.

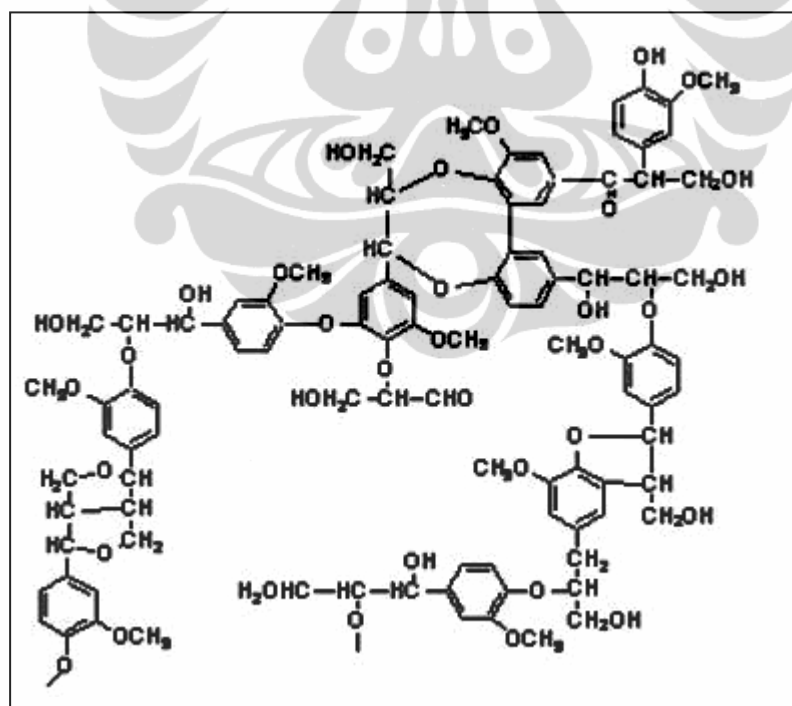


Gambar 2.6 Ikatan lignin dengan glukuronoxilan

[Sumber: <http://journals.iucr.org/f/issues/2008/04/00/115145/115145fig1.html>]

Lignin merupakan makromolekul besar dengan berat molekul lebih dari 10 ribu, bersifat hidrofobik dan merupakan material yang paling kuat di dalam lignoselulosa. Komposisi lignin dalam tanaman sangat bervariasi tergantung spesies tanamannya. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Karena kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa, lignin memiliki kandungan energi yang tinggi.

Tiga macam monomer penyusun lignin yaitu p-coumaryl alkohol, coniferyl alkohol dan sinapyl alkohol membentuk ikatan silang tersubstitusi (phenilpropanoid). Lignin mengisi ruangan antara pada dinding sel yang berisi selulosa, hemiselulosa dan pektin yang berikatan kovalen dengan hemiselulosa (Ramos; 2003). Lignin mirip dengan semacam resin phenolformaldehid yang berperan sebagai lem yang merekatkan seluruh matriks dari lignoselulosa. Lignin membantu memberikan tambahan kekuatan pada dinding sel serta resistan terhadap serangan dan penyakit.



Gambar 2.7 Struktur lignin

[Sumber: <http://www.lignin.info/01augdialogue.html>]

2.2.3 Hemiselulosa

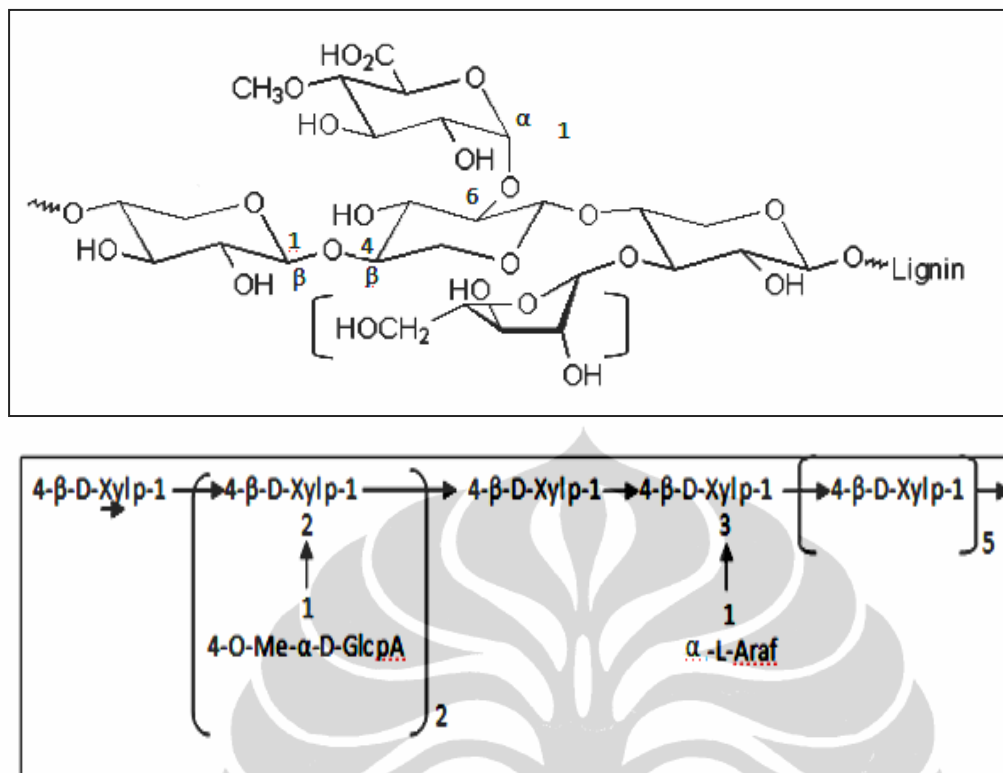
Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polimer gula. Namun, berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun oleh glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer gula berkarbon lima (pentosan), serta gula berkarbon enam (heksosan).

Hemiselulosa merupakan polimer bercabang dengan berat molekul rendah dan derajat polimerisasi antara 80 - 200. Hemiselulosa mengikat fibril-fibril selulosa untuk membentuk mikrofibril, yang dapat meningkatkan stabilitas dinding sel. Rumus umumnya $(C_5H_8O_4)_n$ dan $(C_6H_{10}O_5)_n$ yang disebut pentosan dan heksosan (Harborne; 1988). Hemiselulosa tersusun atas beberapa jenis gula sederhana misal, D-xyloza, L-arabinosa, D-glukosa, D-galaktosa, D-manosa, asam D-glukuronat, asam 4-O-metil-D-glukuronat, asam D-galakturonat, serta sedikit L-ramnosa, L-fukosa. Xyloza merupakan komponen utama hemiselulosa, diikuti arabinosa, glukosa, galaktosa, dan manosa. Ramnosa merupakan komponen hemiselulosa yang paling sedikit.

Komposisi dan struktur hemiselulosa dalam kayu lunak secara khusus berbeda dengan yang ada dalam kayu keras. Hemiselulosa berasosiasi secara kimia atau terikat silang dengan selulosa, protein dan lignin. Berbagai jenis hemiselulosa mempunyai dua ciri struktur yang sama, yaitu struktur induk yang terdiri atas ikatan β 1-4, serta rantai samping yang pendek. Hemiselulosa umumnya dikelompokkan berdasarkan residu gula utama yang menyusun rangkanya, seperti xilan, manan dan galaktan (Sjöström; 1995).

2.2.3.1 Xilan

Xilan adalah komponen utama hemiselulosa yang memiliki rantai utama xilopiranososa yang mengandung unit-unit β -D-xilopiranososa yang saling berikatan dengan ikatan β -1,4-glikosida. Xilan memiliki residu O-asetil, arabinosil, dan 4-O-metil-D-asam glukuronat, yang terikat pada rantai utamanya. Pada kayu lunak, xilan berupa arabinoglukuronoxilan (Gambar 2.8).



Gambar 2.8 Struktur dasar Arabinoglukuronoxilan, dengan unit-unit gula β -D-xilopiranososa (Xyl-p); asam 4-O-metil- α -D-glukopiranosiluronat (Glc-Pa); α -L-arabinofuranosa (Araf).

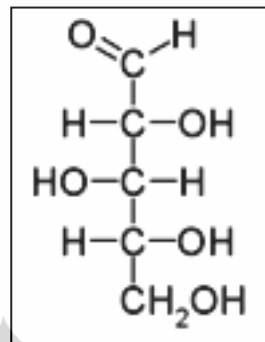
[Sumber: <http://chemistry.umeche.maine.edu/Fort/Cole-Fort.html>]

2.2.3.2 Xilosa

Xilosa merupakan aldopentosa, monosakarida yang tersusun dari lima buah atom karbon dengan gugus aldehyd. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis bahan-bahan yang mengandung hemiselulosa yang terdapat dalam kayu ataupun bahan lainnya (Sjöström; 1995). Xilosa merupakan unit penyusun xilan, komponen terbesar dalam hemiselulosa. Xilosa merupakan bahan baku pembuatan xilitol.

Sifat-sifat fisika D-xilosa:

Nama Kimia	: D-Xilosa
Rumus Kimia	: $C_5H_{10}O_5$
Berat Molekul	: 150,13 g/mol
Titik leleh	: 144 -145°C.
Densitas	: 1,52 g/cm ³ .



Gambar 2.9 Struktur D- xilosa.

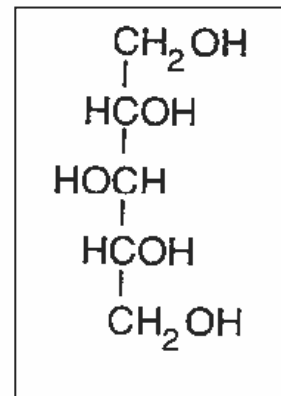
2.3 Xilitol

Xilitol merupakan gula alkohol dengan lima atom karbon. Xilitol banyak digunakan sebagai pemanis buatan pengganti sukrosa. Xilitol secara alami terdapat pada berbagai buah dan sayuran, seperti jamur, plum, kembang kol, bayam dan jagung.

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 Sachen pada 1891 (Dunayer; 2006). Xilitol ini kemudian diperkenalkan sebagai pemanis yang aman bagi penderita diabetes mellitus. Xilitol ternyata juga mempunyai manfaat dalam mencegah karies gigi, hal ini karena berdasarkan penelitian, mikroorganisme kariogenik lebih menyukai struktur gula berkarbon enam seperti glukosa dalam mendukung pertumbuhannya. Xilitol memiliki lima atom karbon sehingga bakteri kariogenik seperti *Streptococcus mutans* yang ada dalam mulut tidak dapat mengonsumsi atau mendegradasinya sebagai sumber energi (Alanen; 2000). Penelitian lain di Finlandia menyimpulkan bahwa xilitol mampu meningkatkan kepadatan tulang, sehingga bisa digunakan untuk melawan osteoporosis (Matilla *et al*; 2002).

Sifat-sifat Fisika D-Xilitol:

Rumus Kimia	: $C_5H_{12}O_5$
Berat Molekul	: 152,15 g/mol
Wujud	: Kristal putih
Titik leleh	: 92-96°C
Titik didih	: 126°C



Kandungan kalori : 2,4 kal/g
xilitol

Gambar 2.10 Struktur D-xilitol

Densitas : 1,52 g/cm³

Proses pembentukan xilitol dari xilosa dapat dilakukan dengan dua cara yaitu cara kimiawi dan enzimatik. Proses pembuatan secara enzimatik adalah dengan memanfaatkan mikroorganisme yakni khamir untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim xilosa reduktase. Proses secara bioteknologi ini memiliki beberapa keuntungan yaitu reaksi reduksinya selektif terhadap xilosa. Reaksi berlangsung pada suhu dan tekanan rendah.

2.4 Hidrolisis Hemiselulosa

Hidrolisis merupakan pemecahan molekul besar menjadi bagian yang lebih kecil yang masih merupakan komponen monomer dari senyawa itu sendiri, melalui adisi oleh air. Untuk mendegradasi molekul besar ini dapat digunakan katalis enzim atau asam.

2.4.1 Hidrolisis dengan Katalis Enzim

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini adalah xilan yang merupakan polimer xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasi berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu β -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase (Richana; 2004). Hidrolisis lengkap xilan menjadi monomernya memerlukan kerja sinergi beberapa enzim xilanolitik (Meryandini; 2008).

Endoxilanase adalah enzim yang mampu memutus ikatan β 1-4 pada rantai utama xilan bagian tengah secara acak, untuk menghasilkan xilooligosakarida yang bervariasi. β -xilosidase adalah xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim ini akan menurun dengan meningkatnya xilosa yang dihasilkan, karena xilosa merupakan inhibitor bagi enzim β -xilosidase. Eksoxilanase mampu memutus rantai xilan pada ujung gula pereduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan oligosakarida rantai pendek (Fushinobu *et al*; 2005).

2.4.2 Hidrolisis dengan Katalis Asam

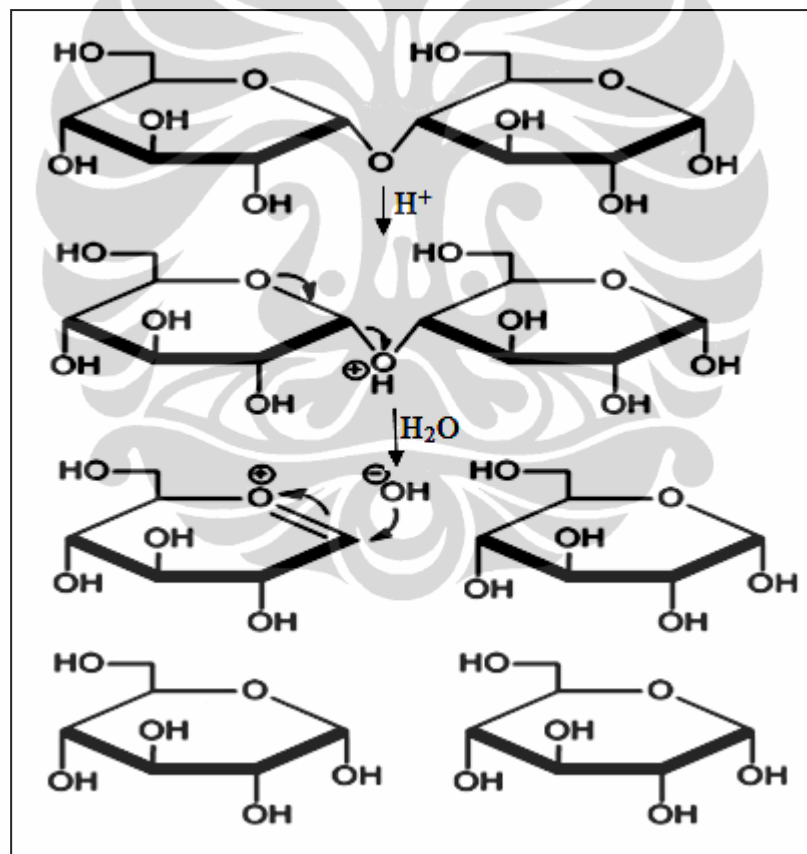
Hidrolisis dengan asam akan menghasilkan produk campuran (Parajo *et al*; 1998). Oleh karena itu dari proses hidrolisis dalam penelitian ini tidak hanya hemiselulosa yang dihidrolisis, tetapi juga selulosa dan senyawa monosakarida menjadi bentuk lain.

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

Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam melalui pemutusan ikatan – ikatan glikosida menjadi komponen monomernya. Monosakarida yang terbentuk selama proses hidrolisis oleh asam, meningkat dengan semakin tingginya konsentrasi asam dan waktu hidrolisis (Roberto *et al*; 2002). Pentosa dan heksosa yang terbentuk cenderung mengalami degradasi menjadi furfural dan 5-hidroksi metil furfural jika konsentrasi asam, waktu, dan suhu reaksi hidrolisis ditingkatkan (Buhner; V.35). Pengurangan konsentrasi

senyawa-senyawa beracun dalam hidrolisat dapat dilakukan dengan pemberian karbon aktif (Villareal *et al*; 2005).

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



Gambar 2.11 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida

[<http://mcat-review.org/carbohydrates.php>]

2.5 Fermentasi

Reaksi bioenergi atau katabolisme merupakan proses perubahan senyawa substrat yang merupakan sumber energi bagi organisme, menjadi senyawa yang tingkat energinya lebih rendah, sehingga proses ini membebaskan energi. Energi yang dibebaskan pada proses ini digunakan untuk anabolisme, biosintesis, dan melakukan aktivitas kehidupan normal. Proses-proses katabolisme bersifat oksidatif, dan dapat berlangsung dengan cara penambahan oksigen, pelepasan hidrogen, atau pelepasan elektron. Bila oksigen dari udara masuk ke dalam reaksi katabolisme dan bertindak sebagai akseptor hidrogen, maka prosesnya disebut aerobik, bila proses ini berlangsung tanpa partisipasi oksigen dari udara, disebut fermentasi (katabolisme anaerobik). Dalam fermentasi, tidak ada akseptor dari luar sistem yang berperan sehingga senyawa organik berfungsi sebagai donor elektron sekaligus juga sebagai akseptor elektron (Said; 1987).

Fermentasi berasal dari kata ferment yang berarti enzim. Definisi dari fermentasi adalah suatu proses yang bekerja berdasarkan kerja enzim. Fermentasi merupakan perubahan suatu senyawa maupun bahan organik melalui peristiwa biologis yang dilakukan oleh mikroorganisme atau enzim menjadi suatu produk baru dengan struktur fisik dan kimia yang memiliki nilai lebih tinggi. Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia yang dihasilkan dalam suatu substrat organik melalui kegiatan rumit enzim-enzim dari mikroorganisme. Adanya perubahan kimia oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme itu meliputi perubahan molekul-molekul kompleks atau senyawa organik seperti protein, karbohidrat, maupun lemak menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana, mudah larut dan daya cerna yang tinggi (Shurtleff and Aoyagi; 1979). Mikroorganisme yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang.

2.6 Khamir

Saat ini terdapat lebih dari 250.000 spesies fungi yang telah diidentifikasi. Kingdom fungi terdiri dari tiga jenis, yaitu khamir (organisme yang terdiri dari satu sel), kapang (organisme yang berfilamen), dan jamur, suatu organisme yang berkumpul membentuk struktur makroskopik atau lendir (Ingraham; 2000),

Khamir merupakan bentuk pertumbuhan dari mikroorganisme eukariotik yang berada dalam kingdom fungi. Khamir adalah golongan fungi yang fakultatif aerob atau dapat hidup dalam kondisi anaerob. Khamir ini bersel satu, kebanyakan berbentuk oval dan bereproduksi secara aseksual dengan cara *budding* atau pertunasan walau ada sebagian dengan cara pembelahan biner.

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

Taksonomi *Candida* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Ascomycota
Sub divisi	: Saccharomycotina
Klas	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Candida</i>

Contoh Spesies : *C.fukuyamaensis*; *C.boidinii*; *C.albican*; *C.dublinskiensis*.

2.6.1 *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

Khamir ini dapat menghasilkan enzim xilosa reduktase dan xilitol dehidrogenase sehingga dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Berdasarkan penelitian sebelumnya, khamir ini merupakan penghasil xilitol terbaik dibandingkan dengan khamir jenis lain (Riki; 2008). 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 D-glukosa, sukrosa, D-xilosa, dan L-arabinosa. Khamir ini mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37°C.

2.7 Enzim

2.7.1 Pengertian Enzim

Enzim merupakan molekul biopolimer yang berupa protein. Adakalanya enzim memerlukan komponen non protein yang disebut kofaktor. Kofaktor berupa ion logam misalnya Mg^{2+} , Fe^{2+} , dan Zn^{2+} atau molekul organik lain yang disebut koenzim (Hudiyono; 2004).

Gabungan antara bagian protein enzim (apoenzim) dan kofaktor dinamakan holoenzim. Enzim memiliki aktivitas biokimia sebagai katalis yang memegang peranan penting dalam berbagai reaksi dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel. Setiap enzim memiliki daerah sisi ikatan yang dinamakan sisi aktif. Di dalam sisi aktif ini terdapat sisi ikatan yang memungkinkan substrat mempunyai orientasi tetap membentuk ikatan kompleks enzim-substrat, dan sisi katalitik yang memungkinkan terjadinya reaksi yang dikatalisis. Reaksi yang dikatalisis enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu, suhu, pH, konsentrasi substrat, produk, serta keberadaan inhibitor.

Karena tersusun dari protein, maka enzim sangat rentan terhadap kondisi lingkungan. Kondisi pH dan temperatur yang optimum akan mendukung enzim dalam melakukan katalisasi suatu reaksi.

Berdasarkan tempat digunakannya, enzim terdiri atas dua tipe yaitu enzim intraseluler atau endoenzim yang aktivitasnya di dalam sel dan eksoenzim yang aktivitasnya di luar sel. Fungsi utama endoenzim adalah mensintesis bahan seluler dan juga menguraikan nutrien untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan oleh sel. Sedangkan fungsi utama dari eksoenzim adalah melangsungkan terjadinya perubahan tertentu pada nutrien yang ada di sekitarnya, sehingga memungkinkan untuk dapat masuk ke dalam sel. Eksoenzim ini sangat penting dalam proses pencernaan makanan agar mudah

diserap oleh sel. Biasanya eksoenzim bekerja dalam rangka proses hidrolisis (Timotius; 1982).

Enzim berdasarkan proses pembentukannya digolongkan dalam enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang dibentuk terus menerus oleh sel tanpa peduli apakah substratnya ada atau tidak. Biasanya dibentuk terus dalam jumlah tetap. Enzim yang berperan dalam proses bioenergi biasanya merupakan enzim konstitutif, misalnya enzim-enzim yang berperan dalam siklus Krebs. Enzim induktif (enzim adaptif), ialah enzim yang dibentuk karena adanya rangsangan substrat atau senyawa tertentu yang lain.

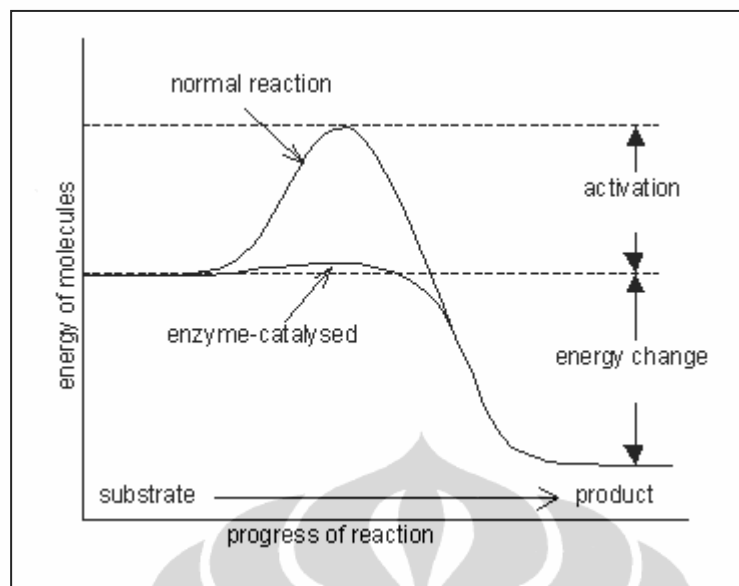
2.7.2 Cara Kerja Enzim

Berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisi, enzim diklasifikasikan dalam enam kelompok, yaitu oksireduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase. Tiap enzim memiliki sisi aktif dan sisi ikatan yang berbeda. Pada permukaan sisi aktif terdapat residu asam amino yang dapat berikatan dengan substrat sehingga enzim memiliki sifat selektif dan spesifik. Emil Fischer (1894) merumuskan bahwa sisi aktif enzim merupakan komplementer dari substratnya seperti gembok dan kuncinya yang dikenal dengan teori *lock and key*. Reaksi enzimatik secara sederhana dapat dituliskan sebagai berikut:



dimana E, S, dan P adalah enzim, substrat, dan produk sedangkan ES dan EP adalah keadaan transisi kompleks enzim dengan substrat dan produk (Lehninger; 2004).

Dengan adanya enzim, energi yang dibutuhkan untuk mencapai keadaan transisi (energi aktivasi) menjadi lebih kecil sehingga reaksi berlangsung lebih cepat. Kerja enzim dipengaruhi antara lain oleh pH, temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim serta inhibitor.



Gambar 2.12. Skema perbandingan energi aktivasi reaksi tanpa dan dengan enzim

[Sumber : <http://click4biology.info/c4b/6/hum6.1.htm>,]

Struktur dan fungsi enzim dipengaruhi oleh interaksi non kovalen yang terdiri atas ikatan hidrogen, ikatan ionik, interaksi Van der Waals, dan interaksi hidrofobik. Walaupun masing-masing interaksi tersebut bersifat lemah namun akumulasi dari keempat jenis interaksi lemah ini memberikan kontribusi yang signifikan terhadap kestabilan struktur tiga dimensi dan aktivitas katalitik enzim (Lehninger; 2004).

2.8 Substrat dan Kosubstrat

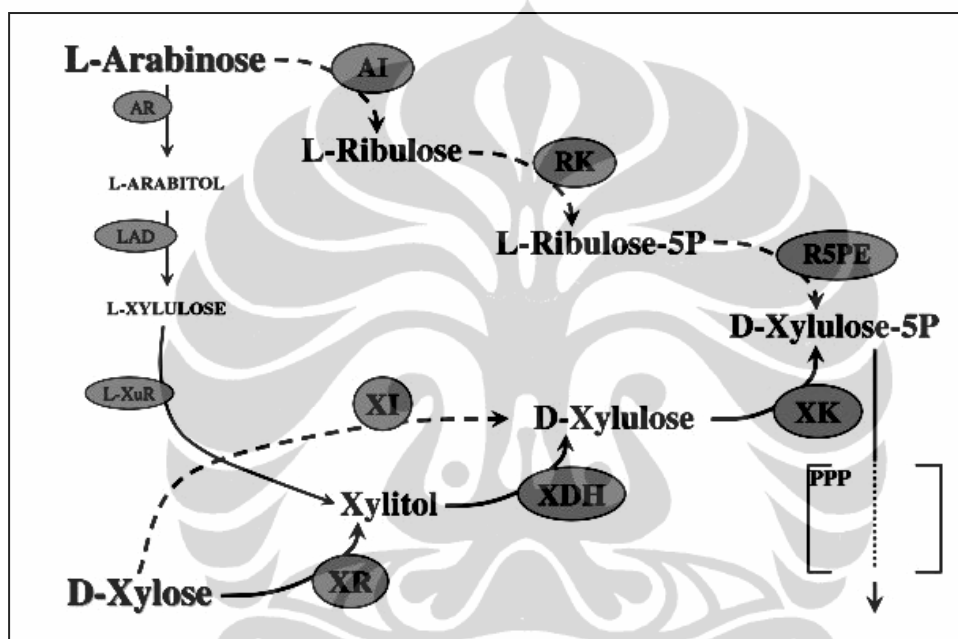
2.8.1 Pengertian Substrat dan Kosubstrat

Substrat adalah molekul organik yang telah berada dalam kondisi siap/segera bereaksi, karena telah mengandung promotor. Keberadaan katalis akan mempercepat reaksi substrat menuju molekul produk, melalui reaksi kimiawi dengan energi aktivasi rendah yang membentuk senyawa antara. Walaupun demikian, tanpa katalis, sebuah substrat akan bereaksi menuju sebuah produk, segera setelah energi aktivasi reaksi kimia yang diarahkan oleh suatu promotor tercapai. Sedangkan kosubstrat adalah molekul organik yang ditambahkan dalam

substrat untuk mempertinggi produk reaksi enzimatik
(<http://wapedia.mobi/id/Substrat>).

2.8.2 Arabinosa Sebagai Kosubstrat

Arabinosa yang ditambahkan pada perubahan xilosa menjadi xilitol dalam khamir, akan memasuki pathway sebagai berikut:



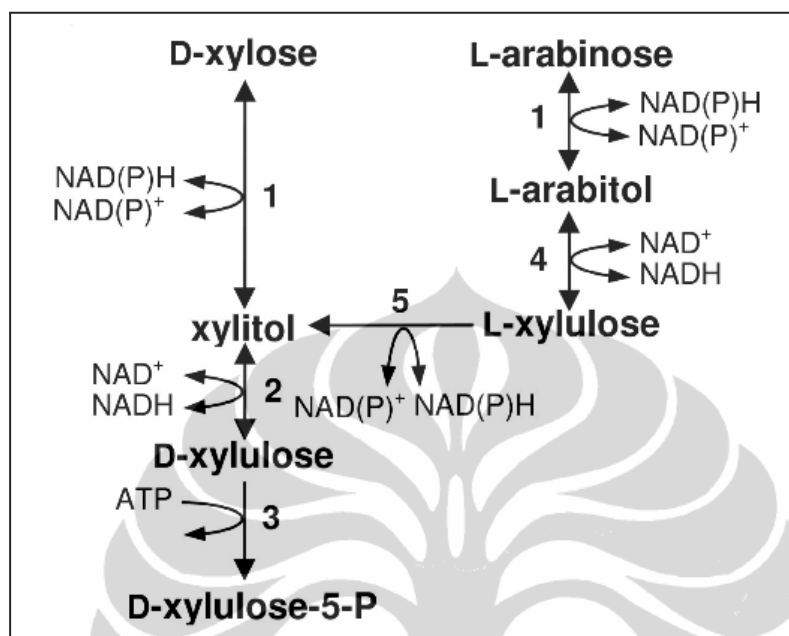
Gambar 2.13 Pathway L-arabinosa dan D-xilosa ke pentosa phosfat pathway (PPP) dalam metabolisme khamir

[Sumber: Bettiga *et al*; 2008]

Karena sel mendapatkan sumber karbon lain yaitu dari L-arabinosa, maka diharapkan xilitol yang terbentuk dari xilosa oleh enzim xilosa reduktase tidak dimetabolisme lebih lanjut oleh sel, sehingga akan terakumulasi yang berarti adanya L-arabinosa akan menaikkan konversi xilosa menjadi xilitol.

L-arabinosa juga bisa diubah menjadi xilitol oleh khamir dengan menggunakan tiga macam enzim yaitu: L-arabinosa isomerase yang mengkonversi L-arabinosa menjadi L-ribulosa, D-psicose 3-epimerase yang mengubah L-ribulosa menjadi L-xilulosa dan L-xilulosa reduktase yang

mereduksi L-xilulosa menjadi xilitol (Sakakibara; 2009). Usulan lain jalur metabolisme L-arabinosa pada khamir dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.14 Pathway L-arabinosa menjadi xilitol dalam fungi

1:aldose reduktase; 2:xilitol dehidrogenase; 3:xilulosa kinase; 4:L-arabitol-4-dehidrogenase; dan 5: L-xilulosa reduktase

[Sumber: Petschacher and Nidetzsky; 2008]

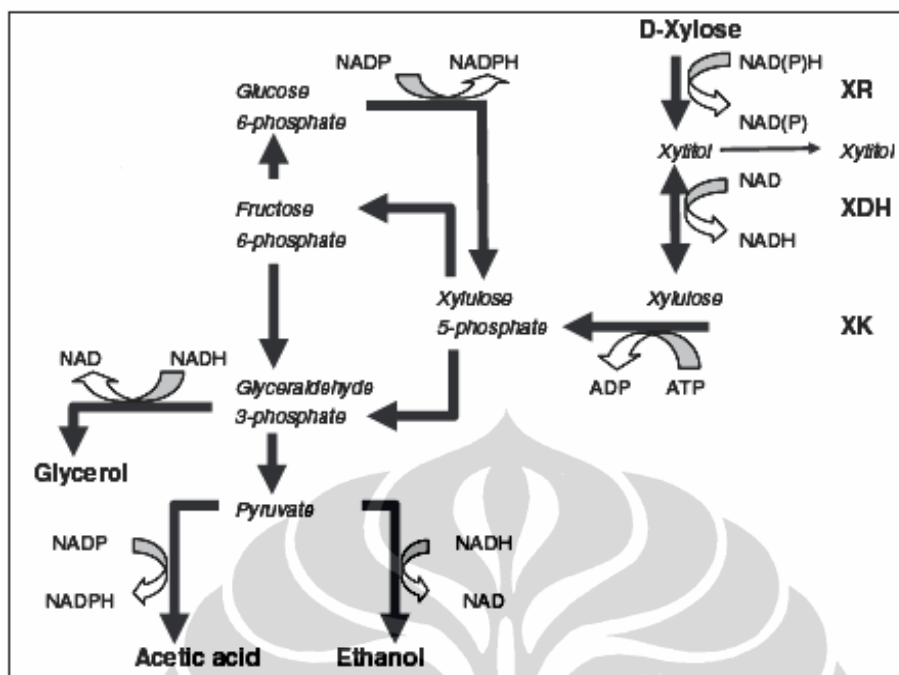
2.9 Metabolisme Xilosa

Mekanisme xilosa menjadi xilitol melibatkan khamir dari genus *Candida*. Dalam hal ini xilosa akan masuk ke dalam jalur metabolisme *Candida* yang selanjutnya akan diubah menjadi xilitol. Jalur katabolisme D-xilosa melibatkan tiga buah enzim, yaitu xilosa reduktase (XR), xilitol dehidrogenase (XDH), dan xilulokinase (XK). Pertama, D-xilosa direduksi menjadi xilitol oleh enzim XR, xilitol yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi D-xilulosa oleh XDH. Kemudian D-xilulosa ini difosforilasi menjadi xilulosa-5-phosfat oleh XK yang akan masuk ke jalur Pentosa Phosfat Pathway (PPP). Jalur ini menggunakan energi berupa ATP. Xilosa reduktase memerlukan kofaktor NADH maupun NADPH tetapi xilitol dehidrogenase bergantung pada NAD

(Karhuma *et al*; 2007). Enzim xilulokinase memerlukan ATP sebagai kofaktornya.

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktifitas enzim xilosa reduktase dan xilitol dehidrogenase. Konsentrasi xilosa yang rendah akan menyebabkan produksi enzim tidak optimal, sebaliknya konsentrasi xilosa yang tinggi akan mengganggu karena akan menyebabkan sel mengalami kerusakan berkaitan dengan perbedaan tekanan osmotik yang terjadi. Untuk meningkatkan produksi xilitol dapat dilakukan dengan menambahkan glukosa atau gula lain pada fermentasi hidrolisat (Oh and Kim; 1998). Penambahan ini bertujuan agar sel khamir dapat tumbuh dengan dihasilkannya ATP dari proses glikolisis, sehingga xilosa dapat terkonsentrasi menjadi xilitol oleh enzim xilosa reduktase.

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 anaerobik. Oksigen mempunyai peranan penting untuk menghasilkan xilitol dari xilosa apabila menggunakan khamir dari golongan *Candida*. Pada kondisi oksigen terbatas, jalur oksidatif fosforilasi tidak dapat mengoksidasi kembali NADH yang terbentuk, sehingga konsentrasi NADH di dalam sel meningkat. Tingginya konsentrasi NADH dalam sel menaikkan aktivitas enzim xilosa reduktase dan menyebabkan akumulasi xilitol.



Gambar 2.15 Jalur metabolisme xilosa oleh khamir

[Sumber: Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:277–281]

Berdasar 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 oleh enzim alkohol dehidrogenase.

2.10 Sejarah Perkembangan Pembuatan Xilitol Secara Bioteknologi

Pada awalnya, proses pembentukan xilitol oleh khamir diusulkan dengan menggunakan glukosa sebagai bahan baku, karena harga yang murah dan mudah untuk didapatkan. Jalur metabolisme yang pertama kali diusulkan adalah glukosa diubah menjadi D-arabitol, kemudian membentuk D-xilulosa, dan akhirnya xilulosa direduksi menjadi xilitol. Pembentukan xilitol dari glukosa ini terdiri dari beberapa tahapan reaksi yang lebih panjang dibandingkan dengan pembentukan xilitol dari D-xilosa, sehingga jalur metabolisme ini menjadi kurang diminati, disamping rendemen xilitol yang dihasilkan juga lebih rendah yakni sebesar 11,6% dari 77,5 g glukosa yang dikonsumsi (Granstrom *et al*; 2007).

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan D-xilosa sebagai bahan baku dan didapatkan informasi bahwa aktivitas enzim xilosa reduktase berperan dalam pembentukan xilitol (Girio *et al*; 1989). Pada tahun 1998 dilakukan penelitian untuk menaikkan rendemen xilitol yang didapatkan dengan menambahkan glukosa sebagai kosubstrat. Dari penelitian tersebut, didapatkan kenaikan rendemen xilitol menjadi 93% dengan menggunakan xilosa dan glukosa dengan perbandingan glukosa : xilosa 15% untuk *Candida tropicalis*, dibandingkan dengan rendemen xilitol saat menggunakan xilosa sebesar 82% (Oh and Kim; 1998). Penambahan glukosa dapat menaikkan rendemen xilitol hingga konsentrasi tertentu. Penambahan glukosa diatas 10 g/L menunjukkan inhibisi terhadap aktivitas enzim xilosa reduktase sehingga xilitol yang dihasilkan berkurang. Inhibisi ini terjadi dengan dihasilkannya etanol sebagai metabolit samping.

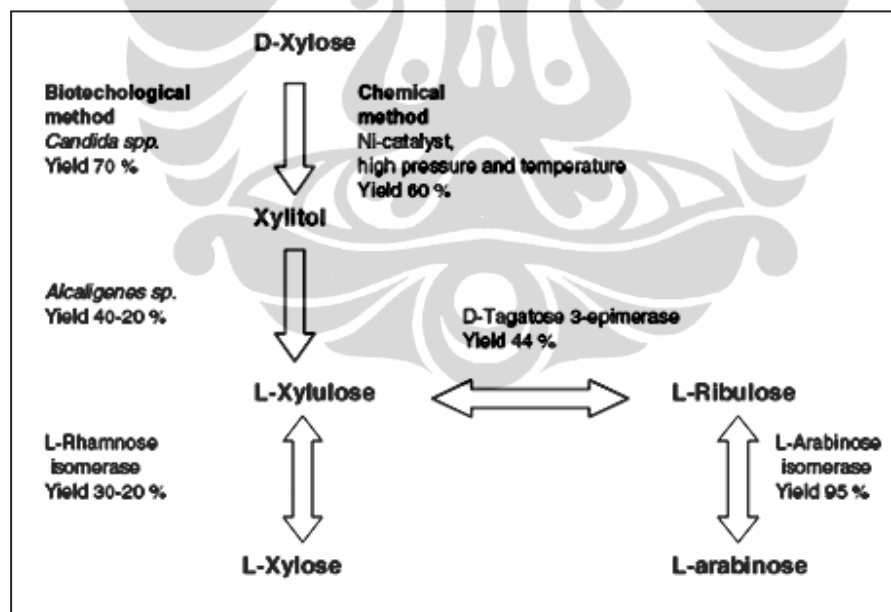
Penelitian berkembang kepada mutasi gen penyandi enzim kunci dalam fermentasi xilosa yakni xilitol dehidrogenase yang mengkatalisis oksidasi xilitol menjadi xilulosa pada *Candida tropicalis*. Adanya mutasi pada gen penyandi xilitol dehidrogenase menyebabkan penggunaan xilosa sebagai sumber energi tidak mungkin terjadi. Hal ini dapat terjadi karena tanpa adanya enzim xilitol dehidrogenase, xilosa yang telah direduksi menjadi xilitol, tidak dapat dioksidasi menjadi xilulosa, sehingga tidak dapat masuk ke jalur glikolisis untuk pembentukan ATP sebagai sumber energi bagi sel. Oleh karena itu, xilosa hanya digunakan sebagai penghasil xilitol tanpa digunakan oleh sel sebagai sumber energi, sehingga perlu ditambahkan sumber karbon lain, seperti glukosa. Metode ini akan menghasilkan rendemen 98% dari 50 g/L xilosa dan 10 g/L glukosa sebagai kosubstrat.

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

2.11 Prospek Diversifikasi Pemanfaatan Xilitol

Perkembangan penelitian tentang proses pembuatan xilitol dan aplikasinya dalam dunia industri, menyebabkan harga xilitol menjadi relatif murah. Hal ini menyebabkan xilitol berpotensi untuk digunakan sebagai substrat atau bahan baku untuk pembuatan gula jenis lain seperti L-licosa, L-xilosa, atau L-arabinosa melalui proses biokonversi.

Dalam skema pembentukannya, xilitol dioksidasi menjadi L-xilulosa oleh enzim xilitol dehidrogenase, selanjutnya oleh L-ramnosa isomerase, L-xilulosa diubah menjadi L-lixosa atau L-xilosa. L-ramnosa isomerase diketahui mampu mengkatalisis isomerisasi L-ramnosa dan L-ramnulosa, L-mannosa dan L-fruktosa, L-talosa dan L-tagatosa, yang juga aktif pada L-xilulosa (Granström *et al*; 2007), akibatnya L-xilulosa dapat dikonversi menjadi L-ribulosa oleh enzim D-tagatosa 3- epimerase, untuk kemudian menjadi L-arabinosa oleh enzim L-arabinosa isomerase.



Gambar 2.16 Konversi enzimatik xilitol menjadi gula jenis lain

[Sumber: Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:273–276]

Gula pentaketulosa seperti L-xilulosa dan L-ribulosa dapat digunakan sebagai prekursor untuk sejumlah perubahan ke bentuk aldosa, ketopentosa atau pentitol. Gula-gula keto seperti L-xilulosa dan L-ribulosa memiliki prospek untuk

digunakan sebagai substrat pembuatan gula-gula lain yang dapat digunakan sebagai substrat obat anti viral di masa depan.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi, Alat dan Bahan Kimia

3.1.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Kimia Organik dan Biokimia Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia dan Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI. Selain itu untuk identifikasi tumbuhan dilaksanakan di Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong (Herbarium Bogoriense).

3.1.2 Alat-alat yang Digunakan

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

Instrumen yang digunakan adalah: blower, blender, disk mill, soxlet, autoklave, alat *sentrifuge*, timbangan analisis, penyaring vakum, alat *degassing*, *heating* mantel, penangas air, shaker, penyaring milipor, syringe, HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, dan detektor Refraktif Indeks (RID-10 A), pompa LC-20AB, indikator pH stik.

3.1.3 Bahan-Bahan Kimia yang Digunakan

Glukosa, xilosa, arabinosa, natrium hidroksida, asam sulfat, kalium permanganat, aquades, aquabides, ekstrak khamir, ammonium sulfat, magnesium sulfat, kalium dihidrogen fosfat, glukosa, pepton, malt-ekstrak, agar-agar, aquabides, alkohol 70%, karbon aktif, kertas saring, resin penukar kation dan anion, filter membran nitroselulosa nitrat 0,45 μm .

3.1.4 Sampel Penelitian

Sampel malai dan tangkai sorgum ZH-30 didapat dari SEAMEO BIOTROP Tajur Bogor. Sorgum ZH-30 merupakan jenis galur sorgum sereal hasil pemuliaan dengan radiasi sinar gamma oleh PATIR BATAN .

3.1.5 Mikroorganisme yang Digunakan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah khamir isolat murni *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Centre) Departemen Biologi, Universitas Indonesia. Khamir tersebut diisolasi dari serasah Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pembuatan Sampel

Tangkai dan malai sorgum kering dicuci untuk menghilangkan kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan dengan blower atau oven dan dipotong kecil-kecil sebelum digiling halus. Hasil penggilingan ini disaring lagi agar didapat serbuk yang lebih halus dan homogen. Sampel serbuk halus sorgum ini digunakan untuk pengujian selanjutnya.

3.2.2 Dewax Sampel

Pada sampel serbuk sorgum dilakukan dewax dengan cara ekstraksi oleh pelarut yang merupakan campuran *n*-hexane-etanol (2:1, v/v) selama 6,5 jam dengan menggunakan soxlet (Sun *et al*; 2003). Serbuk sampel dibungkus rapat dengan kertas saring yang dijahit membentuk tabung, dan sebelumnya diberi alas kapas untuk mencegah kebocoran material. Sampel terbungkus kemudian dimasukkan dalam soklet, disiram dengan pelarut sampai terendam, dan dibiarkan sampai pelarutnya turun ke dalam labu didih, pelarut ditambahkan sampai labu didih berisi pelarut kira-kira setengahnya. Pada labu didih ditambahkan sedikit batu didih untuk menghindari letupan (bumping) pada saat proses pemanasan. Batu didih juga berguna untuk meratakan panas pada seluruh

bagian larutan. Setelah itu kondensor dipasang dan mengaktifkan pemanas serta pompa pengisap air. Pemanas dipasang dengan suhu sedikit di atas titik didih pelarutnya yaitu 80°C. Setelah enam setengah jam endapan yang dihasilkan diangin-anginkan selama 12 jam agar semua *n*-hexan dan etanol yang masih menempel pada sampel menguap .

3.2.3 Delignifikasi

Delignifikasi merupakan proses pemecahan ikatan yang terjadi antara hemiselulosa dengan lignin yang terdapat dalam struktur lignoselulosa. Proses delignifikasi dilakukan dengan melarutkan sampel ke dalam larutan NaOH 1% dengan perbandingan 1:25, g/v, dan dipanaskan pada suhu 55°C selama 90 menit. Residu diambil dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring, dan selanjutnya dinetralsisir melalui pembilasan dengan aquades .

3.2.4 Pembuatan Larutan Standar

3.2.4.1 Larutan Standar Xilosa

Larutan induk xilosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 50 mg xilosa kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 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. Larutan induk xilosa 1000 ppm dipipet sebanyak 2,5; 5; 12,5; dan 25 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. 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 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 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 50; 100; 250; 500 dan 1000 ppm. Dari hasil kromatogram larutan-larutan ini juga dibuat persamaan regresi larutan xilitol.

3.2.4.3 Larutan Standar Glukosa

Larutan 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 juga diukur waktu retensinya dengan HPLC.

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 aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya juga diukur waktu retensinya dengan HPLC.

3.2.5 Pembuatan Hidrolisat

Serbuk sampel sorgum sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 30 mL larutan H_2SO_4 0,3 M. Kemudian sampel ditutup dengan sumbat kapas dan dimasukkan ke dalam autoclave untuk dihidrolisis selama 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 menit pada suhu $250^\circ F$ ($121^\circ C$). 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 putar 3000 rpm. Hasil netralisasi ditempatkan dalam labu ukur yang mendekati volume larutannya, kemudian ditambahkan air sampai batas volume labu ukur.

Pada supernatan yang terbentuk ditambahkan 1% karbon aktif, dan dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 50⁰C selama 10 menit kemudian disaring dengan kertas saring dobel.

Untuk pengujian kadar xilosa dalam hidrolisat, filtrat yang didapatkan dari hasil sentrifugasi, ditambahkan dengan resin penukar kation dan anion terlebih dahulu. Setelah itu, disaring dengan menggunakan membran nitroselulosa dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dengan menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, yang merupakan kolom penukar kation. Kolom ini terdiri dari kalsium dengan kopolimer stiren divinilbenzena.

3.2.6 Sterilisasi Alat

Semua alat-alat gelas yang digunakan untuk proses fermentasi disterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 160⁰C selama 2 jam. Sedangkan alat plastik dan media yang akan digunakan dilakukan sterilisasi basah dengan menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Sebelum disterilkan alat-alat gelas harus dibungkus terlebih dahulu dengan kertas, makin tebal kertas yang digunakan untuk membungkus, maka makin lama pula waktu sterilisasi yang diperlukan. Ujung pipet yang akan disterilisasi harus disumbat terlebih dahulu dengan sedikit kapas, untuk selanjutnya pipet dibungkus kertas.

3.2.7 Penyiapan Inokulum

Dalam proses ini digunakan sel mikroorganisme berupa khamir isolat murni dari species *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Center) .

Medium agar yang digunakan untuk pertumbuhan *Candida* adalah medium YMA agar miring dengan komposisi glukosa 10 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L, pepton 5 g/L dan agar 20 g/L. Medium agar dimasak sampai larutan berwarna jernih, kemudian dituang masing-masing 5 mL ke dalam 10 tabung reaksi, medium sisa dituangkan ke dalam erlenmeyer, kemudian

masing-masing ditutup rapat dengan kapas, dan disterilisasi dalam autoclave. Dalam keadaan masih panas, tabung dimiringkan dan dibiarkan sampai dingin. Setelah beku, tabung diletakkan dengan posisi terbalik agar uap air tak membasahi permukaan agar.

Khamir isolat murni yang didapat diinokulasi dalam YMA agar miring dengan cara: secara aseptik, *Candida* dari UICC yang berada dalam agar miring dipindahkan dengan menggesekkan jarum ose sebanyak satu kali, dan digoreskan secara zig-zag ke dalam permukaan medium agar miring yang telah disiapkan. Dengan cara sama proses ini dilakukan pada medium agar miring berikutnya.

Agar miring yang telah digores tadi diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 2 hari. Setelah hari kedua, kepada biakan dalam agar miring dilakukan pengamatan. *Candida* yang tumbuh pada agar miring siap untuk digunakan.

3.2.8 Perhitungan Jumlah Sel Khamir dengan Kamar Hitung

Ke dalam 50 mL air steril secara aseptik ditambahkan 20 lup *Candida fukuyamaensis* dari hasil inokulasi agar miring, kemudian dikocok dengan vorstek supaya terbentuk suspensi khamir. Secara aseptik 1 mL suspensi khamir diambil dengan pipet ukur dan ditambahkan pada 4 mL air steril, kemudian dikocok dengan vorstek agar homogen, ini merupakan pengenceran 5 kali suspensi khamir.

Pada penentuan ini, setetes suspensi ditaruh dalam kamar hitung (counting chamber) tipe Neubauer, dan jumlah sel dapat ditentukan secara langsung dengan bantuan mikroskop. Jika dari hasil penghitungan dalam kotak kecil yang berukuran 0,02 cm x 0,02 cm jumlah sel khamir lebih dari 300, maka perlu dilakukan pengenceran. Hasil yang didapat dikalikan dengan faktor pengenceran. Jumlah total sel dihitung per mL suatu suspensi. Alat kamar hitung ini terbuat dari gelas dengan permukaan bagian atas terukir kotak bujur sangkar yang terbagi dalam petak-petak kecil. Kedalaman petak 0,1 mm.

3.2.9 Pembuatan Media Starter

Candida hasil inkubasi dipindahkan dalam media starter yang berisi larutan xilosa 2000 ppm dan nutrisi lain berupa larutan buffer yang terdiri dari KH_2PO_4

5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L dan yeast ekstrak 2 g/L, dan pHnya diatur sekitar 6.

Media starter dibuat dengan cara menimbang 200 mg xilosa dan dilarutkan dalam 50 mL aquades, serta menimbang 0,2 g yeast ekstrak; 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g KH_2PO_4 ; dan 0,04 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, dan dilarutkan dalam 50 mL aquades. Ke duanya disterilisasi dalam autoclave seperti cara sebelumnya. Secara aseptik ke duanya dicampur, kemudian ditambahkan 4 mL suspensi khamir, ditutup seperti cara sebelumnya, dan diletakkan dalam shaker selama 48 jam pada suhu 30°C , dengan goncangan 110 rpm. Media starter ini selanjutnya digunakan sebagai sumber khamir pada proses fermentasi.

3.2.10 Fermentasi

Hidrolisis 1 g sampel dengan 30 ml H_2SO_4 0,3 M seperti cara sebelumnya. Setelah disaring dan dinetralkan dengan larutan NaOH 0,5 M, filtrat didetoksifikasi dengan 1% g/v karbon aktif, dipanaskan pada suhu 50°C selama 10 menit, kemudian disaring dengan kertas saring rangkap.

Media fermentasi dibuat seperti cara pada pembuatan media starter tetapi larutan xilosa diganti dengan hidrolisat, dengan media starter sebagai sumber khamir.

Sampel hasil fermentasi diambil setiap 12 jam sebanyak lima kali pengambilan. Hasil fermentasi per 12 jam selanjutnya diukur dengan HPLC, dengan beberapa perlakuan sebelumnya, yaitu; khamir dalam sampel dimatikan dengan cara memanaskannya pada suhu 80°C selama 10 menit, disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian supernatannya diambil dengan cara dekantasi. Supernatan yang diperoleh diberi resin penukar kation, dikocok dan dibiarkan lebih kurang 15 menit. Setelah pH berubah asam,

dekantasi dan filtratnya ditambahkan resin penukar anion dengan cara seperti sebelumnya, sampai pHnya netral, baru kemudian dilakukan uji HPLC.

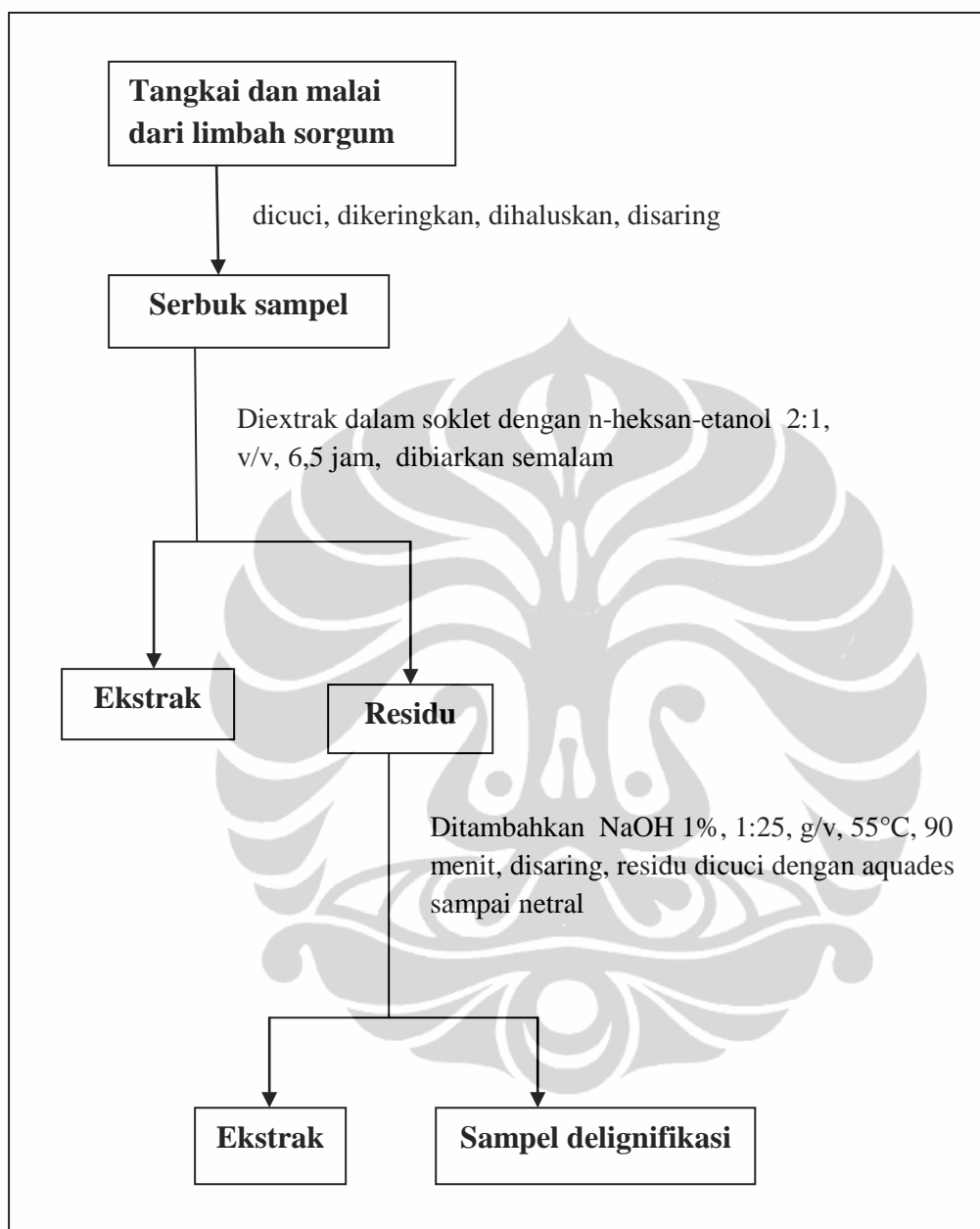
3.2.11 Variasi Kondisi

Variasi kondisi yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari: variasi jenis sampel yang digunakan yaitu tangkai dan malai; variasi waktu hidrolisis untuk mendapatkan kondisi optimum; serta variasi penambahan kosubstrat D(-) arabinosa sebesar 0%; 7,5%; dan 15% dari kadar xilosa dengan waktu pengambilan sampel hasil fermentasi setiap 6 jam.

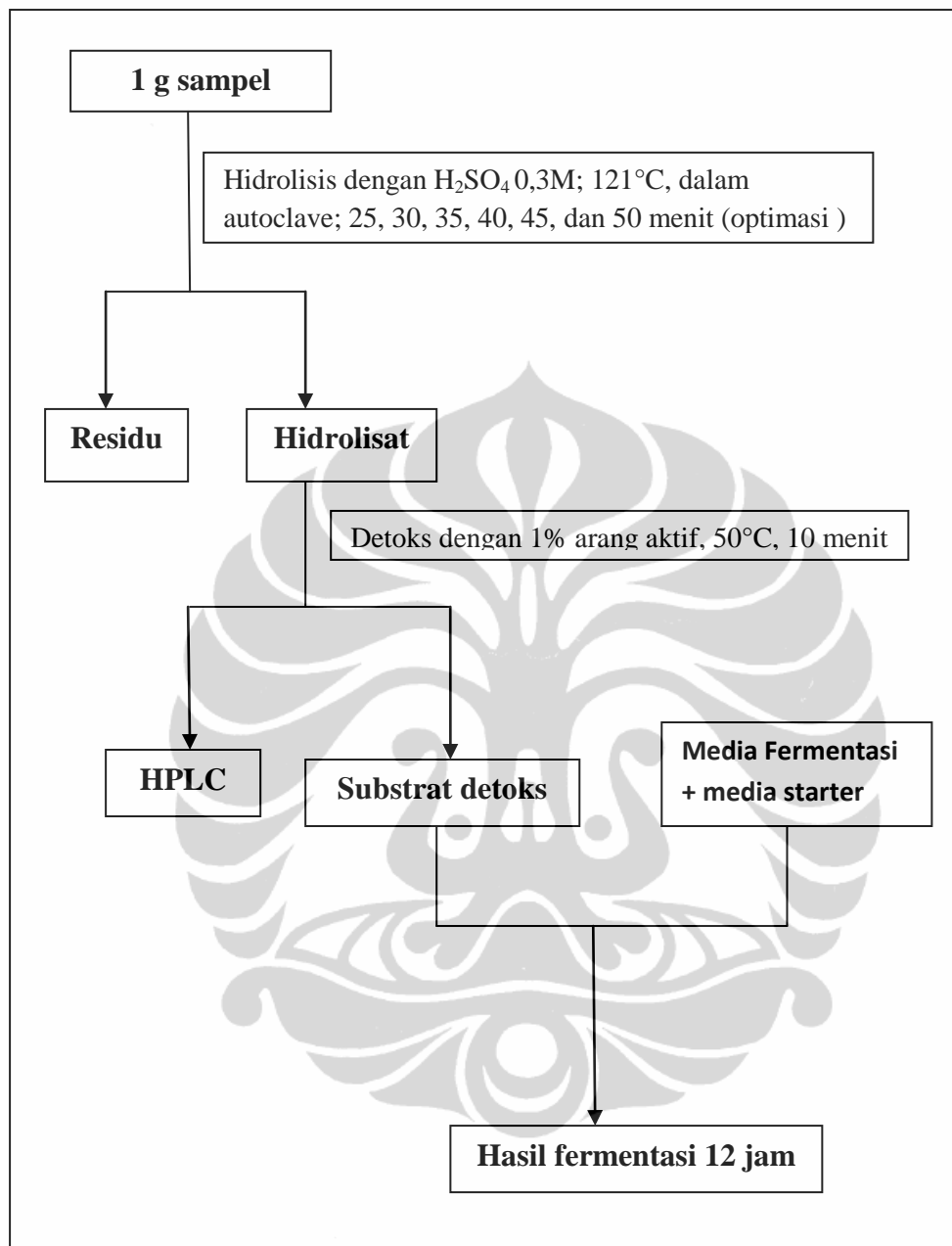
3.2.12 Analisis Produk dengan HPLC

Pada uji HPLC ini, sebanyak 20 μ L supernatan hasil fermentasi disuntikkan ke instrumen HPLC, dan hasilnya diamati dengan cara membandingkan waktu retensi dan luas area sampel dengan waktu retensi dan luas area larutan standar. Pengukuran dengan HPLC menggunakan kolom Shimpack SCR- 101C untuk karbohidrat, dengan detektor Refraktif Indeks (RID-10A), laju alir 1 mL/menit, dan suhu kolom 80°C.

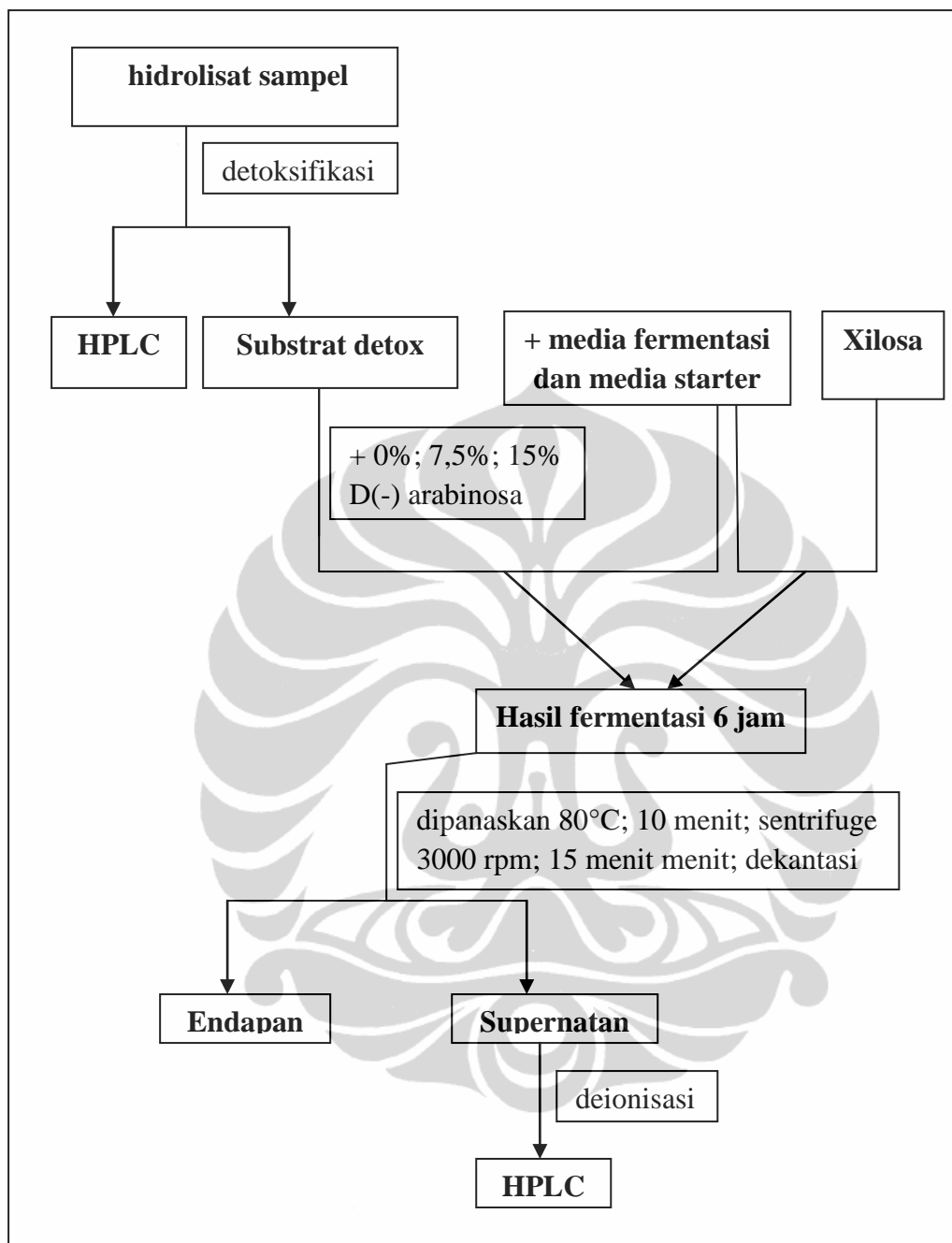
Bagan Kerja Penelitian



Gambar 3.1 Bagan kerja delignifikasi



Gambar 3.2 Bagan kerja fermentasi per 12 jam



Gambar 3.3 Bagan kerja fermentasi per 6 jam dengan variasi penambahan D(-) arabinosa.

BAB IV

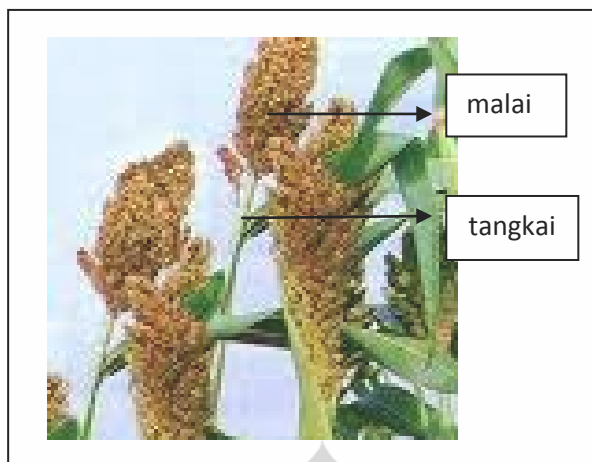
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan memanfaatkan limbah pertanian sorgum untuk dijadikan bahan baku pada pembuatan xilitol, dengan cara mengambil xilosa yang terkandung di dalamnya. Xilosa diperoleh dengan cara menghidrolisis hemiselulosa menggunakan katalis asam sulfat kemudian difermentasi dengan menggunakan khamir penghasil enzim xilosa reduktase yang akan mereduksi xilosa menjadi xilitol. Mikroorganisme yang digunakan untuk proses fermentasi ini adalah khamir dari species *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 yang merupakan khamir penghasil xilosa reduktase (XR). Khamir species ini dipilih karena menghasilkan xilitol dengan kadar paling tinggi berdasar penelitian sebelumnya. Spesies *Candida* ini diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia Culture Centre), Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia.

4.1 Sampling Tangkai dan Malai Sorgum

Sorgum yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Sorghum bicolor* ZH-30. Tanaman ini merupakan salah satu galur hasil pemuliaan yang dilakukan oleh PATIR BATAN. Sampel tanaman diperoleh dari SEAMEO BIOTROP Tajur Bogor sebagai partner kerjasama PATIR BATAN dalam pengembangan tanaman sorgum di Indonesia.

Tangkai sorgum adalah bagian dari batang tanaman sorgum dari pangkal daun teratas sampai yang mengandung biji, sedang malai adalah kelopak pada biji sorgum.



Gambar 4.1 Tangkai dan malai sorgum

[Sumber: <http://www.backyardgardener.com/seeds/product08/7332.html>]

4.2 Pembuatan Sampel

Sampel yang diperoleh dari *Service Laboratory* SEAMEO BIOTROP merupakan sampel yang sudah kering, dipisahkan antara malai dan tangkainya, kemudian masing-masing dicuci bersih dan dikeringkan dengan blower atau oven. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan debu atau jamur yang mungkin terkandung pada sampel. Pengeringan dengan blower membutuhkan waktu 2 jam untuk tangkai dan 7 jam untuk malai. Pengeringan dengan oven dilakukan pada suhu 60°C , karena pada suhu ini sampel dapat kering tanpa merusak struktur karbohidratnya. Masing-masing tangkai dan malai dipotong-potong kecil siap untuk dihaluskan. Penghalusan sampel dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia LIPI Serpong. Penghalusan dilakukan untuk memperbesar luas permukaan sehingga mempermudah proses hidrolisis, karena semakin besar luas permukaan maka akan semakin besar kontak antara sampel dengan asam. Setelah proses penghalusan di LIPI, sampel masih perlu disaring dengan penyaring tepung agar ukurannya menjadi lebih homogen.



Gambar 4.2 Alat giling dan hasil penggilingan

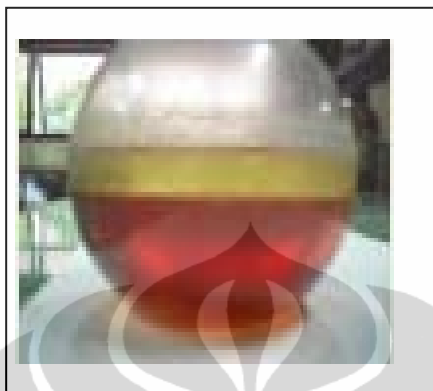
4.3 Dewax Sampel

Xilosa sebagai substrat pada pembuatan xilitol diambil dari lignoselulosa melalui tahap pengolahan awal sebelum proses hidrolisis hemiselulosa yang mengandung rantai xilan. Bahan-bahan lignoselulosa umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin. Adanya senyawa pelindung lignin inilah yang menyebabkan bahan-bahan lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis (Iranmahboob *et al*; 2002). Oleh sebab itu proses pengolahan awal yang berupa dewax dan delignifikasi merupakan tahapan proses yang sangat penting karena dapat mempengaruhi rendemen xilosa hasil hidrolisis. Proses pengolahan awal dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur maupun ukuran.

Sebelum dihidrolisis untuk memperoleh xilosa, pada sampel dilakukan dewax dan delignifikasi. Proses dewax atau penghilangan lilin dilakukan dalam soklet menggunakan campuran *n*-hexan dan etanol dengan perbandingan 2:1 v/v selama 6,5 jam pada suhu sedikit di atas titik didih pelarutnya yaitu 69°C untuk *n*-hexan dan 78,4°C untuk etanol. Pada proses ekstraksi digunakan campuran *n*-hexan-etanol karena campuran tersebut memiliki kepolaran yang hampir sama dengan lemak, minyak, dan lilin, sehingga zat-zat tersebut dapat terlepas dari lignoselulosa sorgum dan larut dalam campuran *n*-hexan-etanol. Titik didih *n*-hexan dan etanol yang tidak tinggi dan hampir sama menyebabkan mudah dihilangkan dari sampel cukup dengan dibiarkan semalam.

Setelah proses dewax pelarut dalam labu didih warnanya menjadi kuning keruh dibagian atas yang merupakan pelarut etanol dan merah coklat dibagian bawah yang merupakan pelarut *n*-hexane. Perubahan warna pelarut

setelah proses dewax menunjukkan adanya komponen-komponen sampel yang terlarut. Komponen-komponen ini disebut dengan senyawa ekstraktif.



Gambar 4.3 Filtrat hasil proses dewax

Senyawa ekstraktif kayu meliputi sejumlah besar senyawa-senyawa yang berbeda yang dapat diekstraksi dari kayu dengan menggunakan pelarut polar dan non polar. Senyawa ekstraktif terdiri atas sebagian besar berupa senyawa-senyawa tunggal tipe lipofil maupun hidrofil, karena itu dapat dipisahkan dengan pelarut *n*-hexan untuk yang tipe lipofil dan pelarut etanol untuk yang tipe hidrofil dari komponen sampel. Senyawa ekstraktif dapat dipandang sebagai komponen lignoselulosa yang tidak struktural, dan hampir seluruhnya terbentuk dari senyawa-senyawa ekstraseluler dengan berat molekul rendah. Lemak dan lilin merupakan ekstraktif yang bersifat lipofil (larut dalam pelarut non polar), sedang senyawa-senyawa turunan fenolik, asam-asam resin dan tannin merupakan ekstratif yang bersifat hidrofil.

Senyawa-senyawa ekstraktif menempati tempat-tempat morfologi tertentu di dalam struktur tanaman, sebagai contoh asam-asam resin terdapat dalam saluran resin, sedangkan lemak dan lilin terdapat dalam sel-sel parenkhim.

4.4 Delignifikasi

Lignin merupakan polimer aromatik yang monomer-monomernya dihubungkan oleh ikata eter (C-O-C) dan ikatan C-C. Lignin tersusun atas tiga jenis monomer, yaitu *p*-coumaryl alkohol (*p*-hidroksifenil propanol), coniferyl

alkohol (guaiacyl propanol), dan sinapyl alkohol (syringyl propanol). Komposisi ke tiga monomer ini dalam lignin berbeda-beda tergantung pada jenis dan bagian tanaman. Pada kayu lunak, coniferyl alkohol merupakan komponen utama. Antar monomer saling berikatan dengan membentuk struktur tiga dimensi yang kokoh.

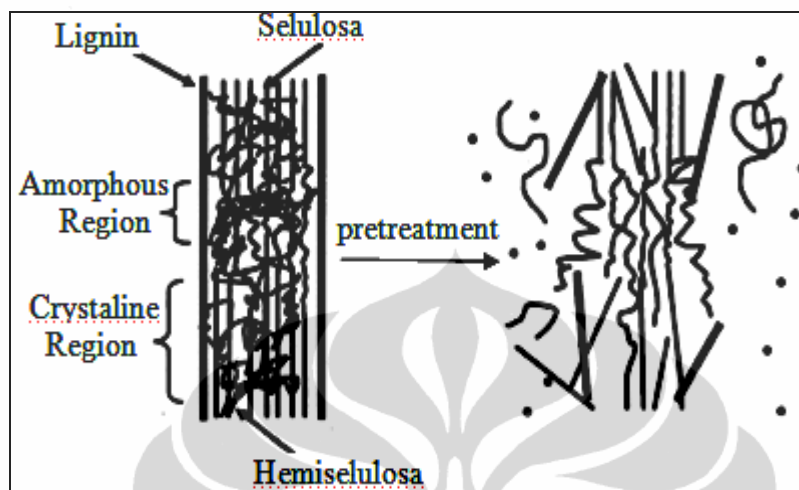
Lignin dan hemiselulosa membentuk polimer kompleks di dalam material tanaman, melalui ikatan ester. Ikatan kovalen lignin-hemiselulosa dapat dibedakan dalam dua tipe yaitu, ikatan ester melalui gugus karboksil terminal dari uronat dengan asam aromatik, atau melalui gugus hidroksil gula (Jeffries; 1994). Monomer rantai samping xilan mengandung unit asam 4-O-metil glukuronat, dan sekitar 40% gugus asam uronat dalam hemiselulosa membentuk ikatan ester dengan lignin.

Ikatan lignin dengan gugus hidroksil gula bisa melalui hidroksil primer dari L-arabinosa (O-5), D-glukosa atau D-mannosa(O-6), atau melalui hidroksil sekunder, seperti O-2 dan O-3 dari xilosa. Beberapa ikatan melalui hidroksil dari glikosida (O-1) (Erikson *et al*; 2004).

Ikatan ester antara lignin dengan hemiselulosa merupakan ikatan yang paling labil, sehingga bisa dipecah oleh basa. Pemberian basa NaOH pada sampel dewax akan menyebabkan rusaknya ikatan ester antara lignin dengan hemiselulosa dalam lignoselulosa membentuk fraksi-fraksi yang lebih sederhana, sehingga hemiselulosa bebas yang terbentuk memiliki rantai yang lebih pendek dan lebih mudah untuk dihidrolisis.

Delignifikasi dengan basa NaOH merupakan upaya untuk memutuskan ikatan lignin dengan hemiselulosa pada sampel yang bisa menghambat pembentukan xilan dari hemiselulosa pada reaksi hidrolisis. Delignifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan larutan alkali (Mosier; 2005). Larutan alkali yang digunakan adalah NaOH 1% dengan perbandingan 1: 25 (w/v) pada suhu 55°C, selama 90 menit, supaya proses delignifikasi berjalan sempurna (Sun *et al*; 1999). Setelah 90 menit tercium aroma sereal, larutan serbuk tangkai dan malai sorgum yang awalnya berwarna kuning bening berubah menjadi coklat tua. Hal ini menunjukkan adanya zat yang terekstrak di dalam larutan ini. Timbulnya

warna coklat pada proses ini, karena terbentuknya monomer lignin yang memiliki ikatan rangkap konyugasi, sehingga dapat menyerap warna.



Gambar 4.4 Pemutusan ikatan pada pemberian basa NaOH

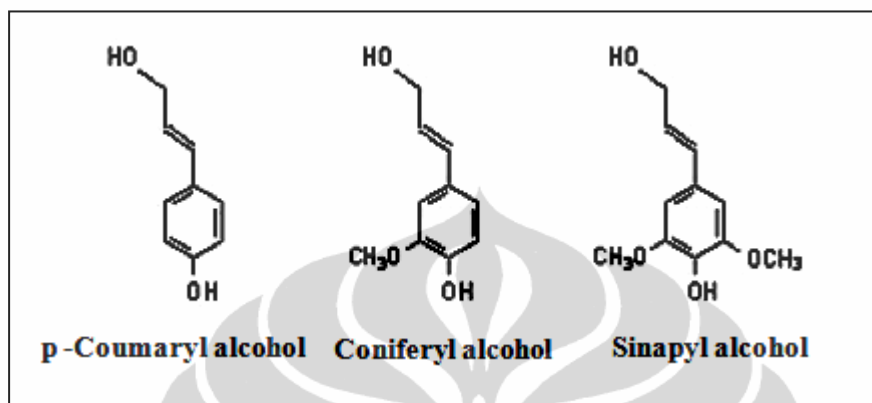
[Sumber: <http://isroi.wordpress.com>]

Pada proses delignifikasi bisa terbentuk monomer phenil propanoid yang merupakan senyawa turunan fenol. Senyawa tersebut akan bersifat racun dan menghambat proses fermentasi karena dapat menginhibisi pertumbuhan khamir sehingga perlu dihilangkan (Palmqvist *et al*; 2000).

Tabel 4.1 Hasil dewax (kiri) dan hasil delignifikasi (kanan)

Sampel	Sebelum(gram)	Sesudah(gram)	Sampel	Sebelum(gram)	Sesudah(gram)
Tangkai	26,52	25,20	Tangkai	8	4,97
Malai	20,66	20,27	Malai	8	5,36

Lignin merupakan polimer dari unit-unit fenil propane yang bersifat asam. Lignin dapat bereaksi dengan NaOH menghasilkan monomer-monomer fenil propane.



Gambar 4.5 monomer-monomer penyusun lignin

[Sumber: www.sigmaaldrich.com/life-science.html]

Bersamaan dengan degradasi lignin, beberapa karbohidrat bisa ikut terdegradasi dan ikut larut. Pemecahan ikatan-ikatan glikosida pada karbohidrat oleh alkali biasanya lebih lambat bila dibandingkan dengan hidrolisis yang dikatalis oleh asam (Sjöström; 1995). Sampel yang sudah diberi NaOH ini kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Residu yang didapat dinetralkan dengan air, kemudian dikeringkan. Sampel ini disebut sampel delignifikasi yang kemudian dihidrolisis menggunakan asam.

4.5 Pembuatan Hidrolisat

Hidrolisis enzimatik hemiselulosa tidak menghasilkan produk-produk yang beracun, tetapi proses ini tidak efektif menghasilkan substrat untuk fermentasi. Hal ini karena lebih banyak menghasilkan xilooligosakarida daripada xilosa.

Pemberian asam sulfat encer pada suhu antara 100-160⁰ C, dapat menghasilkan 70% xilosa yang terkandung dalam hemiselulosa (Pessoa *et al*; 1997). Hidrolisis hemiselulosa dipercepat dengan suhu tinggi, karena energi aktivasi yang relatif tinggi dalam reaksi fasa padat-cair, meskipun pada suhu

tinggi xilosa yang terbentuk dapat terdegradasi. Asam sulfat sangat bagus sebagai katalis hidrolisis fraksi hemiselulosa untuk menjadi xilosa, tetapi pada proses ini juga dihasilkan asam acetat, furfural, senyawa-senyawa turunan fenol, yang merupakan produk degradasi lignin. Senyawa-senyawa tersebut merupakan penghambat potensi pemanfaatan mikroorganisme dalam proses fermentasi. Hidrolisis oleh asam sulfat 0,3M dilakukan untuk memecah ikatan β -1,4 pada hemiselulosa sampel dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C. Alat autoclave digunakan agar reaksi hidrolisis dapat berlangsung pada suhu di atas 100° C dan tekanan tinggi (Manchila *et al*; 1994). Variasi yang digunakan dalam proses hidrolisis adalah variasi waktu hidrolisis dan variasi substrat yang digunakan.

Hemiselulosa merupakan senyawa heteropolisakarida sehingga hidrolisisnya dengan asam akan menghasilkan produk campuran. Hal ini karena asam memecah ikatan glikosida pada polisakarida secara acak. Asam yang digunakan pada proses hidrolisis adalah asam sulfat, karena asam sulfat merupakan katalis yang baik untuk reaksi hidrolisis. Asam sulfat yang digunakan adalah 0,3 M karena hemiselulosa sudah terhidrolisis oleh asam encer, sementara selulosa lebih sulit terhidrolisis oleh asam encer. Hal ini berkaitan dengan struktur hemiselulosa yang berbentuk amorf dan bercabang, sehingga lebih mudah dihidrolisis. Sedangkan selulosa berbentuk mikrofibril yang kristalin, teratur, dan memiliki rigiditas tinggi, sehingga lebih sulit dihidrolisis dibanding hemiselulosa (Aditya; 2004).

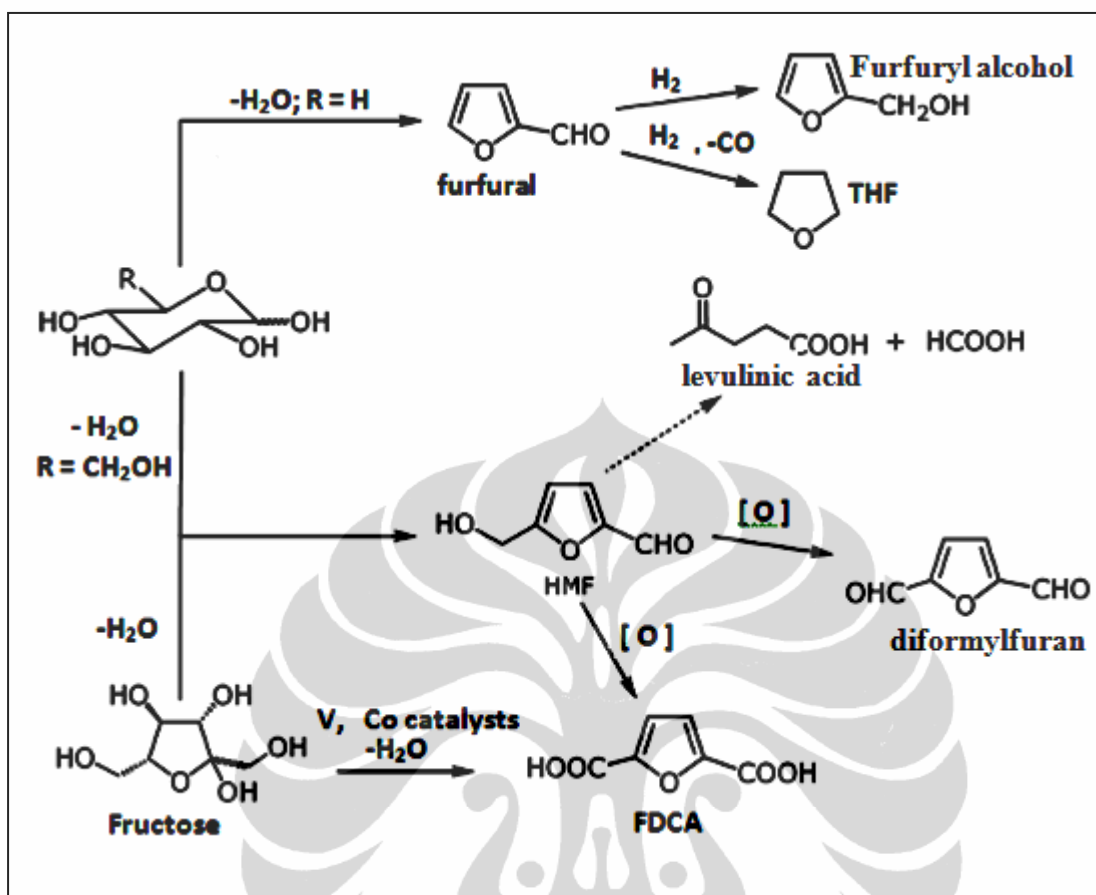
Proses hidrolisis pada penelitian ini menghasilkan hidrolisat berwarna coklat jernih, dan residu yang berupa endapan. Residu ini diperkirakan masih mengandung hemiselulosa, selulosa, dan lignin yang belum terhidrolisis.



Gambar 4.6 Autoclave dan hasil hidrolisis

Ikatan glikosida mudah dipecah oleh asam, sehingga pada hidrolisis atau filtrat kemungkinan mengandung monomer-monomer gula yang sebagian berasal dari hemiselulosa dan sebagian lain dari selulosa. Monosakarida yang terbentuk selama proses hidrolisis oleh asam meningkat, sebanding dengan meningkatnya konsentrasi asam dan waktu hidrolisis. Akan tetapi, pentosa dan heksosa cenderung mengalami degradasi menjadi furfural dan 5-hidroksimetil furfural, serta senyawa turunannya jika konsentrasi asam, waktu dan suhu ditingkatkan, sehingga setelah mencapai kadar xilosa optimum, laju kecepatan pembentukan furfural dan atau 5-hidroksimetil furfural lebih tinggi dari pada laju pembentukan pentosa dan atau heksosa.

Degradasi pentosa menjadi furfural dan heksosa menjadi 5-hidroksimetil furfural dapat dilihat pada Gambar 4.7



Gambar 4.7 Perubahan pentosa dan heksosa karena pengaruh asam

[Sumber: <http://www.rsc.org/publishing/journals>]

Hasil hidrolisis memiliki bau seperti sereal, dan residu berupa endapan. Residu ini kemungkinan masih mengandung hemiselulosa, selulosa dan lignin yang belum terhidrolisis. Ikatan glikosida yang mudah dipecah oleh asam memungkinkan filtrat yang diperoleh mengandung monomer-monomer gula yang berasal dari hemiselulosa dan dari selulosa. Filtrat hasil hidrolisis dipisahkan dari residu dengan cara penyaringan. Filtrat yang dihasilkan berwarna kuning kecoklatan dan bening.

Hidrolisat yang bersifat asam ini segera dinetralkan dengan larutan NaOH 0,5 M sampai mencapai pH 5-7. Penetralkan ini dimaksudkan untuk mencegah proses degradasi xilosa yang terbentuk menjadi senyawa furfural oleh katalis asam.

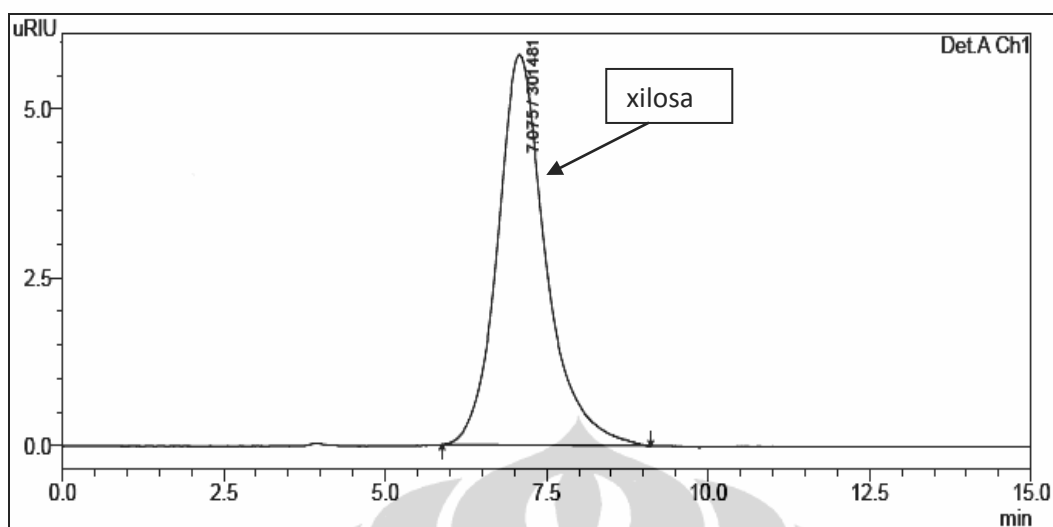
Reaksi antara NaOH dengan hidrolisat berdasarkan reaksi penetralan, asam sulfat akan bereaksi dengan basa NaOH membentuk garam natrium sulfat dan air. pH hidrolisat tak boleh lebih dari 7 karena jika hidrolisat bersifat basa dikhawatirkan akan merusak cincin karbohidrat yang ada (Solange *et al*; 2004).

Hasil hidrolisis ini kemudian dideionisasi. Resin kation dan anion ditambahkan secara bergantian hingga larutan akhir hidrolisat bersifat netral. Penambahan resin bertujuan agar hidrolisat bersifat netral dan tidak mengandung ion logam yang dapat merusak kolom HPLC.

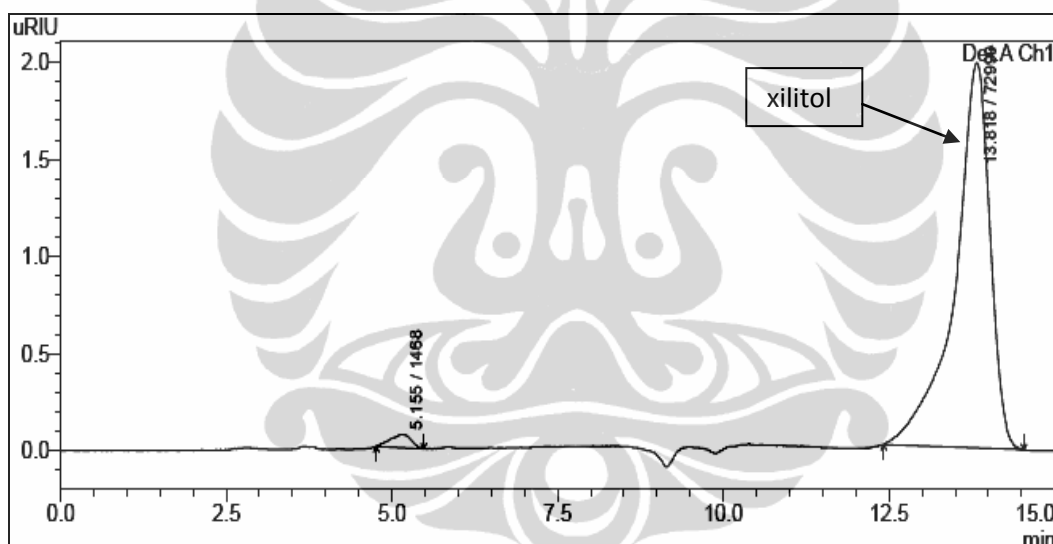
Untuk mengetahui kadar gula hasil hidrolisis, pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Pelarut yang digunakan adalah aquabides, karena pelarut ini dianggap sebagai pelarut yang terbaik untuk memisahkan gula-gula seperti xilosa dan glukosa menggunakan kolom shimpack SCR-101C untuk karbohidrat. Suhu kolom di set 80°C untuk menurunkan viskositas karbohidrat. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit.

4.6 Identifikasi Standar Karbohidrat

Masing-masing standar karbohidrat diukur menggunakan HPLC Shimadzu Prominence-20 dengan kolom kalsium untuk karbohidrat dengan detektor Refraktif Index (RID) 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 (Sunardi; 2007). Penentuan waktu retensi dari tiap puncak ini berdasarkan pada interaksi gugus hidroksil pada masing-masing gula karbohidrat dengan fasa diam. Pada gambar kromatogram, xilosa ditunjukkan oleh adanya puncak pada waktu sekitar 7 menit, glukosa pada waktu sekitar 6 menit, dan arabinosa pada waktu sekitar 8 menit.



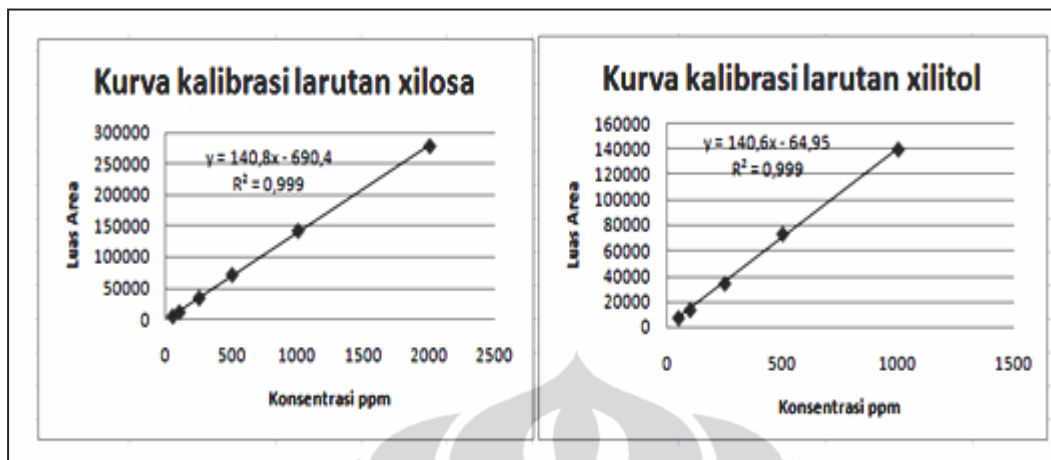
Gambar 4.8 Waktu retensi xilosa hasil kromatogram



Gambar 4.9 Waktu retensi xilitol hasil kromatogram

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

Untuk menentukan konsentrasi ppm hasil hidrolisis yang berupa xilosa, dan konsentrasi ppm xilitol hasil fermentasi, maka dibuat deret konsentrasi xilosa standar dan deret konsentrasi xilitol standar hasil uji HPLC. Dari luas area yang terlihat pada kromatogram-kromatogram larutan standar xilosa maka bisa ditentukan persamaan regresi linier larutan xilosa. Hal yang sama juga untuk larutan-larutan standar xilitol.

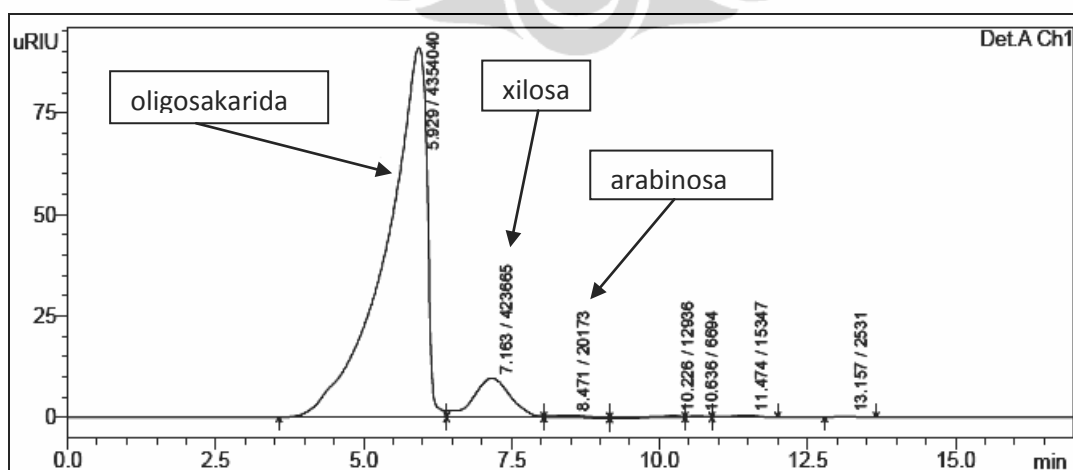


Gambar 4.10 Persamaan regresi larutan standar xilosa (kiri) dan larutan standar xilitol (kanan).

Luas area xilosa hasil hidrolisis dan atau luas area xilitol hasil fermentasi yang terlihat pada kromatogram digunakan untuk menentukan konsentrasi ppm xilosa dan atau xilitol yang ada dengan memasukkannya ke dalam persamaan regresi.

4.7 Hasil Hidrolisis Sampel Sorgum

Pada hidrolisis ini hanya dilakukan variasi waktu dan jenis substrat, sedangkan perlakuan yang lain merupakan kondisi optimum pada penelitian sebelumnya.



Gambar 4.11 Contoh kromatogram hasil hidrolisat

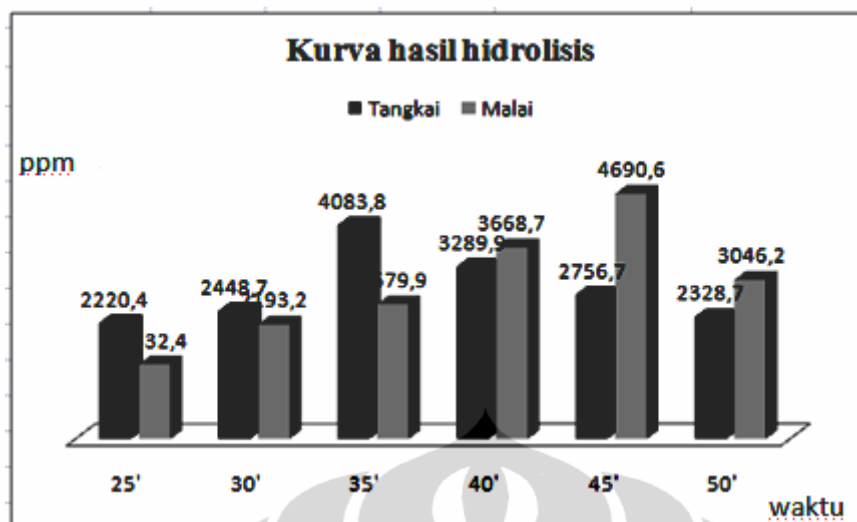
Hidrolisis tangkai dan malai sorgum menghasilkan produk xilosa, dan arabinosa. Puncak yang paling besar diperkirakan sampel karbohidrat hemiselulosa dan selulosa yang belum terhidrolisis sempurna dan masih berupa oligosakarida. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis xilan, sedangkan arabinosa berasal dari 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 (Sjöström; 1995).

Variasi waktu hidrolisis yang digunakan pada penelitian ini adalah 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 menit, serta variasi substrat berupa tangkai dan malai sorgum. Konsentrasi asam yang digunakan sama, yaitu 0,3 M (Nurmalia; 2007). Dari variasi tersebut, xilosa didapatkan paling banyak pada waktu hidrolisis 35 menit untuk tangkai dan 45 menit untuk malai sorgum. Data bisa dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4.2 Xilosa hasil hidrolisis sampel sorgum berdasar waktu

Waktu Hidrolisis	Hidrolisat Tangkai		Hidrolisat Malai	
	ppm	% rendemen	Ppm	% rendemen
25	2220,4	11,10	1432,4	7,16
30	2448,7	12,24	2193,2	10,97
35	4083,8	20,42	2579,9	13,70
40	3289,9	16,45	3668,7	18,34
45	2756,7	13,78	4690,6	23,45
50	2328,7	11,64	3046,2	15,23



Gambar 4.12 Kurva xilosa hasil hidrolisis sampel

Semakin lama waktu hidrolisis kimiawi, maka semakin banyak ikatan-ikatan glikosida pada polisakarida yang terputus membentuk monomer-monomernya (Canilha *et al*; 2004). Hal ini sesuai dengan kadar xilosa yang semakin meningkat seiring bertambahnya waktu hidrolisis. Setelah mencapai waktu optimum kadar xilosa cenderung turun. Hal ini karena xilosa yang terbentuk akan terdegradasi kembali menjadi furfural dan produk lanjutannya. Laju degradasi xilosa lebih tinggi dari pada laju pembentukan xilosa dari proses hidrolisis, hal ini menyebabkan kadar xilosa hasil hidrolisis menurun setelah mencapai kadar optimum (Bozell and Peterson; 2010).

Dari data di atas juga terlihat jika kandungan xilosa pada malai sorgum lebih tinggi dibanding pada tangkai. Diperkirakan hal ini terjadi karena kandungan hemiselulose pada malai lebih tinggi daripada tangkai. Berdasar kromatogram hasil hidrolisis pada penelitian ini, maka kadar xilosa yang dihasilkan dari tangkai sorgum adalah 20,40%, sementara kadar xilosa yang dihasilkan dari malai sorgum adalah 23,43%.

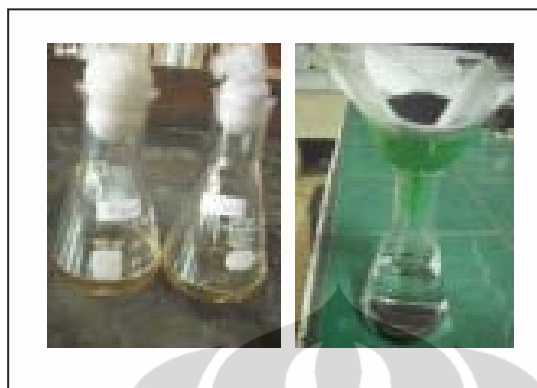
4.8 Detoksifikasi Hidrolisat dengan Arang Aktif

Proses hidrolisis terhadap substrat selain mendegradasi polisakarida, juga bisa menghasilkan beberapa senyawa pengotor yang bersifat toksik bagi sel khamir seperti furfural dan hidroksi metil furfural dari degradasi produk gula

monosakarida, asam asetat suatu substansi yang dilepaskan dari struktur hemiselulosa, beberapa senyawa aromatik dan fenolik produk degradasi dari lignin, serta inhibitor yang berasal dari logam atau mineral dalam tangkai ataupun malai sorgum (Musatto; 2003). Selain masalah toksisitas, reaksi oksidasi fenol selama penetralan hidrolisat menghasilkan pigmen berwarna coklat yang dapat menurunkan kualitas makanan.

Senyawa-senyawa di atas harus dihilangkan karena dapat bersifat racun atau inhibitor bagi mikroorganisme. Bila senyawa-senyawa furfural ini tidak dihilangkan akan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme sehingga mengganggu proses fermentasi dan menurunkan hasil biokonversi xilosa menjadi xilitol. Oleh karena itu, sebelum proses fermentasi hidrolisat perlu perlakuan detoksifikasi dengan penambahan arang aktif untuk meminimalisir kadar senyawa beracun pada hidrolisat dengan cara absorpsi, sehingga senyawa-senyawa tersebut akan tertarik ke dalam pori-pori karbon aktif (Villarreal *et al*; 2006).

Pada penelitian ini, proses detoksifikasi dilakukan dengan menambahkan 1% arang aktif (w/v) ke dalam hidrolisat sampel dan dipanaskan dalam penangas air bersuhu 50°C selama 10 menit sambil diaduk. Menurut penelitian terdahulu, metode detoksifikasi dengan 1% arang aktif, dapat mengabsorpsi sebagian besar komponen toksik pada hidrolisat, tanpa adanya xilosa yang hilang (Musatto; 2003). Filtrat dipisahkan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring dobel. Filtrat ini menjadi lebih bening dari sebelumnya, hal ini karena senyawa-senyawa berwarna seperti fraksi-fraksi lignin, furfural dan senyawa-senyawa penghambat lain yang dapat menghambat fermentasi terserap oleh karbon aktif. Hasil uji HPLC menunjukkan jika proses detoksifikasi dengan arang aktif juga akan mempengaruhi kadar xilosa karena arang aktif juga akan menyerap molekul xilosa dalam larutan. Kadar xilosa larutan dalam penelitian ini berkurang 39,25% pada hidrolisat malai dan 46,15% pada hidrolisat tangkai setelah proses delignifikasi, data kromatogram HPLC terlihat pada lampiran 6.



Gambar 4.13 Hidrolisat sebelum detoksifikasi dan sesudah detoksifikasi .

4.9 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses katabolisme anaerobik senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme atau ekstrak dari sel-sel mikroorganisme tersebut (Said; 1987). Substrat yang digunakan dalam proses fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas dan produktivitas enzim. Adanya substrat tertentu di dalam medium produksi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresi enzim yang diperlukan untuk memetabolisme substrat tersebut.

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

Proses inokulasi *Candida* memerlukan medium yang harus mengandung semua zat-zat yang diperlukan untuk pertumbuhannya, antara lain senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak), mineral dan vitamin (Volk and Wheeler; 1993).

Khamir yang diperoleh terlebih dahulu diinokulasi dalam YMA agar miring yang mengandung ekstrak khamir, ekstrak malt, pepton, glukosa dan agar. Koloni yang dihasilkan berwarna putih agak krem, tekstur dan permukaan koloni

mengkilap, licin seperti mentega, profil dan tepi koloni menggunung lurus. Inokulum ini digunakan sebagai *stock culture*.

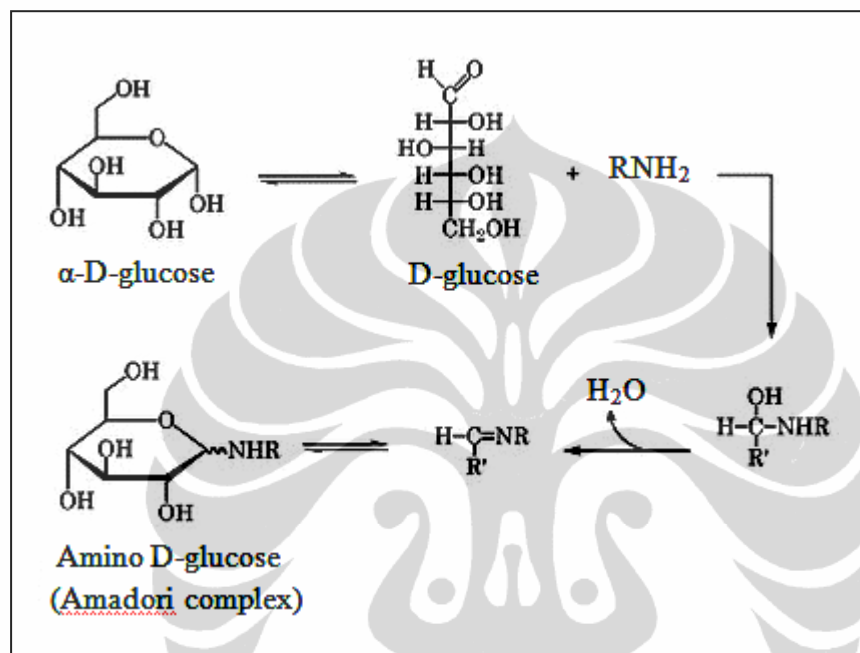
Pada proses fermentasi, khamir perlu diaktivasi supaya menghasilkan xilosa reduktase. Dalam keadaan normal, khamir seperti juga makhluk hidup lain akan memetabolisme glukosa sebagai sumber karbon untuk energinya. Jika khamir diberi sumber karbon lain selain glukosa, maka khamir akan memproduksi enzim yang bisa memetabolisme senyawa sumber karbon tersebut. Pemberian xilosa pada pembuatan media starter sebagai sumber karbon, akan merangsang khamir untuk memproduksi xilosa reduktase dan juga xilitol dehidrogenase, karena proses pembentukan xilitol merupakan proses antara dalam metabolisme khamir supaya memperoleh energi. Xilosa reduktase merupakan jenis enzim induktif, yaitu enzim yang keberadaannya dalam suatu makhluk hidup dalam hal ini khamir karena diinduksi oleh adanya substrat tertentu. .

Fermentasi hidrolisat bisa langsung menggunakan khamir dari inokulum, tetapi proses fermentasi menjadi lebih lama. Khamir akan mengalami fase lag terlebih dahulu, yaitu periode penyesuaian pada lingkungan termasuk penyesuaian pada nutrisi yang tersedia, sebelum fase logaritma atau fase aktif dalam melakukan metabolisme dan pembelahan.

Khamir mampu mereduksi xilosa menjadi xilitol karena dapat menghasilkan xilosa reduktase (Lee *et al*; 1996). Hal ini bisa dilakukan dengan menumbuhkan khamir dalam media starter yang berisi larutan xilosa. Pada media starter selain larutan xilosa, perlu ditambahkan senyawa kimia lain sebagai media fermentasi, yaitu ekstrak khamir sebagai sumber vitamin B, sumber karbon dan nitrogen, sedangkan KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, merupakan sumber mineral. pH media diatur pada 6 karena pH ini merupakan pH optimal untuk pertumbuhan khamir (Siswati dkk; 2006).

Secara terpisah media fermentasi dan larutan xilosa disterilisasi, kemudian secara aseptik keduanya dicampur sebelum ditambahkan inokulum. Pada sterilisasi media fermentasi yang mengandung garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tidak langsung dicampur dengan larutan gula xilosa. Hal ini dilakukan untuk

mencegah reaksi antara ion ammonium dengan gula yang ada pada media. Reaksi ini disebut reaksi Maillard yaitu reaksi pencoklatan (browning reaction) yang menyebabkan terjadinya pencoklatan dan rasa pahit pada makanan. Munculnya reaksi Maillard menunjukkan jika ada beberapa struktur karbohidrat yang telah rusak (Winarno; 2008). Di bawah ini contoh terjadinya reaksi Maillard.



Gambar 4.14 Contoh reaksi Maillard (reaksi pencoklatan)

[Sumber: <http://homebrewandchemistry.blogspot.com/2007/03/.html>]

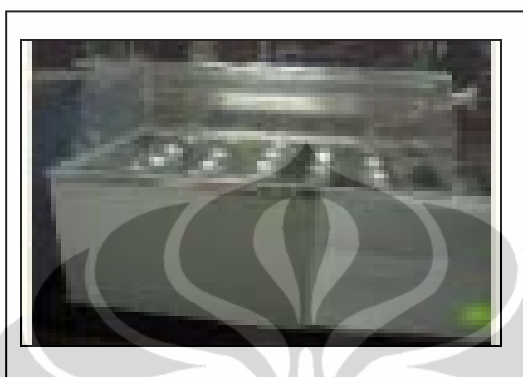
Hasil perhitungan jumlah sel khamir dalam counting chamber Neubauer dengan mikroskop, terdapat $1,59 \times 10^8$ sel/mL suspensi.

Suspensi sebanyak 2 mL yang mengandung $3,18 \times 10^8$ sel khamir diinokulasikan ke dalam 50 mL campuran media starter dan diletakkan dalam shaker selama 48 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 110 rpm. Penggunaan shaker bertujuan untuk homogenisasi reaksi serta untuk penyebaran substrat dan media fermentasi. Selanjutnya media starter ini digunakan sebagai sumber khamir pada fermentasi hidrolisat. Pembuatan media starter bertujuan agar fermentasi segera berlangsung, sehingga xilitol bisa cepat dipanen.

Pembuatan substrat fermentasi sama dengan pembuatan media starter, dengan hidrolisat sebagai sumber xilosa dan media starter sebagai sumber khamirnya. Fermentasi dilakukan dalam waktu 60 jam dengan pengambilan

sampel setiap 12 jam dimulai dari jam ke 0. Setiap kali pengambilan sampel diukur xilosa yang ada dan xilitol yang dihasilkan dengan HPLC.

Fermentasi juga dilakukan dengan penambahan kosubstrat D(-) arabinosa 7,5% dan 15% dari kadar xilosa hidrolisat dengan waktu pengambilan sampel setiap 6 jam.



Gambar 4.15 Shaker

4.10 Hasil Fermentasi

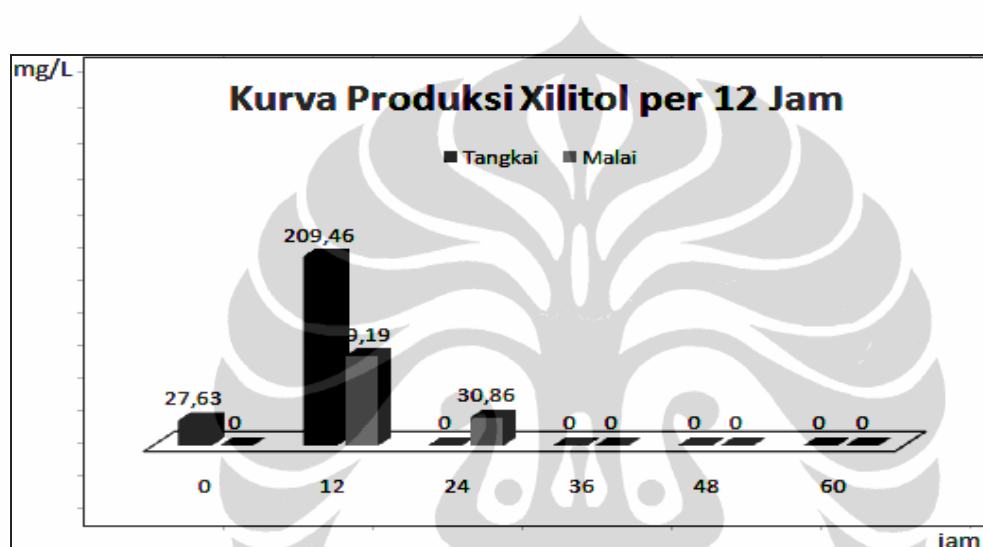
Hidrolisat hasil fermentasi berwarna krem keruh dan lebih kental dibanding hidrolisat awal. Perubahan tekstur tersebut mungkin karena adanya pertumbuhan sel khamir dan produksi metabolit hasil samping fermentasi.

Untuk menghentikan proses fermentasi, dilakukan pemanasan pada sampel hasil fermentasi dengan suhu 80°C selama 10 menit. Pemanasan ini bertujuan mengurangi aktivitas khamir tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada.

Produk fermentasi yang didapat, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, karena pada kecepatan ini sel khamir telah memisah dari media dan metabolitnya. Filtrat yang ada diambil dengan cara dekantasi dan kemudian dideionisasi .

Proses deionisasi dilakukan dengan pemberian resin penukar kation dan resin penukar kation secara bergantian, untuk selanjutnya dianalisis kadar xilosa dan xilitol yang ada dengan instrument HPLC. Luas area yang didapat dari kromatogram dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier dari xilosa dan xilitol untuk mendapatkan konsentrasi ppm xilosa dan xilitol yang ada. Kromatogram dan data perhitungan hasil fermentasi tertera dalam lampiran .

Pada penelitian ini dilakukan variasi terhadap substrat yaitu tangkai dan malai sorghum. Masing-masing substrat ini kemudian divariasikan dalam waktu hidrolisis untuk mendapatkan waktu optimal hidrolisis. Dengan menggunakan waktu hidrolisis optimal, hidrolisat masing-masing substrat difermentasi dengan pengambilan sampel setiap dua belas jam, kemudian dilanjutkan fermentasi dengan pengambilan sampel setiap enam jam. Pada masing-masing substrat juga diberikan variasi penambahan kosubstrat D(-) arabinosa.



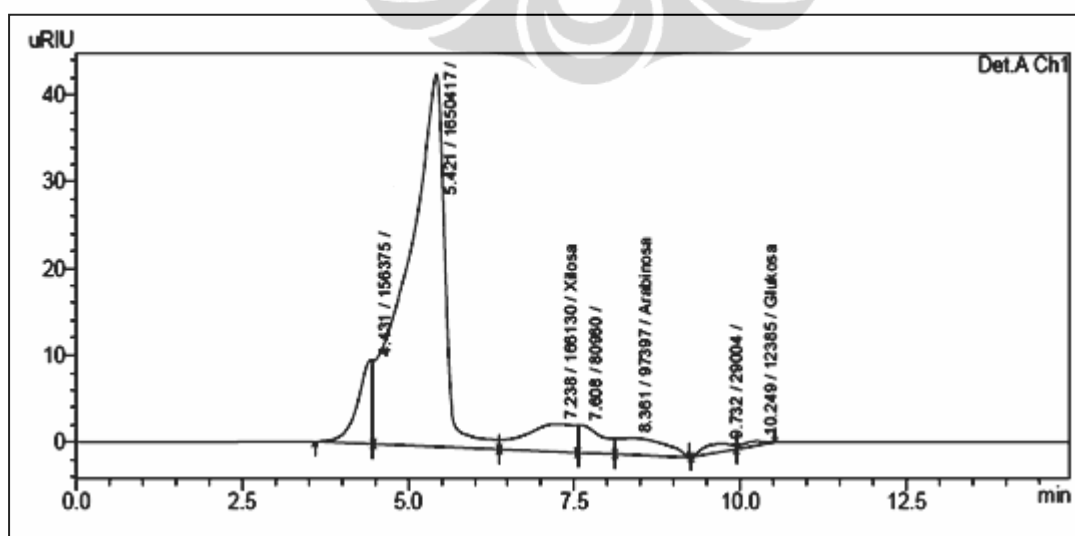
Gambar 4.16 Kurva produksi xilitol per 12 jam.

Dari data di atas, fermentasi pada tangkai menghasilkan xilitol lebih tinggi dibanding pada malai. Waktu optimum fermentasi yaitu waktu fermentasi yang menghasilkan xilitol tertinggi baik pada tangkai maupun malai adalah 12 jam, yaitu 209,46 mg/L untuk hidrolisat tangkai dengan konversi 32,57% dan 99,19 mg/L untuk hidrolisat malai dengan konversi 11,13%. Setelah waktu optimum, xilitol yang dihasilkan mengalami penurunan, untuk akhirnya tidak terdeteksi.

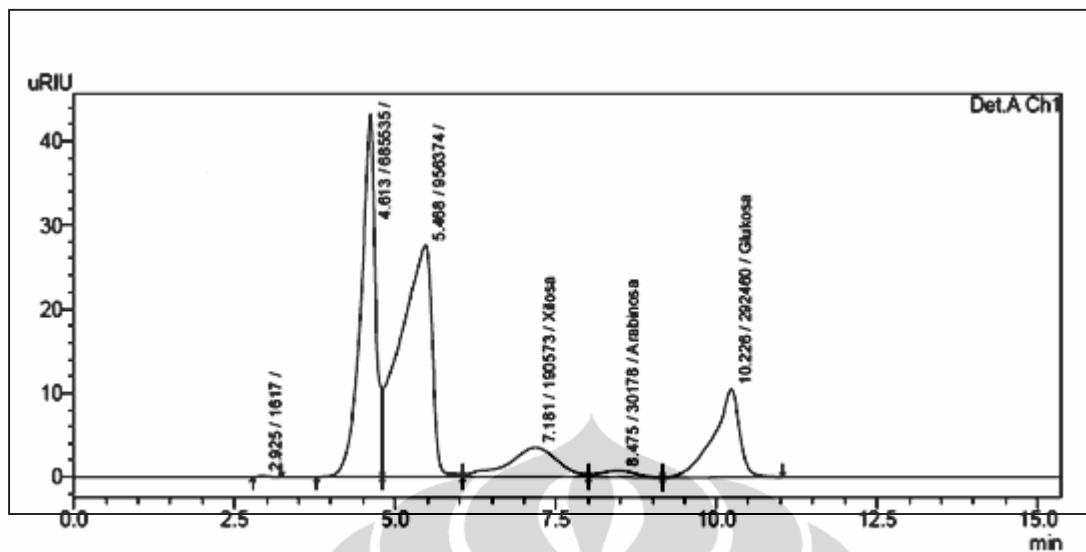
Ada beberapa hal yang menyebabkan xilitol dalam media fermentasi menjadi berkurang dengan bertambahnya waktu fermentasi, antara lain xilitol yang terbentuk akan dimetabolisme lebih lanjut untuk memasuki jalur pentosa fosfat pathway. Produksi xilitol oleh khamir akan menurun jika sumber nutriennya semakin menyusut.

Kecepatan pembentukan xilitol tergantung dari aktivitas khamir dalam mensekresi enzim xilosa reduktase yang akan mengubah xilosa menjadi xilitol. Aktivitas khamir tergantung pada fase pertumbuhannya (Wheeler and Volk; 1993). Khamir akan optimum menghasilkan enzim untuk proses metabolisme nutrisi jika sedang berada dalam fase logaritma, yakni fase di mana terjadi pembiakan cepat. Pada fase ini, khamir akan banyak mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Setelah fase logaritma, khamir akan mengalami fase stasioner, dimana sebagian khamir menjadi tua dan mati, sementara laju pembiakan berkurang seiring dengan berkurangnya medium sumber nutrisi, sehingga laju pembentukan xilitol dari xilosa lebih kecil dibanding dengan laju perubahan xilitol menjadi senyawa-senyawa antara dalam metabolisme sebelum akhirnya masuk ke jalur pentosa fosfat pathway untuk dimetabolisme lebih lanjut (Alexander *et al*; 1988).

Karena pada pengambilan sampel per 12 jam, terlihat kurva maximum ada pada fermentasi 12 jam, maka dilakukan pengulangan fermentasi dengan pengambilan sampel setiap 6 jam, jadi pengambilan sampel dilakukan pada jam ke 0; 6; 12; 18 dan 24. Fermentasi ini dilakukan dengan variasi penambahan D(-) arabinosa sebagai kosubstrat, masing-masing sebesar 0% (tidak ditambah); 7,5%; dan 15% dari konsentrasi xilosa yang ada. Penambahan berdasar konsentrasi xilosa hasil hidrolisis sebelum ditambahkan suspensi khamir (media starter).



Gambar 4.17 Xilosa hasil hidrolisat tangkai tanpa khamir



Gambar 4.18 Xilosa hasil hidrolisat malai tanpa khamir

Dari kromatogram di atas didapat konsentrasi xilosa 1350 ppm pada hidrolisat tangkai dan 1185 ppm pada hidrolisat malai, sehingga D(-) arabinosa yang ditambahkan pada masing-masing hidrolisat adalah 100 dan 200 ppm untuk tangkai, dan 90 dan 180 ppm untuk malai. Pada penelitian ini juga dilakukan fermentasi terhadap larutan xilosa murni sebagai kontrol pembanding.

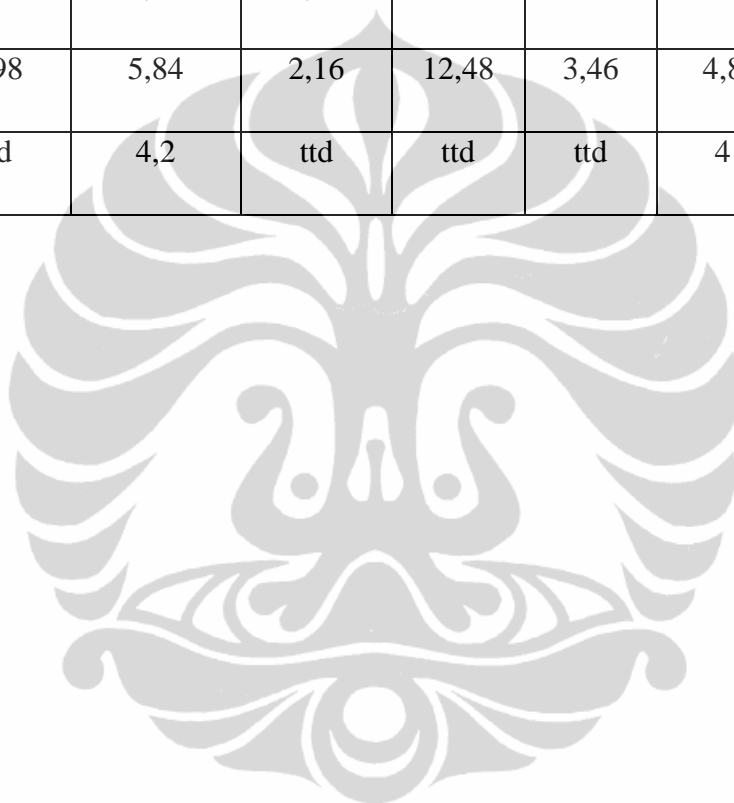
Konversi xilosa menjadi xilitol pada fermentasi xilosa murni adalah 1,49% pada jam ke 6 dan 2,66% pada jam ke 12, data lengkap dapat dilihat pada lampiran 13.4.

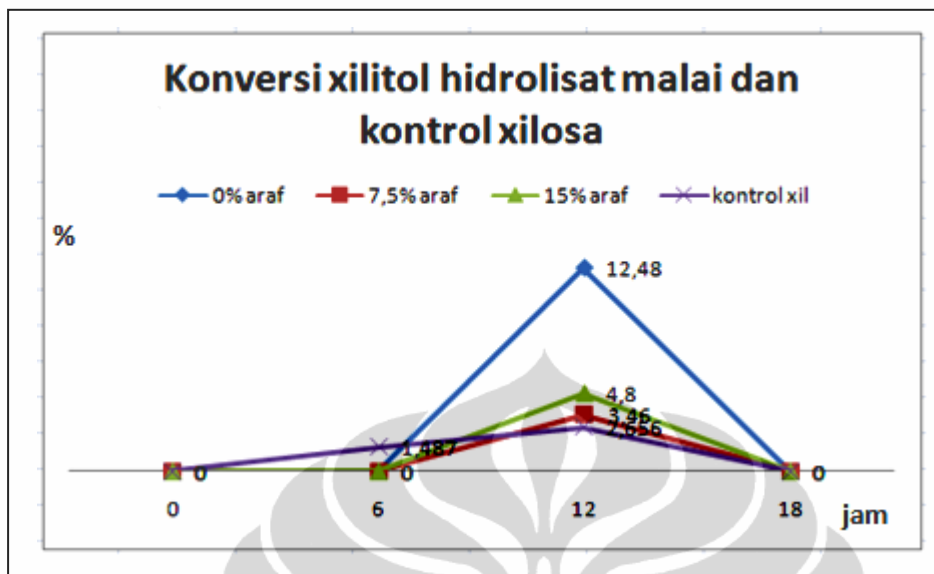
Penambahan kosubstrat D(-) arabinosa pada hidrolisat, diharapkan akan menaikkan rendemen xilitol pada proses fermentasi. Hal ini karena D(-) arabinosa melalui beberapa tahap reaksi enzimatik akan masuk ke jalur pentosa fosfat pathway dalam metabolisme khamir, sehingga diharapkan xilitol yang terbentuk dari proses fermentasi tidak dimetabolisme lebih lanjut untuk digunakan sebagai sumber energi sel.

Dari hasil fermentasi hidrolisat tangkai dan malai dengan penambahan kosubstrat D(-) arabinosa didapat data konversi sebagai berikut:

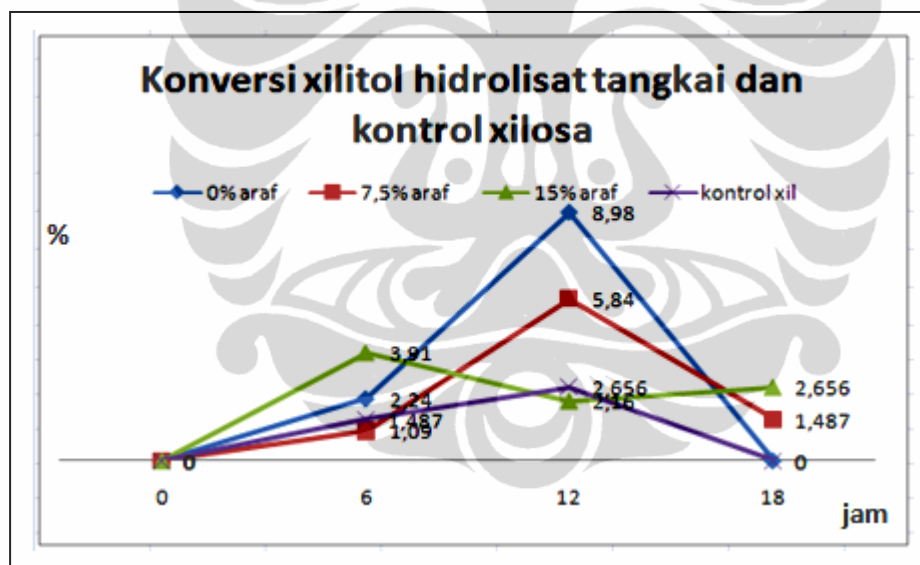
Tabel 4.3 Data konversi xilitol pada penambahan arabinosa dan xilosa murni

Wkt ferm jam	% konversi xilosa tangkai			% konversi xilosa malai			Konv xilosa
	+ 0 ppm	+100 ppm	200 ppm	0 ppm	90 ppm	180pp	
0	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
6	2,24	1,09	3,91	ttd	ttd	ttd	1,49
12	8,98	5,84	2,16	12,48	3,46	4,8	2,66
18	ttd	4,2	ttd	ttd	ttd	4	ttd





Gambar 4.19 Konversi xilitol hasil fermentasi hidrolisat malai dan xilosa murni

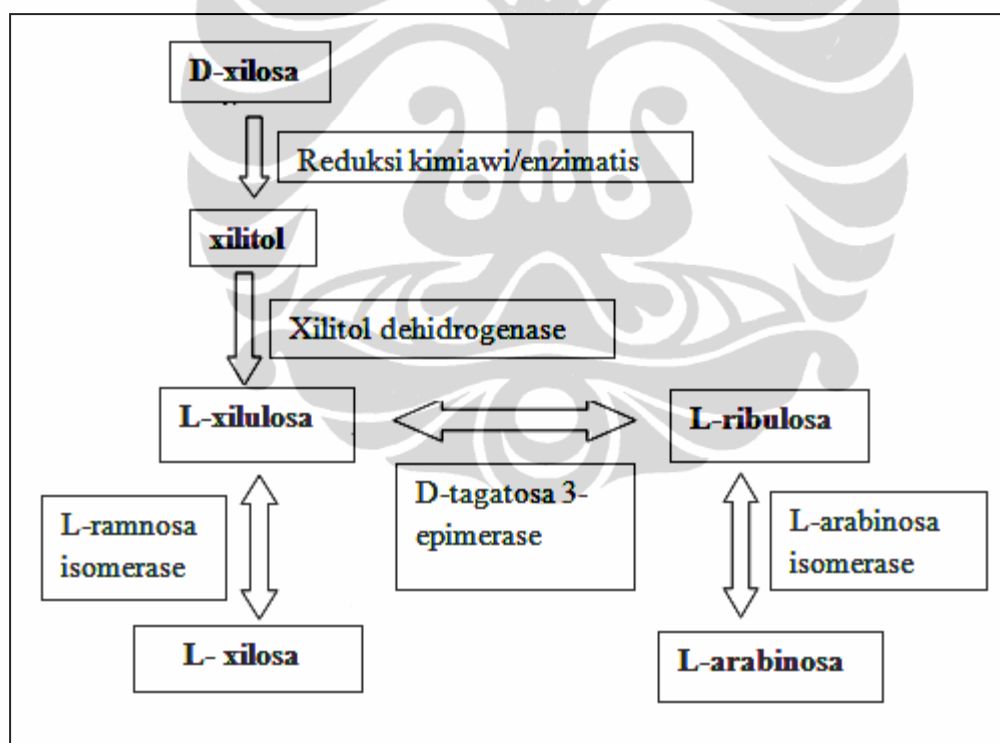


Gambar 4.20 Konversi xilitol hasil fermentasi hidrolisat tangkai dan xilosa murni

Dari kurva konversi xilitol hasil fermentasi pada penelitian ini, terlihat jika waktu fermentasi optimum, baik pada hidrolisat tangkai, malai, ataupun xilosa murni adalah 12 jam. Konversi xilosa menjadi xilitol pada fermentasi hidrolisat, lebih tinggi dibandingkan pada fermentasi xilosa murni. Hal ini terjadi

karena gula lain yang dihasilkan dari proses hidrolisis, juga ikut dimetabolisme oleh khamir yang senyawa metabolit antaranya berupa xilitol.

Pada penelitian ini juga terlihat jika konversi xilitol justru menurun pada penambahan D(-) arabinosa. Hal ini terjadi mungkin karena tahap perubahan D(-) arabinosa untuk masuk ke pentosa fosfat pathway lebih panjang dibandingkan dengan xilitol, sehingga xilitol lebih cepat masuk ke pentosa fosfat pathway untuk dimetabolisme lebih lanjut. Di sisi lain sel juga tetap memetabolisme D(-) arabinosa, yang berarti sel juga memproduksi enzim-enzim yang diperlukan untuk memetabolisme D(-) arabinosa, ini mengakibatkan aktivitas sel dalam mensekresi xilosa reduktase menjadi kurang optimum, sehingga kecepatan pembentukan xilitol menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan xilitol yang terbentuk menjadi berkurang dengan penambahan D(-) arabinosa.



Gambar 4.21 Biokonversi xilitol menjadi gula lain

[Sumber: Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:273–276]

Adanya kosubstrat D(-) arabinosa mungkin menyebabkan beberapa enzim isomerase menjadi lebih aktif, sehingga justru menyebabkan xilulosa yang

terbentuk dari oksidasi xilitol, selain masuk ke jalur pentosa fosfat untuk dimetabolisme lebih lanjut, juga sebagian diubah menjadi senyawa isomer dan akhirnya menjadi L-arabinosa. Hal ini mungkin yang menyebabkan pada jam ke 12 fermentasi luas area arabinosa pada kromatogram justru bertambah besar pada fermentasi tangkai. Hal yang sama tidak terjadi pada fermentasi malai, luas area arabinosa berkurang secara signifikan dengan lamanya waktu fermentasi, untuk kemudian tidak terdeteksi. Hal ini menunjukkan jika D(-) arabinosa yang ditambahkan juga ikut dimetabolisme oleh khamir.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian produksi xilitol dari bahan hidrolisis xilosa dari tangkai dan malai sorgum disimpulkan bahwa:

1. Hidrolisis 1 gram tangkai sorgum dengan menggunakan larutan H_2SO_4 0,3M, dan suhu $121^\circ C$, mencapai kadar xilosa optimum dengan waktu hidrolisis 35 menit, menghasilkan xilosa 4080,82 ppm dengan rendemen 20,40%, sementara 1 gram malai sorgum mencapai xilosa optimum dengan waktu hidrolisis 45 menit, menghasilkan xilosa 4686,34 ppm dengan rendemen 23,43%.
2. Proses detoksifikasi selain menyerap senyawa-senyawa yang tidak diinginkan, juga menyerap xilosa hasil hidrolisat yang akan digunakan sebagai substrat pembuatan xilitol.
3. Waktu optimum fermentasi berdasar hasil penelitian ini adalah 12 jam, baik xilosa murni ataupun hidrolisat.
4. Prosen konversi xilosa menjadi xilitol hidrolisat lebih tinggi dibanding dengan xilosa murni, yakni 12,48% untuk malai, 8,98% untuk tangkai dan 2,66% untuk xilosa murni.
5. Penambahan D(-) arabinosa 7,5% dan 15% dari kandungan xilosa, menurunkan rendemen xilitol.

5.2 Saran

Berdasar hasil yang diperoleh dari penelitian ini, maka diusulkan beberapa penelitian lanjutan yang diantaranya:

- 1 Perlu dilakukan jeda pengambilan sampel yang lebih pendek, misal per 2 jam, agar kenaikan dan penurunan xilitol bisa diketahui dengan lebih rinci, sehingga didapatkan waktu optimum untuk produksi xilitol.
- 2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian kosubstrat gula lain dalam proses fermentasi. Pada penelitian lanjutan bisa

dilaksanakan dengan gula yang tahapan masuk ke jalur pentosa fosfat lebih pendek, misal gula xilulosa.

4. Karbon aktif pada proses detoksifikasi, selain menyerap senyawa-senyawa toksik atau inhibitor, juga akan menyebabkan berkurangnya kadar xilosa karena ikut terserap dalam struktur karbon aktif, maka diperlukan alternatif proses detoksifikasi yang tidak menyebabkan penurunan kadar xilosa dalam hidrolisat.
5. Untuk meminimalisasi terbentuknya produk inhibitor dari degradasi gula-gula sederhana dan degradasi lignin diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap parameter-parameter proses hidrolisis asam serta proses detoksifikasi. Parameter konsentrasi asam, suhu, dan suhu hidrolisis merupakan parameter yang sangat krusial pada proses hidrolisis selain metode detoks yang tepat, sehingga bisa meminimalkan produk inhibitor yang pada akhirnya meningkatkan rendemen xilitol dalam proses fermentasi.
6. Karena xilitol merupakan produk antara dalam proses metabolisme khamir, maka perlu dicari senyawa yang bisa menghambat xilitol dehidrogenase agar xilitol yang sudah terbentuk tidak dimetabolisme lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditya A, (2004), Studi Pendahuluan Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisis Sekam Padi (*Oryza sativa L*) dengan Menggunakan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viridae* untuk Menghasilkan D-Xilosa sebagai Bahan Dasar Xilitol, Karya Utama Sarjana Kimia FMIPA UI Depok.
- Alanen P, (2000), Xylitol in caries prevention; public health aspects, *Journal of Dental Research*, 79: 1288.
- Alexander M.A, Yang V.W, Jeffries T.W, (1988), Levels of penthose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture, *Appl Microbiol Biotechnol*, 29: 282-288.
- Bettiga M, Hahn-Hägerdal.B and Gorwa-Grauslund.F.M, (2008), Comparing the xylose reductase / xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathway in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Biotechnology for Biofuel*, 1.16.
- Bozell J, and Peterson. G.P, (2010), Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Departement of Energy's "Top 10" revisited, *Green Chem*, 12: 539 - 554.
- Brunzell J.D,(1978), Use of Fructose, xilitol, or sorbitol as a sweetener in diabetes mellitus. *Diabetes Care*, vol.1 No 4.
- Buhner J and Anglebevor.F.A, "Dilute acid hydrolysis and fermentation of corn fiber to xylitol" 2 halaman.<http://www.p2pays.org/ref/35/34369.pdf>.
- Canilha L, Carvalho W, Santos J.C, Silva A.J.B, Felipe M.G.A, Mancilha I.M, Silva S.S,(2004), A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 39: 2135-2141.
- Dunayer E.K, (2006), New findings on the effects of xylitol ingestion in dogs. *Veterinary Medicine*.
- Erikson O, Goring D.A.I, Lindgren B.O, (2004), Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spouce wood, *Wood Science and Technology*, Vol 14: 267-279.

- Fitrianingsih, (2005), Inventarisasi dan Identifikasi Khamir dari Serasah di Taman Nasional Gunung Halimun, Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
- Fushinobu S, Hidaka M, Honda Y, Wakagi T, Shoun H, Kitaoka M, (2005), Structural basic for the specificity of reducing end xylose-releasing exo-oligoxyalanase from *Bacillus halodurans* C-125, Univercity of Tokyo, Departement of Biotechnology.
- Ganjar I. dkk, (1992), *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar*, Depok, Universitas Indonesia, hal, 49-57
- Girio F, Amalia.P and Amarai.M.T, (1989), Enzymatic and physiological study of D-xylose metabolism by *Candida shehatae*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 32: 199-204.
- Granström T.B, Izumori K, Leisolla M, (2007), A rare sugar xylitol part II : biotechnological production and future applications of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74: 273-276.
- Granström T.B, Izumori K, Leisolla.M, (2007), A rare sugar xylitol part I : the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74: 277- 281
- Harborne J.B, (1987), *Phytochemical methods. Metode Fitokimia Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan* (edisi ke dua) (Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, Penterjemah), Bandung : ITB.
- Howard R.L, Abotsi.E, Rensburg, J.E.L. and Howard.S, (2003), Lignocellulose biotechnology:issue of bioconversion and enzyme production. *African journal of Biotechnology*, vol 2, 12, hal 602-619.
- Hudiyono S, Handayani S, (2004), *Enzim*, Departemen Kimia, FMIPA, UI.
- Human S, (2001), Pengujian galur mutan sorghum generasi M4 terhadap kekeringan di Gunung Kidul, *PDII-LIPI*.
- Human S, (2010), Prospek dan potensi sorgum sebagai bahan baku bioetanol. *BSL. Energy*, PATIR.BATAN.
- Ingraham J.L and Ingraham.C.A, (2000), *Introduction of Microbiology 2nd.Ed.Brooks/Cole-Thompson learning*, California, USA.

- Iranmahboob J, Nadin.F, Monemi.S, (2002), Optimizing acid hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips, *Biomass and Bioenergy*, 22: 401-404.
- Jeffries T.W, (1994), Biodegradation of lignin and hemicelluloses, *Institute for microbial and Biochemical Technology*, 233-276
- Karhuma K, Fromanger R, Hägerdal Bärbel.H, Grauslund M.F.G, (2007), High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisia*., *Appl Microbiol Biotechnol*, 73 , 1039-1046.
- Kastner J.R, Roberts R.S, Jones W.J, (1996), Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentations by *Candida shehatae*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 45: 224-228.
- Krengel U, and Dijkstra, (1996), Three dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular basis for its low pH optimum, *J.Mol.Biol*, 263: 70-78.
- Kulkarni N.A, Shendye, M.Rao, (1999), Molecular and biotechnological aspect of xylanases, *FEMS Microbiol Rev* 23: 411-456.
- Lee H, Sopher C. R, Yau Kerm YF, (1996), Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed & sugars in *Candida guilliermondii*. *J.Chern Tech Biotechnol*, 66: 315-319.
- Lee W.J, Kim M.D, Ryu Y.W, Bisson L.F, Seo J.H, (2002), Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 186-191.
- Lehninger, (2004), *Biochemistry 4th Edition*, page: 190-232.
- Manchila I.C, Roberto,C.A.S, Felipe.M.G.A, Castro.S. H.F, (1994), "Evaluation of rice straw hemicelluloses hydrolysate in production of xylitol by *Candida guilliermondii*", University of Sao Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Brazil.
- Mattila P.T, Svanberg M.J, Jämsä T, Knuttila M.L, (2002), Improved bone biomechanical properties in xylitol-fed aged rats, *Metabolism* 51(1), 92-6.

- Meryandini A, Widhyastuti N, Lestari N, (2008), Pemurnian dan karakterisasi xilanase *Streptomyces.sp.SKK1-8*, *Makara, Sains*, Vol 12, No 2: 55-60
- Mosier N *et al*, (2005), Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol*, 96: 673-686.
- Musatto S.I, Rodrigues R.C.L.B, (2003), Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor, *Industrial Crops and Product*, 17: 171-176.
- Nigam P, Singh D, (1995), Proses for fermentative production of xylitol – a sugar substitute, *Pro Biochem* 30: 117-124.
- Novitawati R.T, (2009), *Pemanfaatan Pollard (Limbah Penggilingan Gandum) Untuk Produksi Pemanis Xilitol*, Karya Utama Sarjana Kimia FMIPA UI Depok.
- Nurmalia, (2007), *Studi Optimasi Hidrolisis Kimiawi Ampas Tebu Untuk Menghasilkan D-Xilosa Sebagai Bahan Pembuatan Xilitol*, Karya Utama Sarjana Kimia FMIPA UI Depok.
- Oh D.K and Kim S.Y, (1998), Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 419-425.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal.B, (2004), Fermentation of lignocellulosic hydrolysat II: inhibitors and mechanism of inhibitors, *Bioresource Technology*, 74: 25-33
- Parajo J.C, Dominguez H, and Dominguez J.M, (1998), Biotechnological production of xylitol part I: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis, *Bioresource Technology*, 65: 191-211.
- Parajo J.C, Dominguez H, Dominguez J.M, (1988), Biotechnological production of xylitol part 3: operation in culture media made from lignocelluloses hydrolysates, *Bioresource Technology*, 66: 25-40.
- Pepper T, Olinger P.M, (1988), *Food Technology* 42: 98-106.
- Pessoa A.Jr, Mancilha I.M, Sato.S, (1997), Acid hidrolisis of hemicellulose from sugarcane bagasse, *Braz.J.Chem.Eng*, Vol 14, no 3.
- Petschacher and Nيتدetzky, (2008), Altering the coenzyme preference on xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose

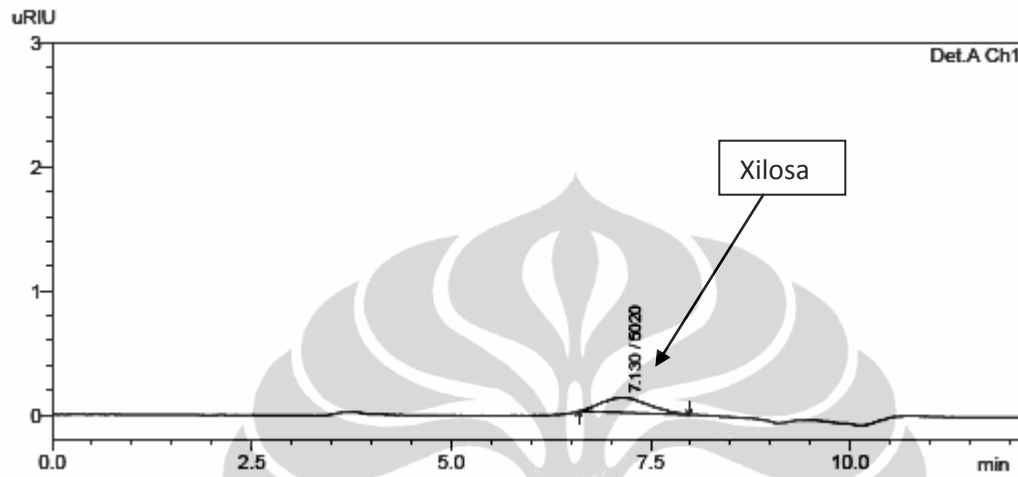
- in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*,
Microbial cell Factories 7:9
- Ramos L.P, (2003), The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials, Sao Paulo, *Quim.Nova*, vol 26 No 6.
- Richana N.P, Lestina.T.T, Irawadi, (2004), Karakterisasi lignosellulosa dari limbah tanaman pangan dan pemanfaatannya untuk pertumbuhan bakteri RXA III-5 penghasil xilanase, *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 23 (3): 171-176.
- Riki, (2008), *Seleksi Berbagai Spesies Khamir Untuk Menghasilkan Xilitol Menggunakan Bahan Dasar D-Xilosa*, Karya Utama Sarjana Kimia FMIPA UI Depok.
- Rivas B, Torre Paolo, Dominguez J.M, Perego P, Parajo J.C, (2003), Carbon material and bioenergetic balances of xylitol production from corncobs by *Debaryomyces hansenii*, *Biotechnol Prog*, 19: 706-713.
- Roberto I.C, Musatto.S.I, Rodrigues.R.C.L.B, (2003), Dilute-acid hydrolysis of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor, *Industrial crop and product* 17: 171-176.
- Sa'id E.G, (1987), *Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi*, Bogor, MSP
- Sakakibara Y, Saha,B.C, (2009), Microbial production of xylitol from L-arabinose by metabolically engineer *Escherichia coli*, *J.Biosci Bioeng*, 107.5: 506-11
- Santosa D.D.S dan Human.S, (2009), Modified starch of sorghum mutant line ZH-30 for high fiber muffin products, *Atom Indonesia*, 35. 1: 1-9
- Shurtleft W, Aoyagi.A, (1979), A super soy food from Indonesia, in book of tempeh, *Harper and Row*, New York.
- Siswati S, Sri Handayani, Susilowati H.S dan Endang Saepudin, (2006), *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*, Depok : Universitas Indonesia.
- Sjöström E, (1995), *Kimia Kayu ,Dasar-dasar dan Penggunaan*. Edisi ke dua. (Hardjono Sastrohamidjoyo & Soenardi Prawirohatmodjo, Penerjemah), Yogyakarta : Gajah Mada University Press.

- Sun X.F, Sun.R.C, Tomkinson.J.B, (2003), Preparation of sugarcane bagasse hemicellulosic succinates using NBS as a catalyst, *Carbohydrate Polymer*, 53: 483-495.
- Sunardi, (2007), *Penuntun praktikum kimia analisa instrumentasi*, Universitas Indonesia, Depok.
- Timotius K.H, (1982), *Mikrobiologi Dasar*, Salatiga, UKSW
- Thorpe T.A, (1983), Morphogenesis and regeneration in tissue Culture. In Owens (Ed). *Genetic Engineering, Application to Agriculture*, 7: 285-303.
- Tomkinson J, Mab PL, Liang S.F, (1999), Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatment, www.elsevier.com/locate/carbpol (diakses 23 April 2010, pukul 19.53).
- Uhari M. *et al*, (1998), A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics*, 102, 4: 879-974.
- Villarreal M.L.M, Prata A.M.R, Felipe M.G.A, Silva A.J.B, (2006), Detoxification procedures of eucalyptus hemicelluloses hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*, *Enzyme and Microbial Technology* 40: 17-24.
- Volk W.A and Wheeler.M.F, (1993), *Basic Microbiology*(5th ed) (Markham: Penterjemah), Jakarta : Erlangga.hal: 81-92
- Winarno F.G, (2008), *Kimia Pangan dan Gizi*, Bogor, M-Brio
<http://balitsereal.litbang.deptan.go.id/ind/bjagung/duatiga.pdf> (diakses 28 Mei 2010, pukul 15.15)
http://blogs.princeton.edu/chm_333/2006/biomass (diakses Selasa 1 Juni 2010, pukul 19.55)
<http://isroi.wordpress.com/2008/05/01/karakteristik-lignoselulosa-sebagai-bahan-baku-bioetanol> (diakses Selasa 1 Juni 2010, pukul 15.20)
<http://mcat-review.org/carbohydrates.php> (diakses 3 juni pukul 17.12)
<http://qualitycontrol-07.blogspot.com/2010/05/mengenal-bahan-kimia-bag-1.html> (diakses 5 Juni 2010, pukul 10.10)
<http://www.apoteker.info/Topik%20Khusus/xylitol.htm> (diakses 3Juni 2010, pukul 16.10).

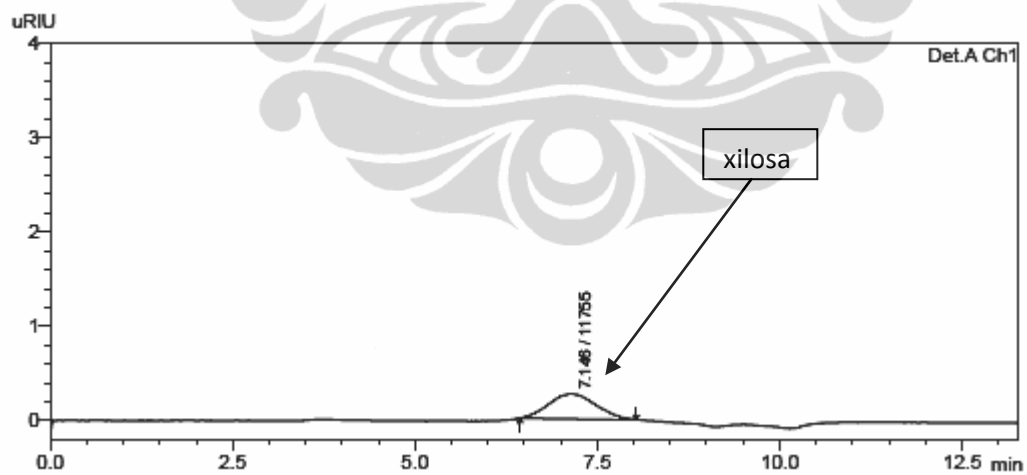
LAMPIRAN 1

Kromatogram Larutan Standar Xilosa

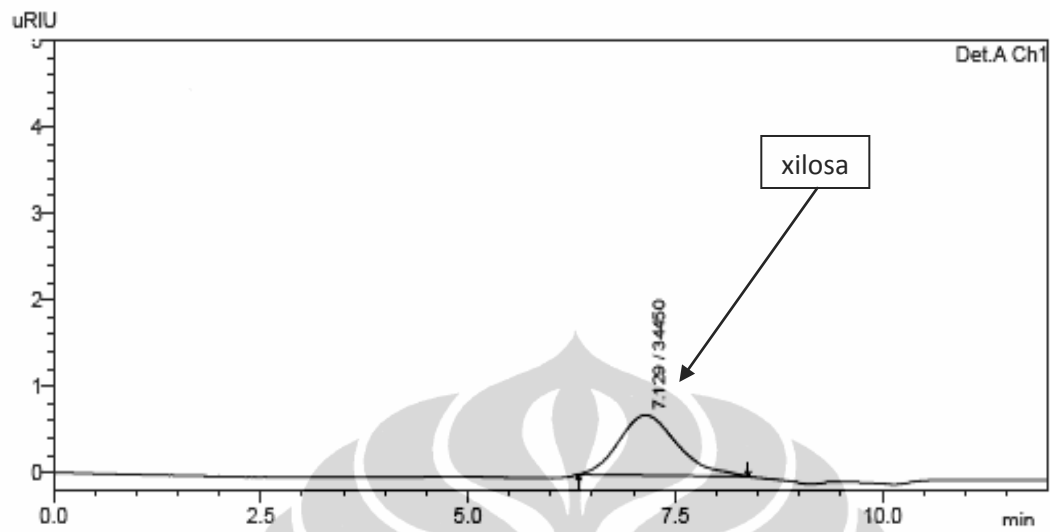
1 Larutan Xilosa 50 ppm



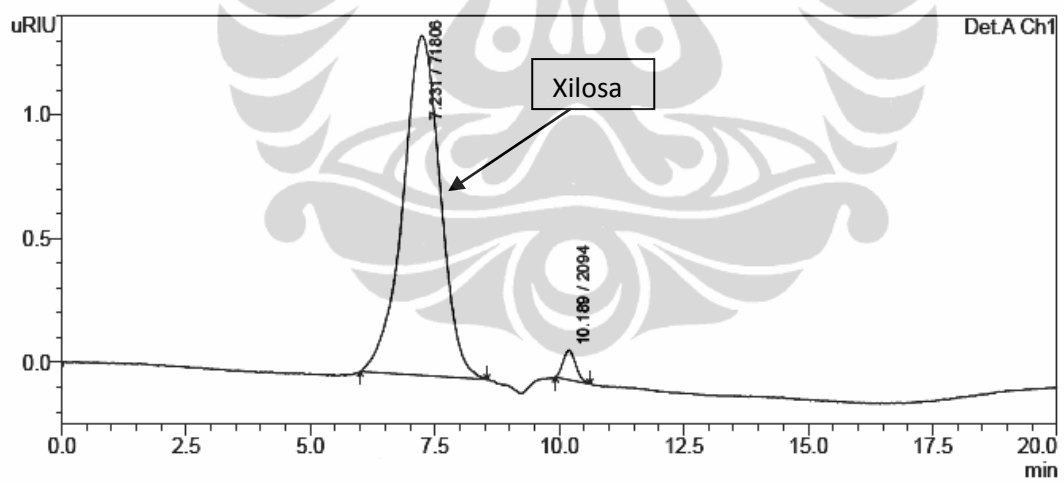
2 Larutan Xilosa 100 ppm



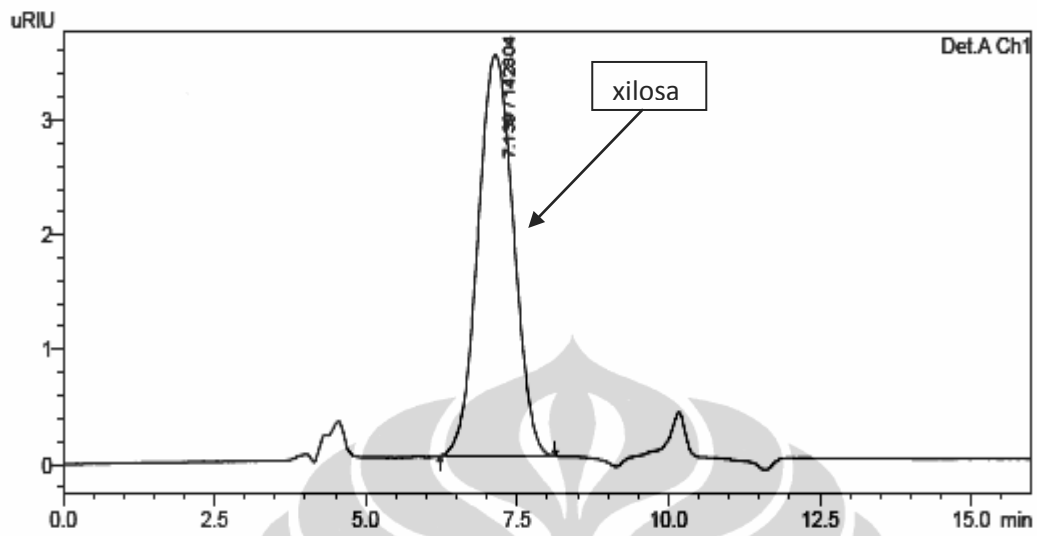
3 Larutan Xilosa 250 ppm



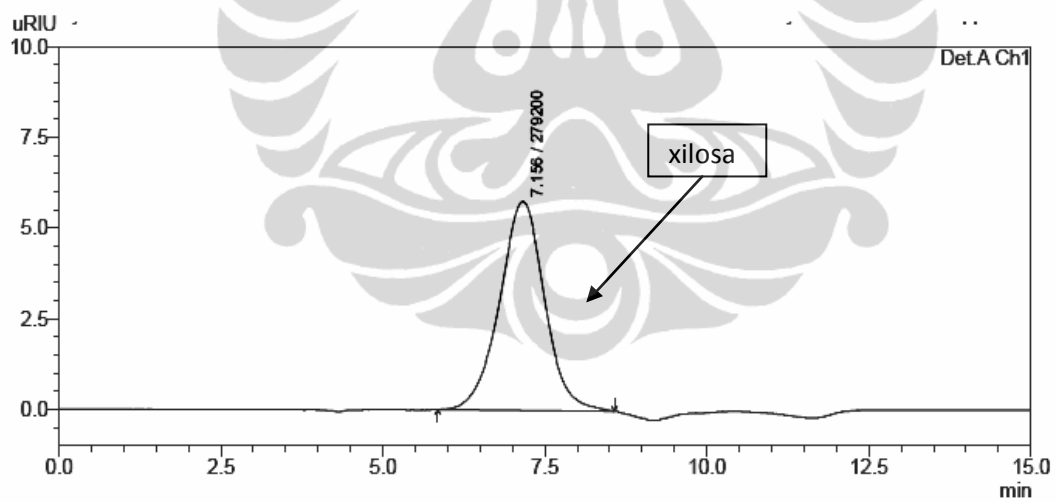
4 Larutan Xilosa 500 ppm



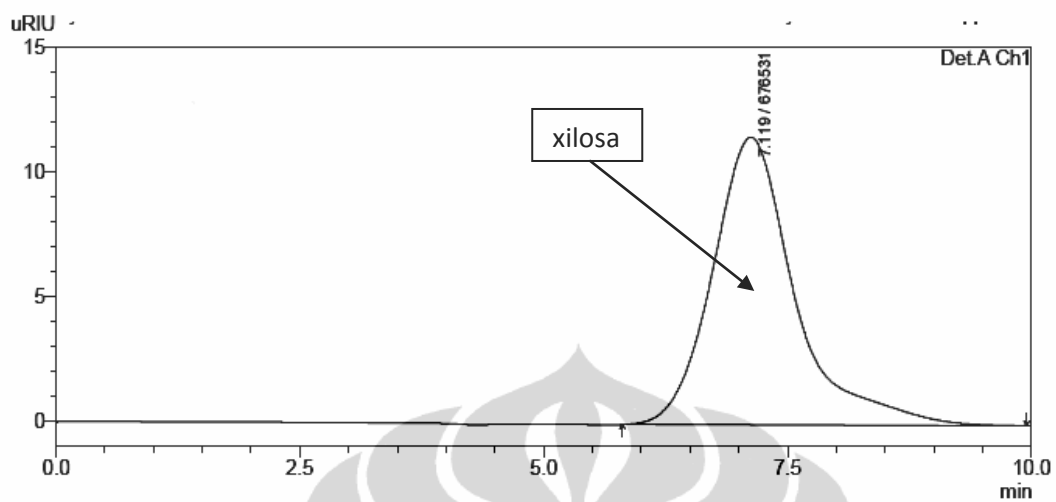
5 Larutan Xilosa 1000 ppm



6 Larutan Xilosa 2000 ppm



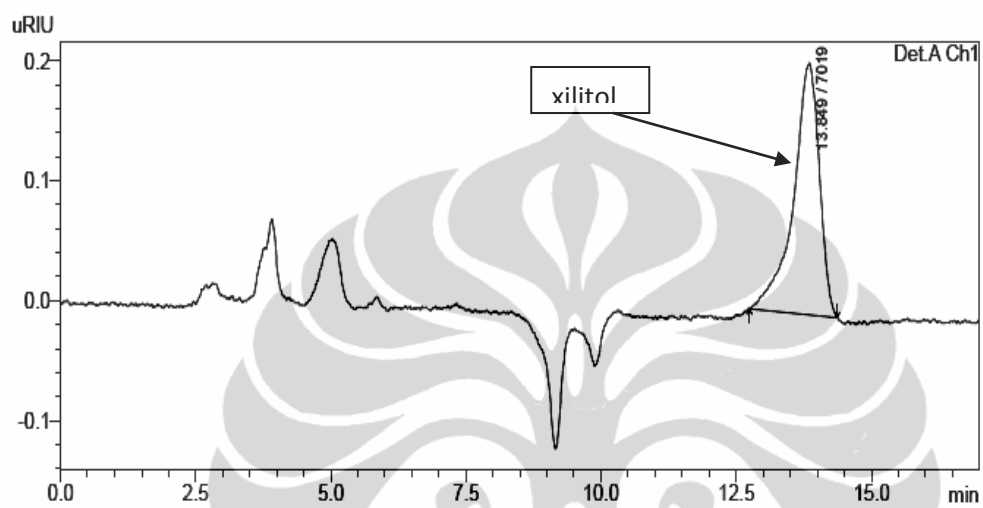
7 Larutan Xilosa 5000 ppm



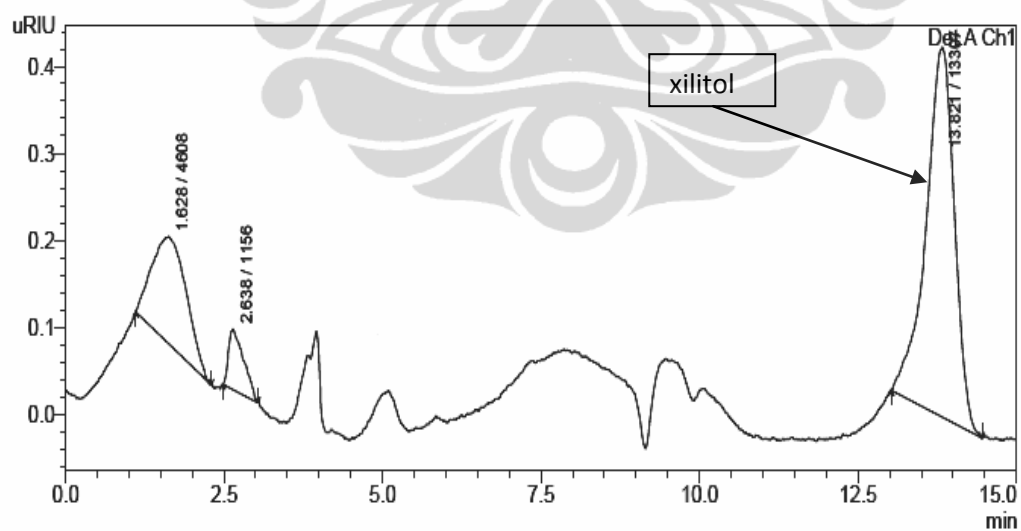
LAMPIRAN 2

Kromatogram Larutan Standart Xilitol

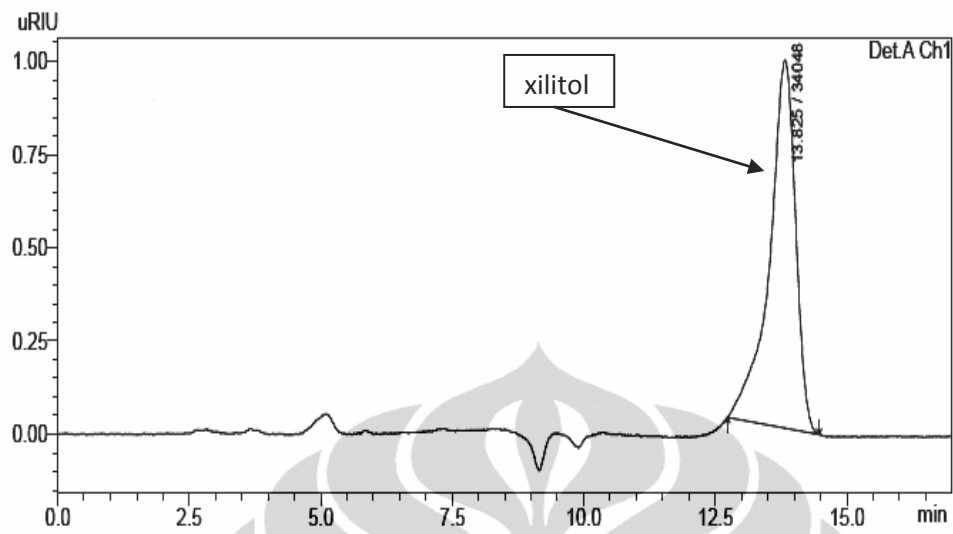
1 Larutan Xilitol 50 ppm



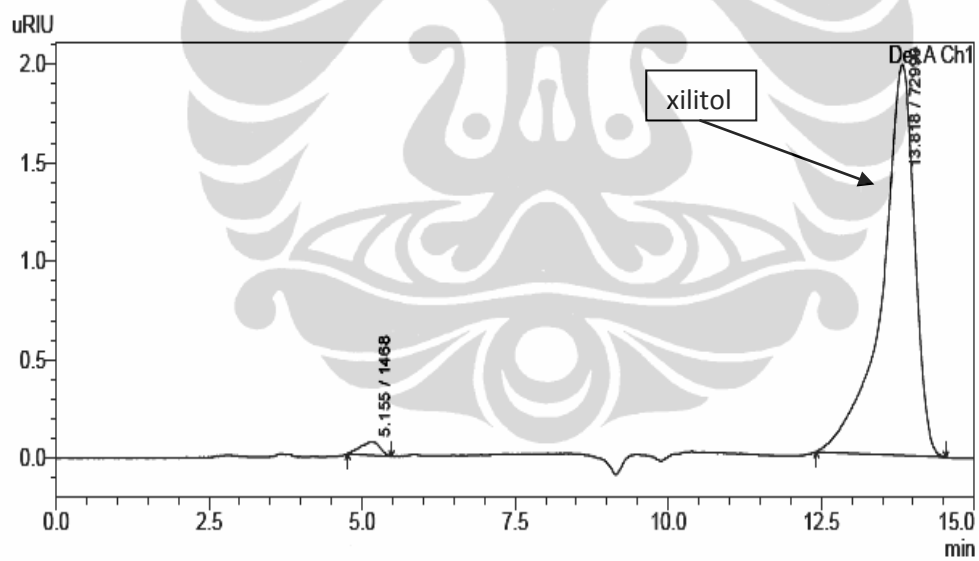
2 Larutan Xilitol 100 ppm



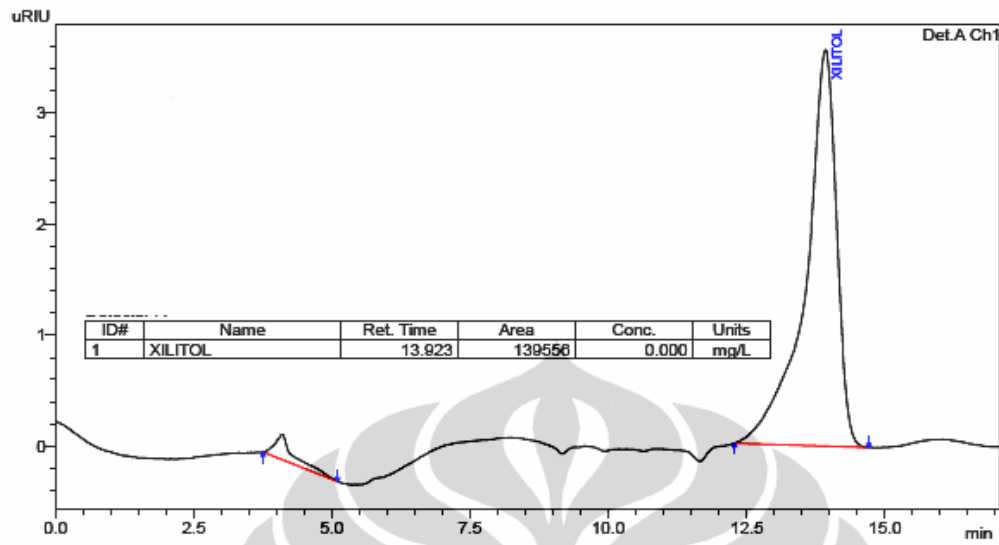
3 Larutan Xilitol 250 ppm



4 Larutan Xilitol 500 ppm



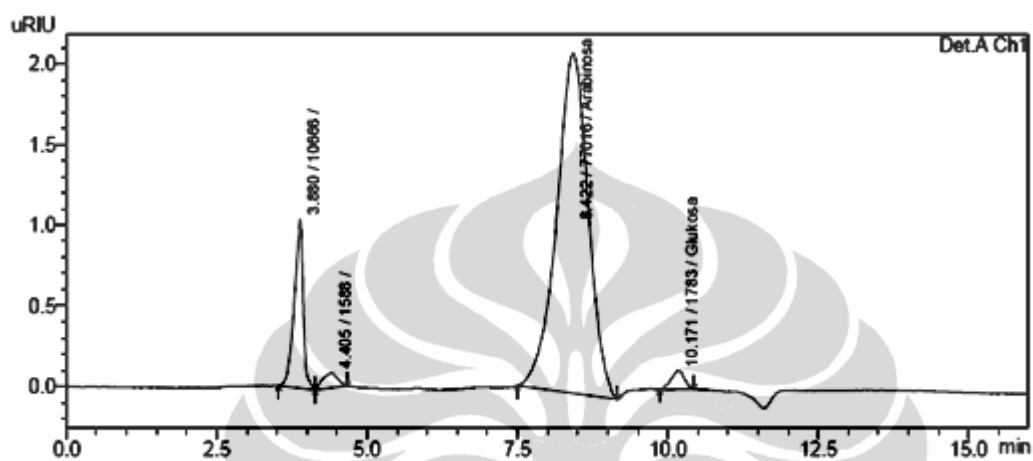
5 Larutan Xilitol 1000 ppm



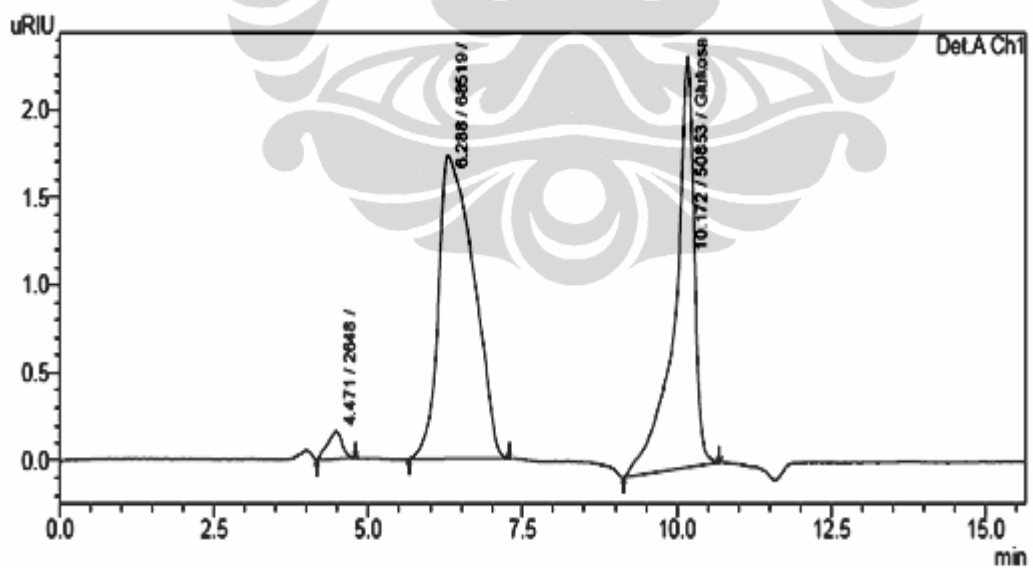
LAMPIRAN 3

Kromatogram Larutan Standar

1 Larutan Arabinosa 500 ppm

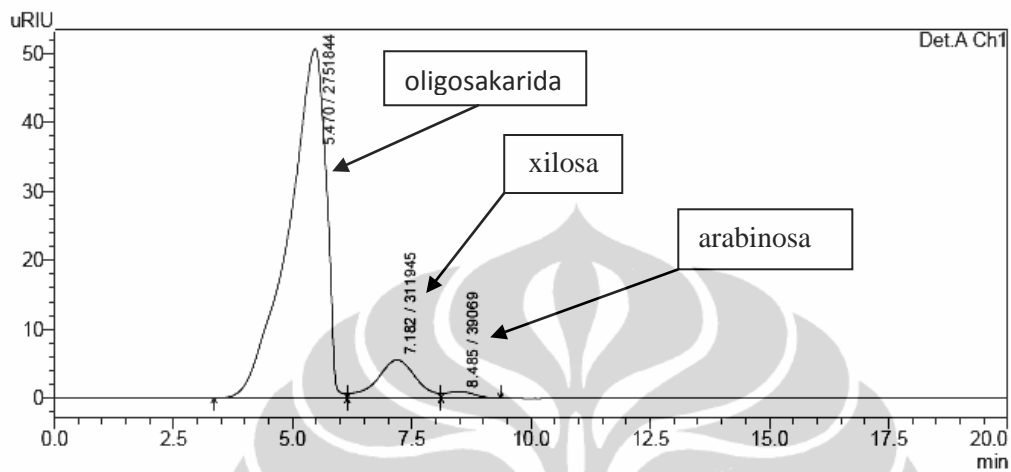


2 Larutan Glukosa 500 ppm

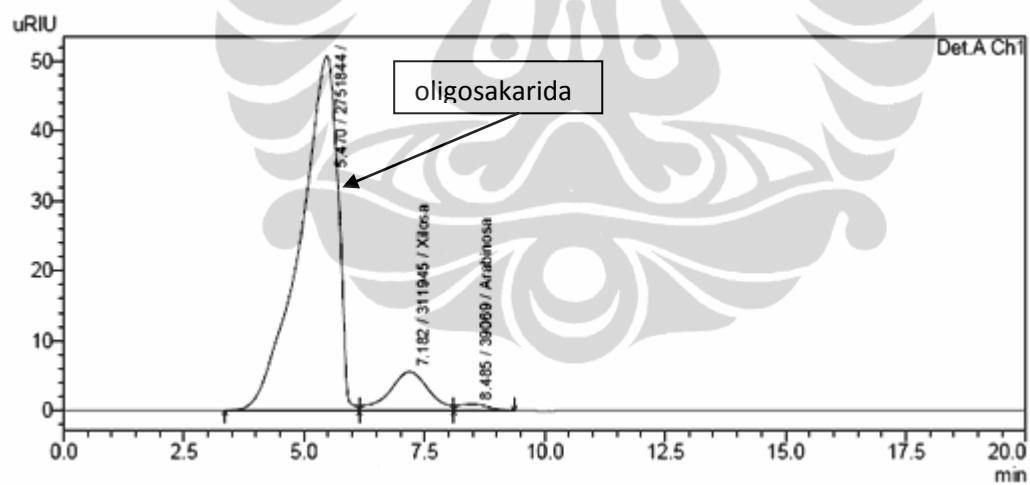


LAMPIRAN 4

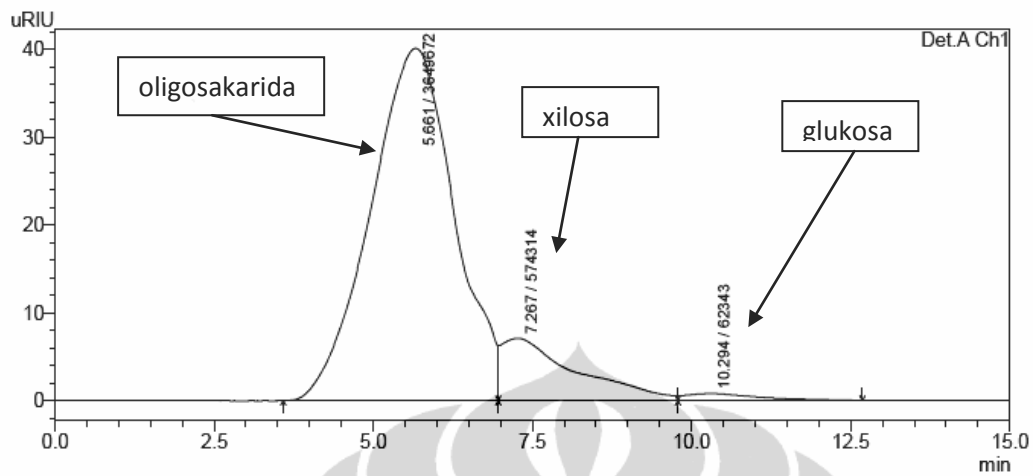
1 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 25 menit.



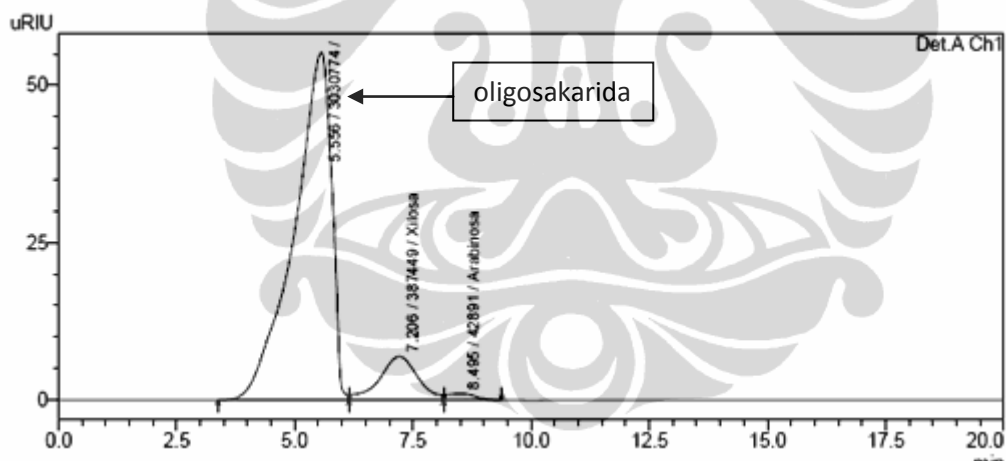
2 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 30 menit.



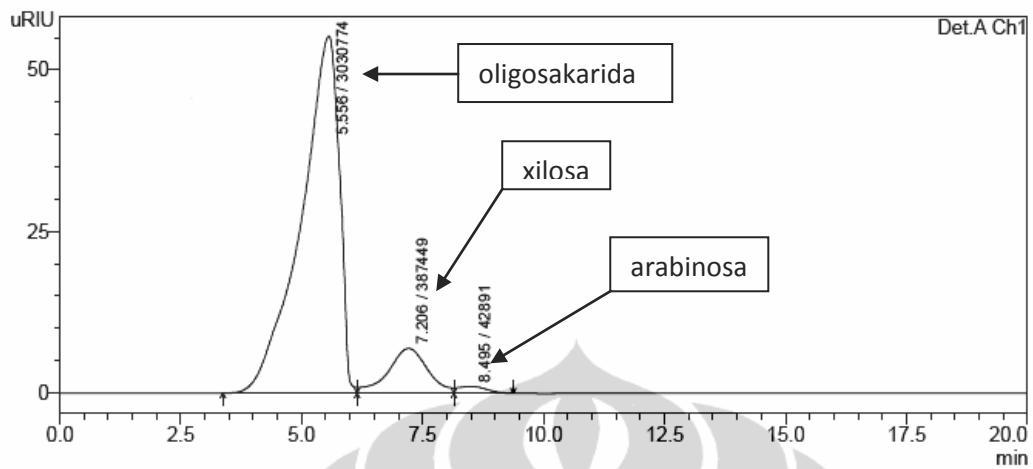
3 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 35 menit.



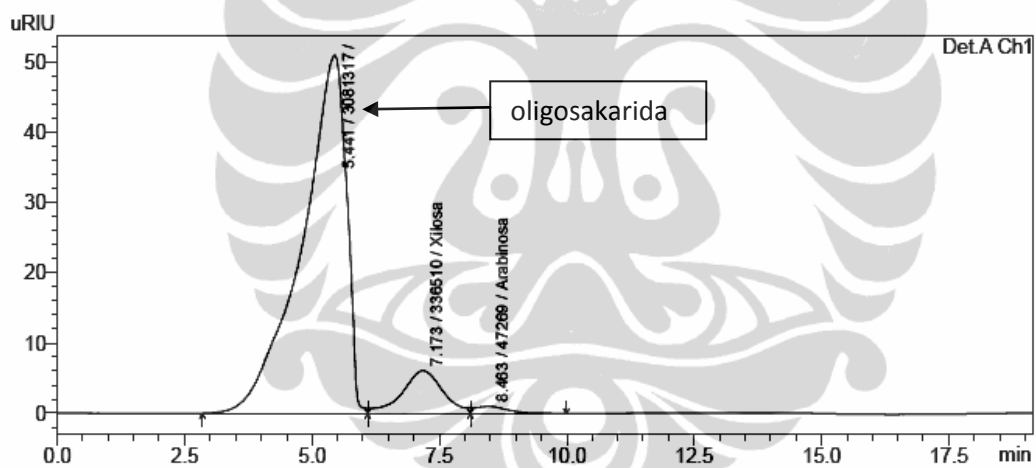
4 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 40 menit.



5 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 45 menit.

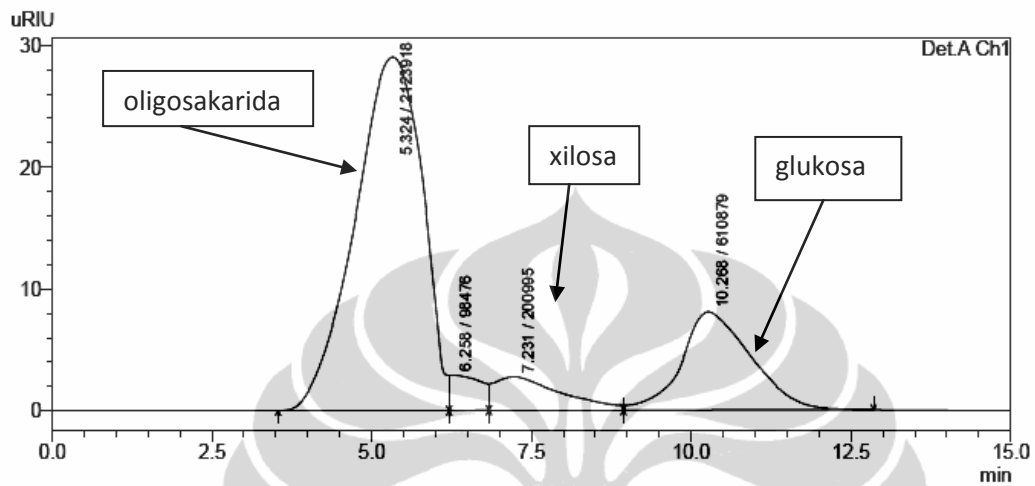


6 Kromatogram Hidrolisis Tangkai 50 menit.

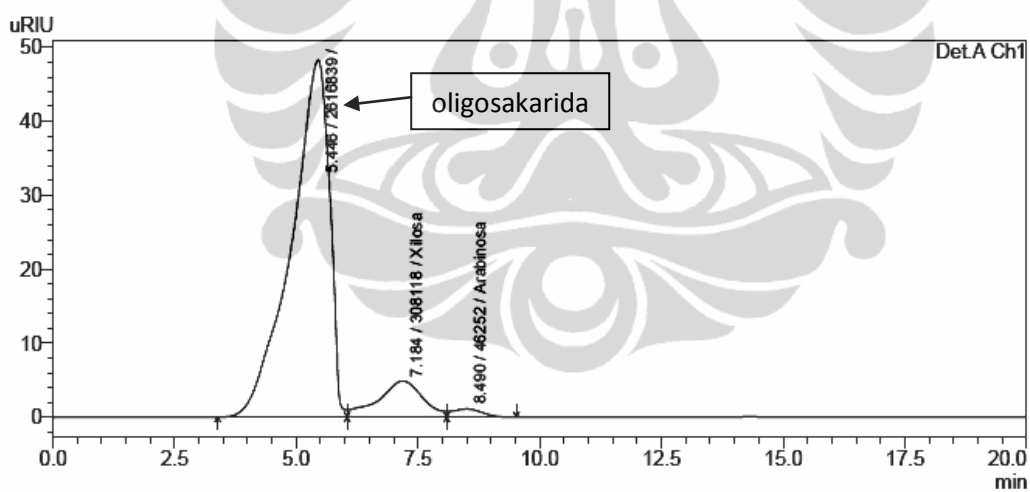


LAMPIRAN 5

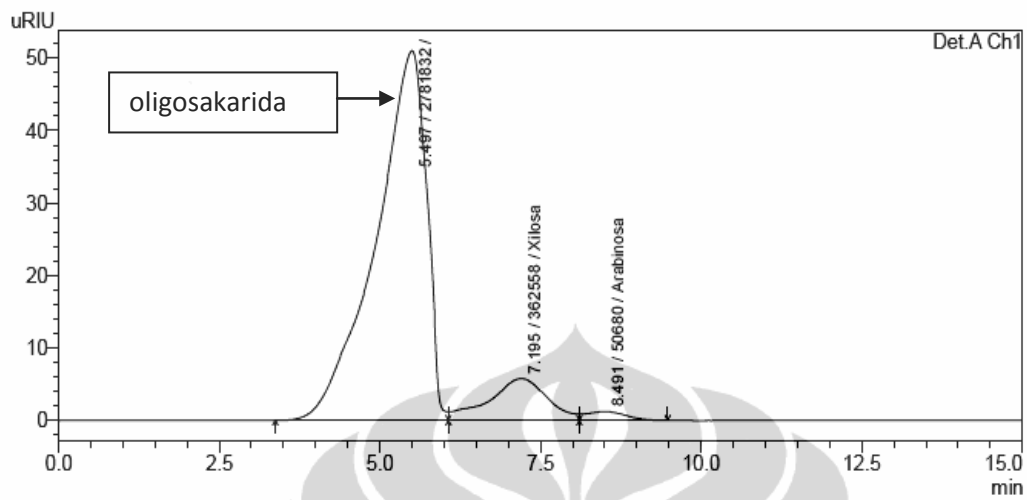
1 Kromatogram Hidrolisis Malai 25 menit



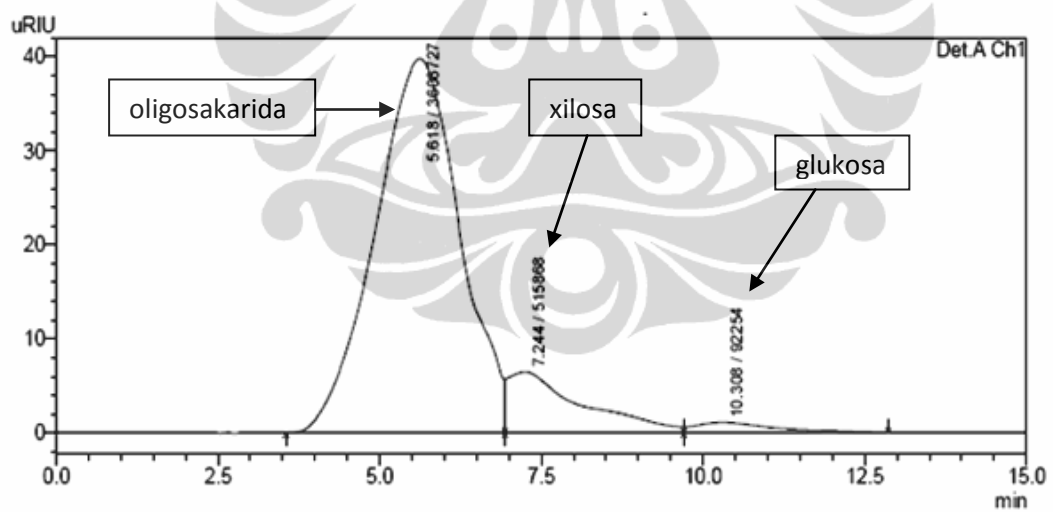
2 Kromatogram Hidrolisis Malai 30 menit.



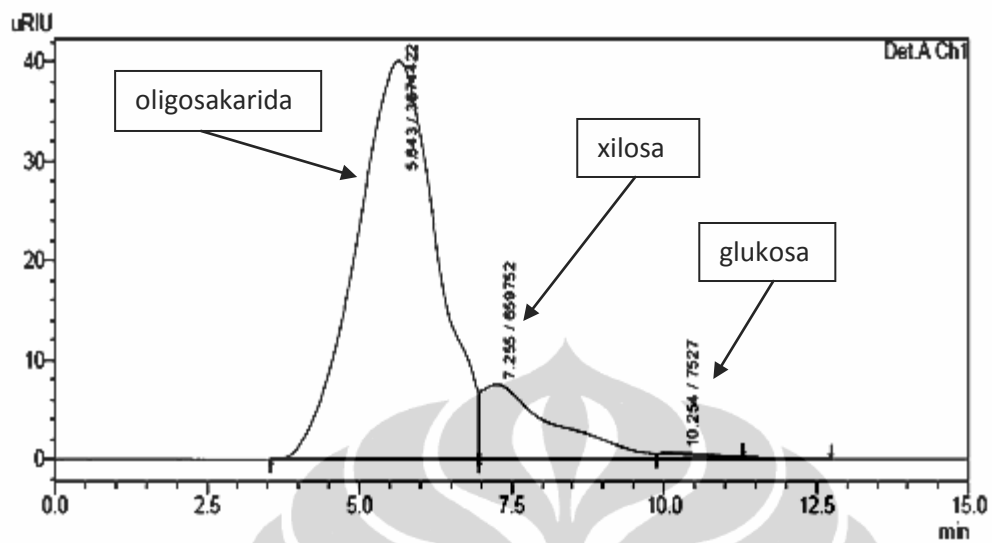
3 Kromatogram Hidrolisat Malai 35 menit



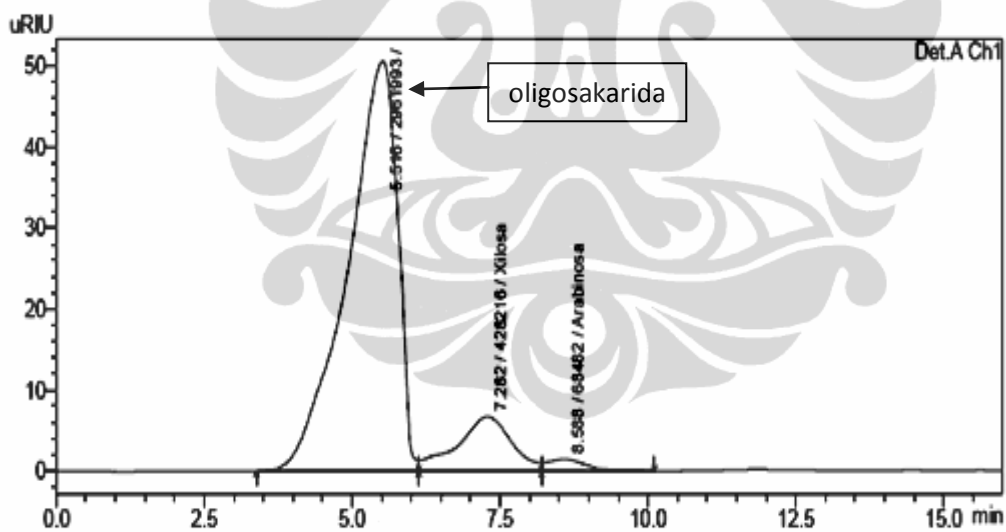
4 Kromatogram Hidrolisat Malai 40 menit.



5 Kromatogram Hidrolisis Malai 45 menit



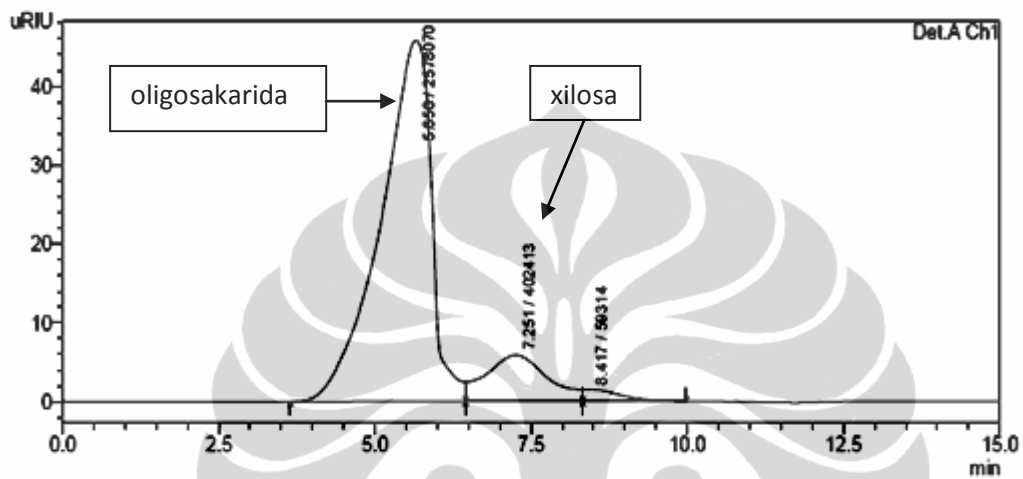
6 Kromatogram Hidrolisis Malai 50 menit.



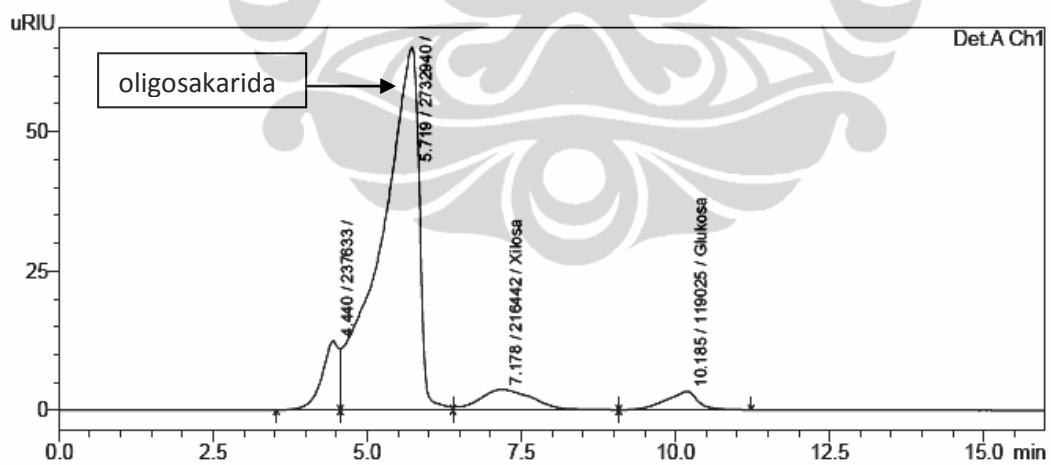
LAMPIRAN 6

Kromatogram xilosa dari hidrolisat tanpa dan dengan detoksifikasi

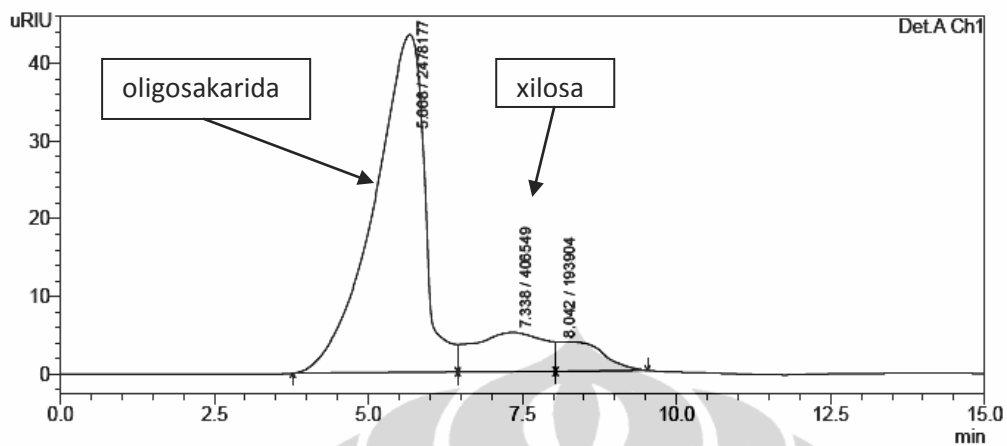
1 Hidrolisat tangkai tanpa detoksifikasi



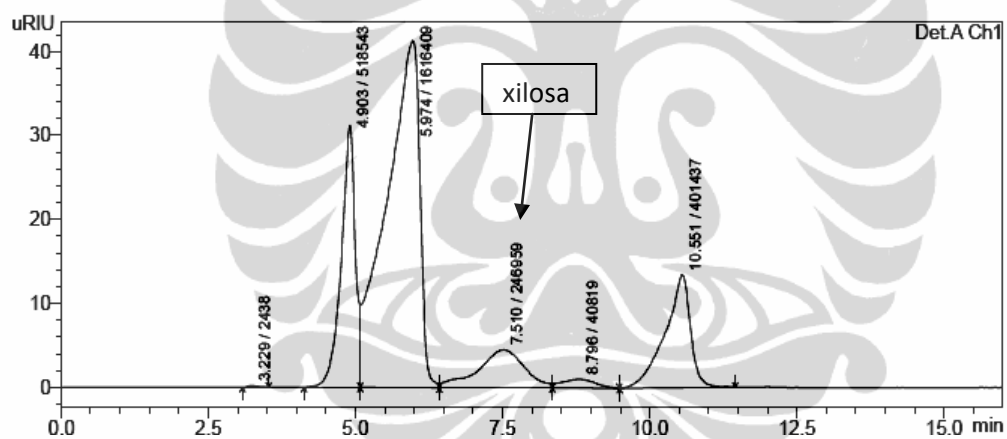
2 Hidrolisat tangkai dengan detoksifikasi



3 Hidrolisat malai tanpa detoksifikasi



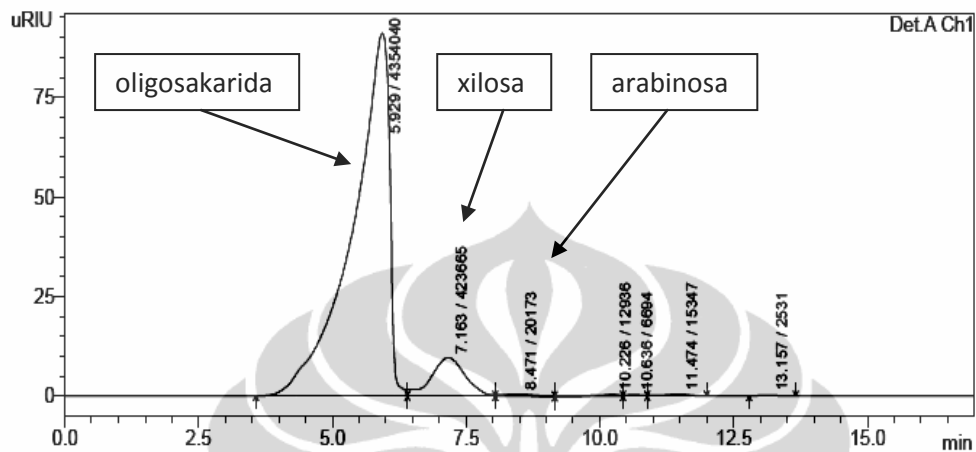
4 Hidrolisat malai dengan detoksifikasi



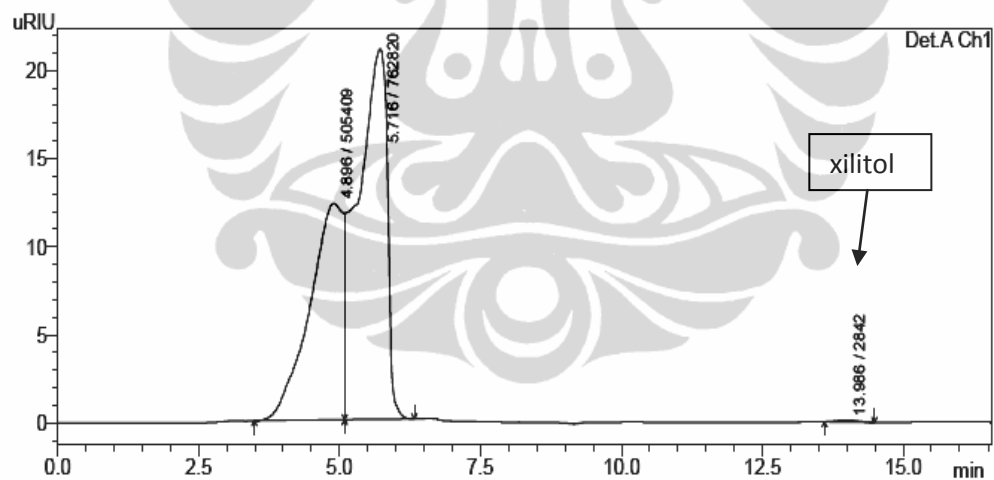
LAMPIRAN 7

Kromatogram hasil fermentasi tangkai per 12 jam.

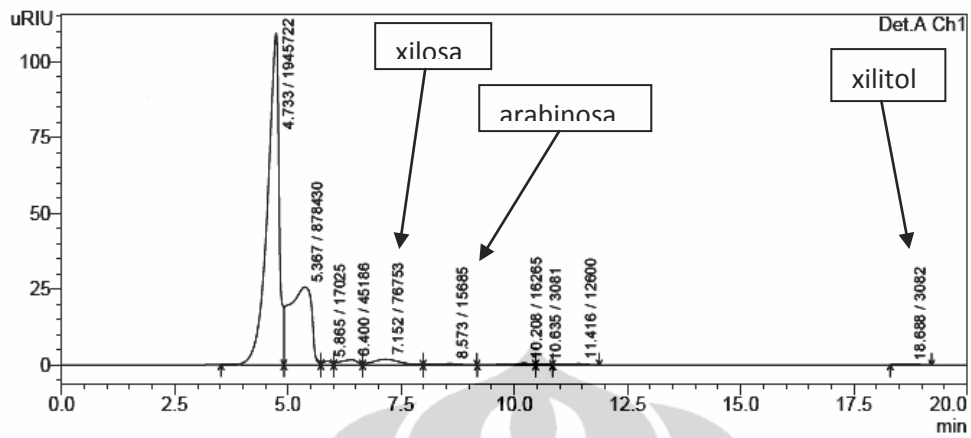
1 Hidrolisat Tangkai



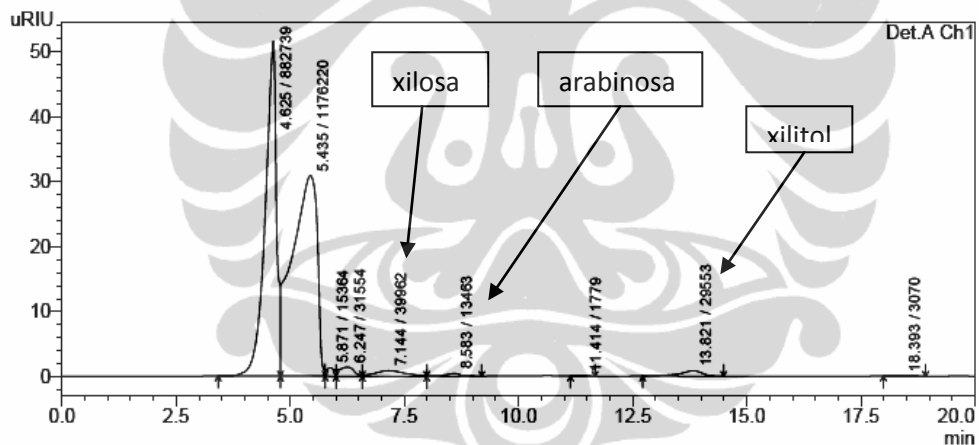
2 Media Fermentasi



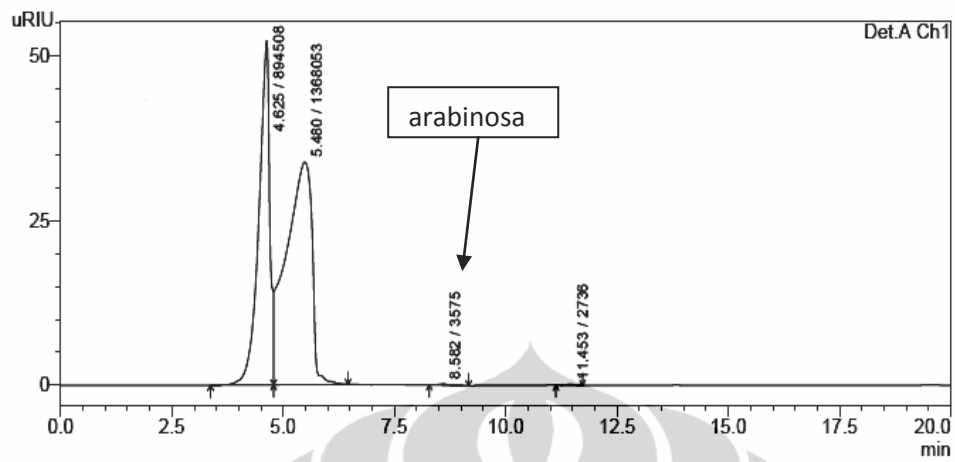
3 Hasil Fermentasi Tangkai 0 jam



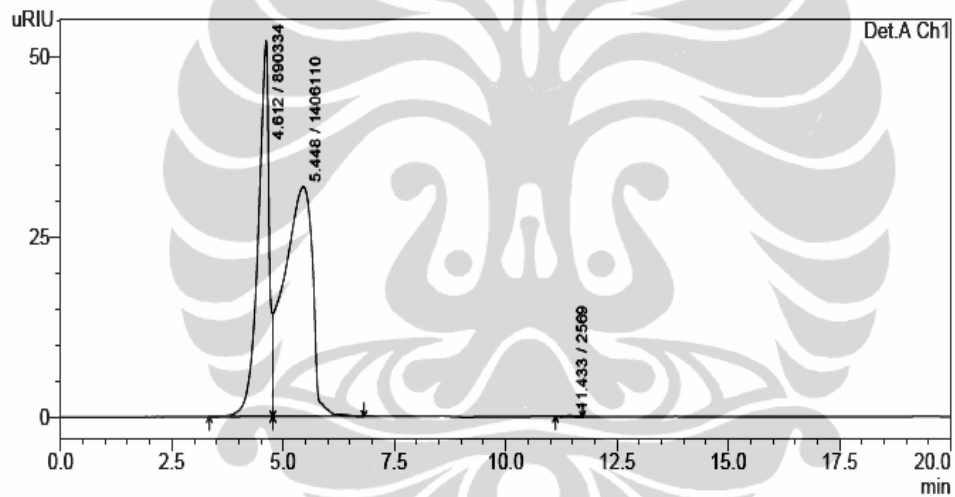
4 Hasil Fermentasi Tangkai 12 jam



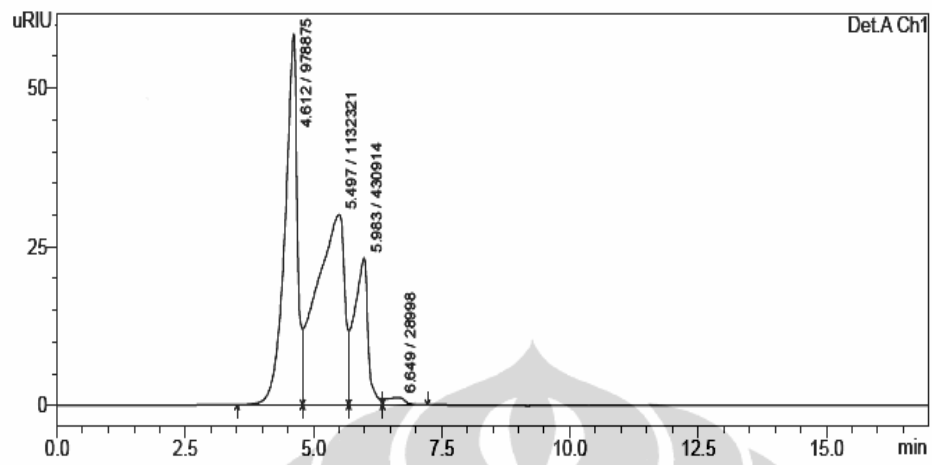
5 Hasil Fermentasi Tangkai 24 jam



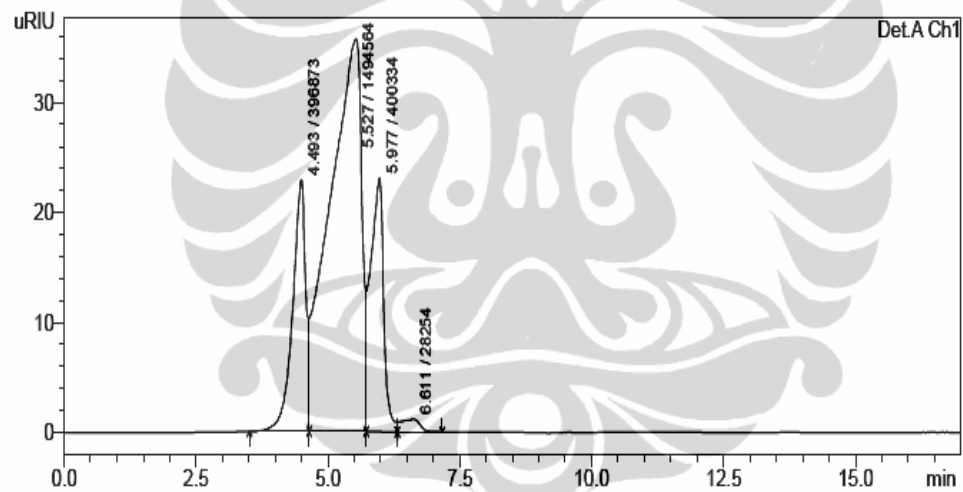
6 Hasil Fermentasi Tangkai 36 jam



7 Hasil Fermentasi Tangkai 48 jam



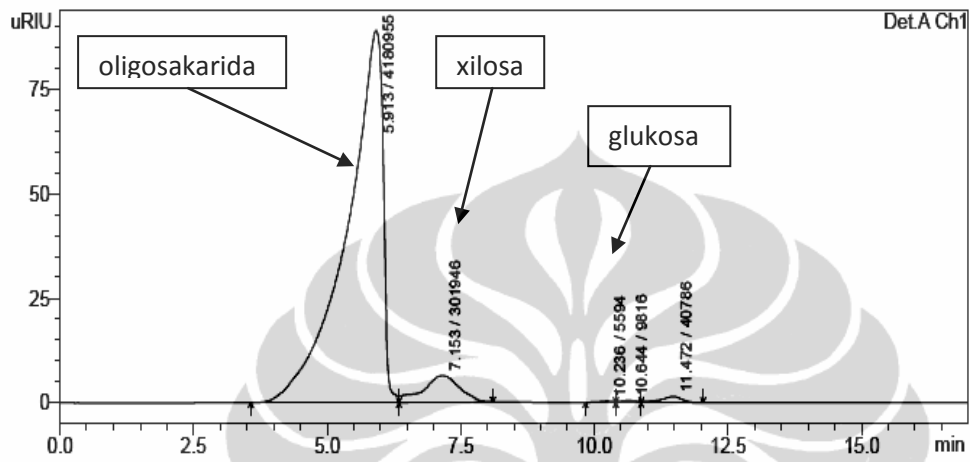
8 Hasil Fermentasi Tangkai 60 jam



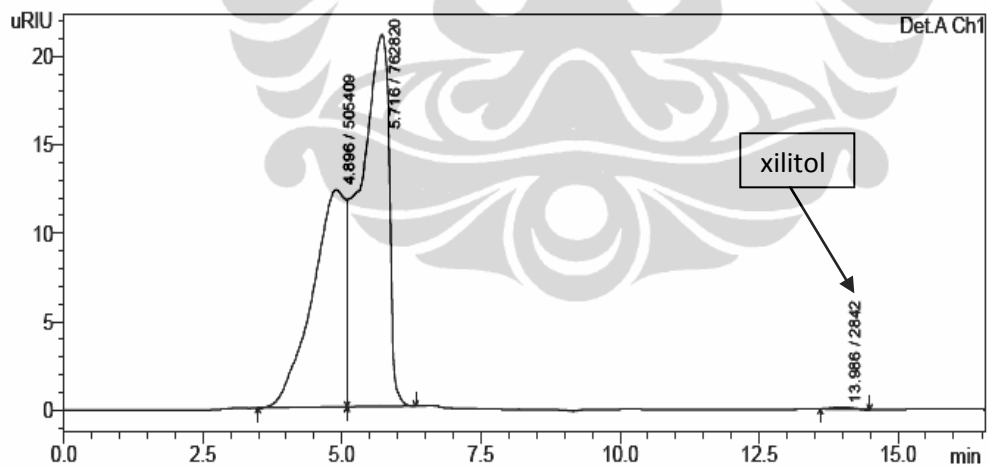
LAMPIRAN 8

Kromatogram hasil fermentasi hidrolisat malai per 12 Jam

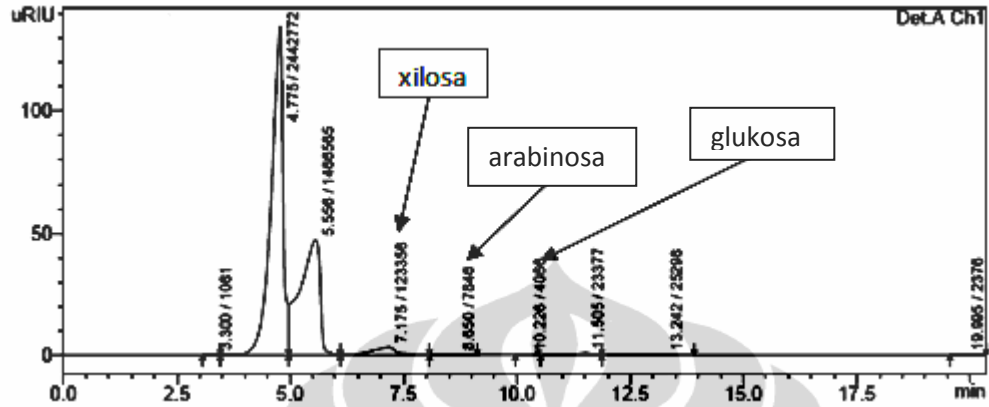
1 Kromatogram hidrolisat malai



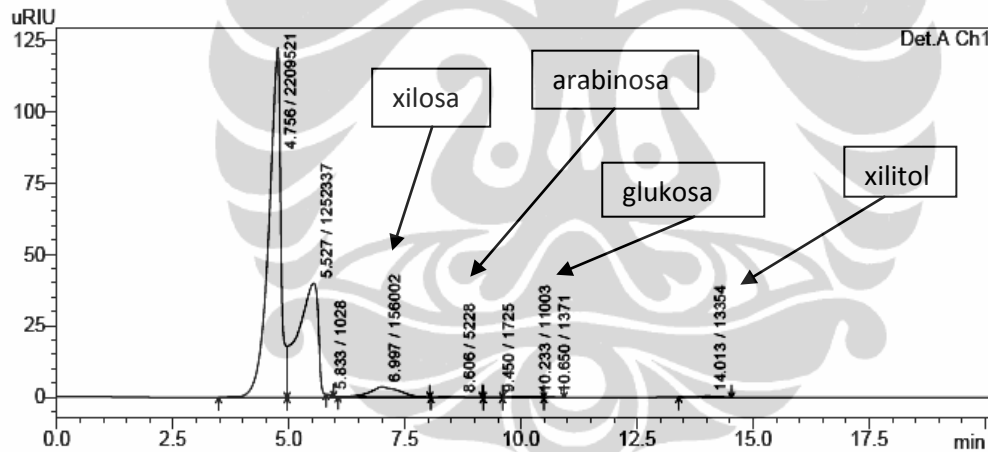
2 Kromatogram media starter



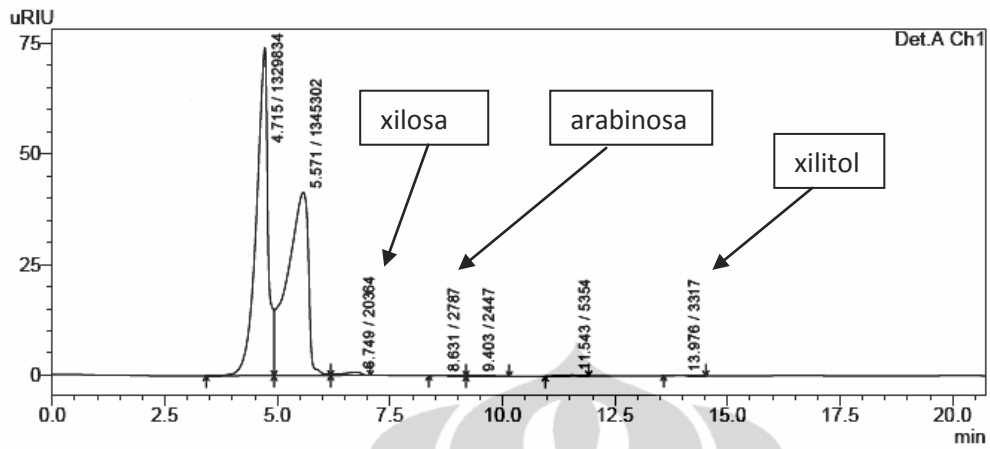
3 Kromatogram hasil fermentasi malai 0 jam



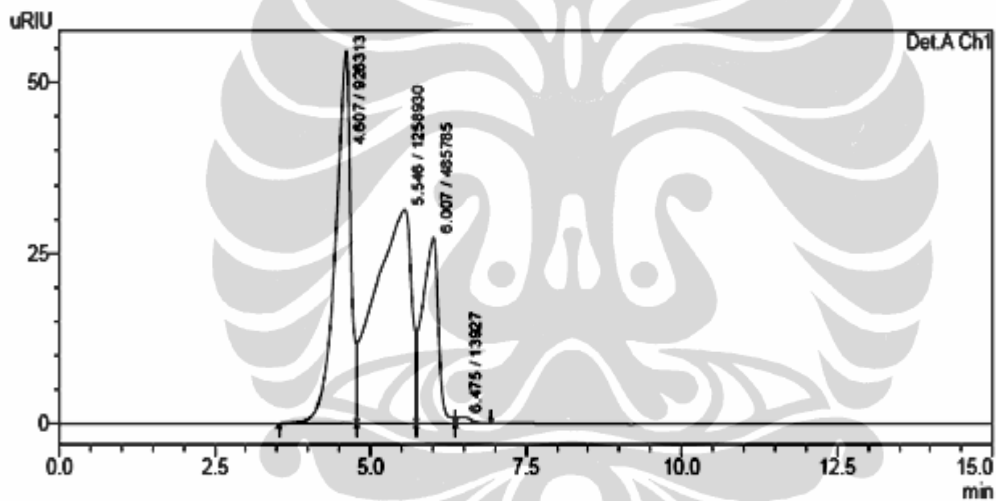
4 Kromatogram hasil fermentasi malai 12 jam



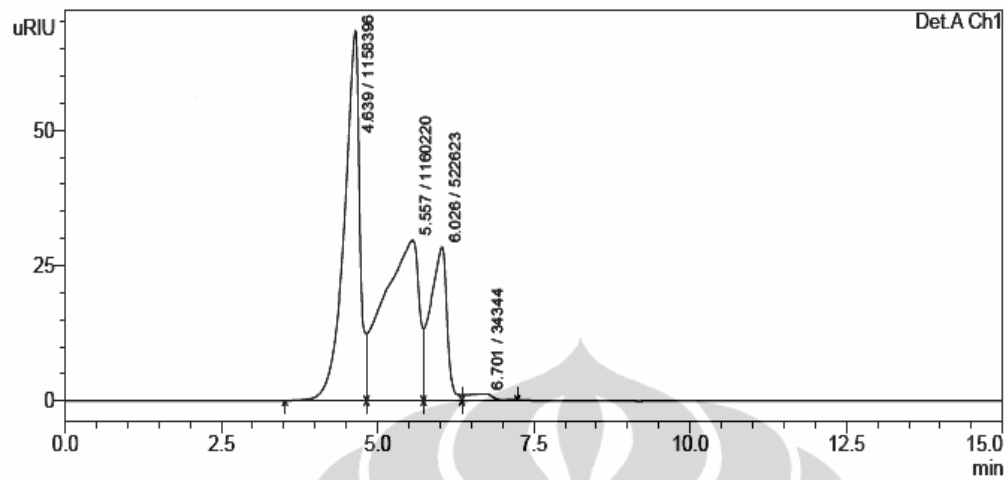
5 Kromatogram hasil fermentasi malai 24 jam



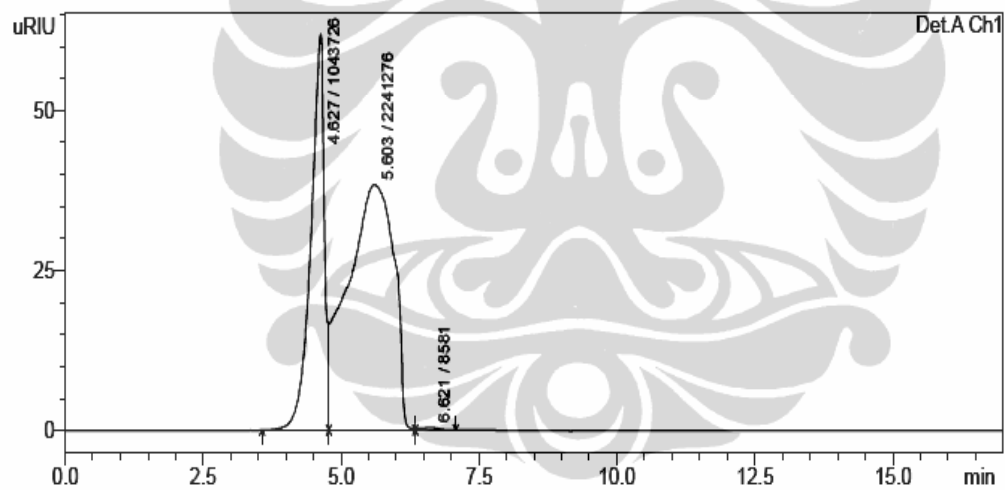
6 Kromatogram hasil fermentasi malai 36 jam



7 Kromatogram hasil fermentasi malai 48 jam



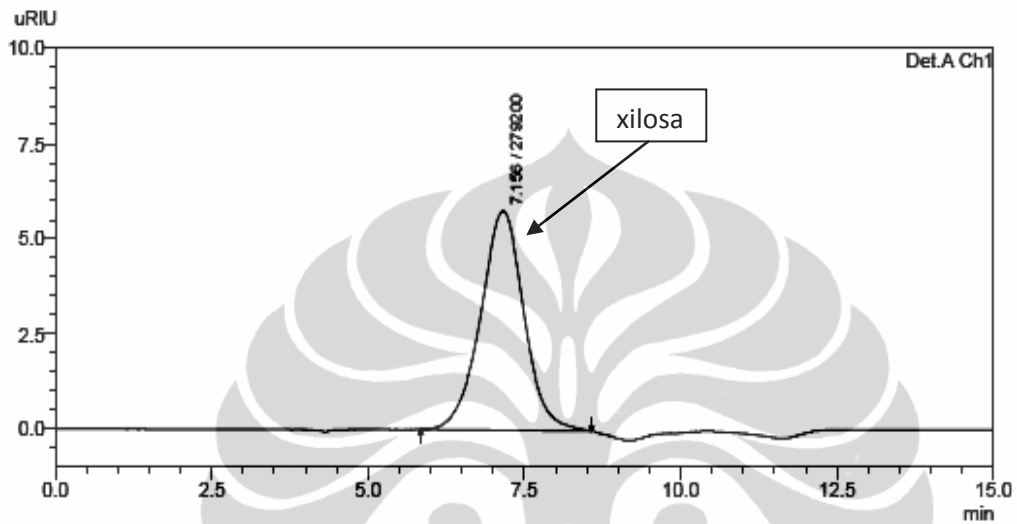
8 Kromatogram hasil fermentasi malai 60 jam



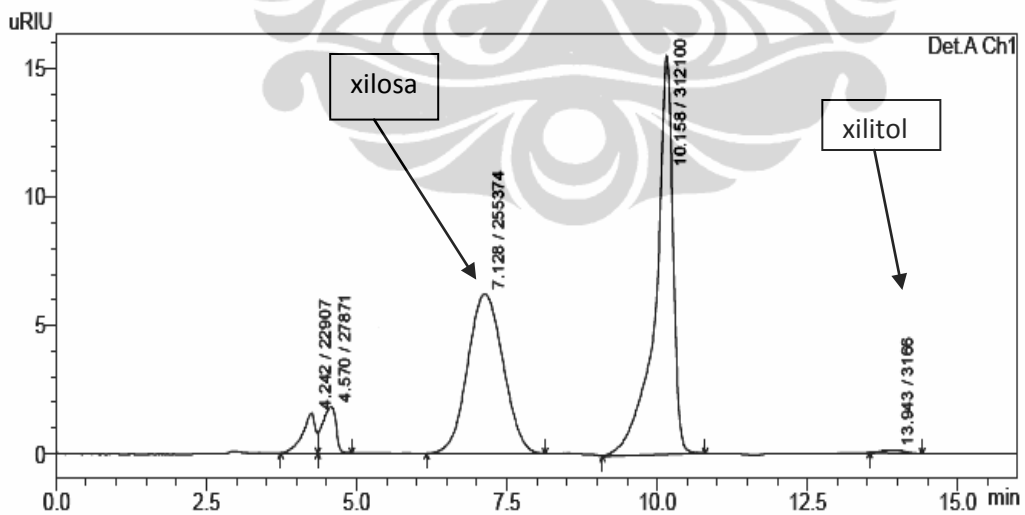
LAMPIRAN 9

Kromatogram hasil fermentasi xilosa murni 2000 ppm

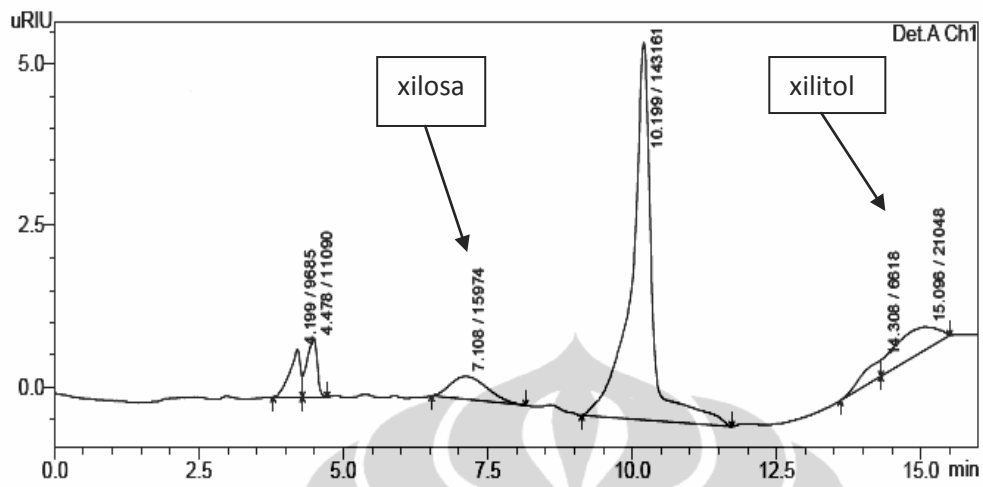
1 Kromatogram hasil fermentasi xilosa 0 jam.



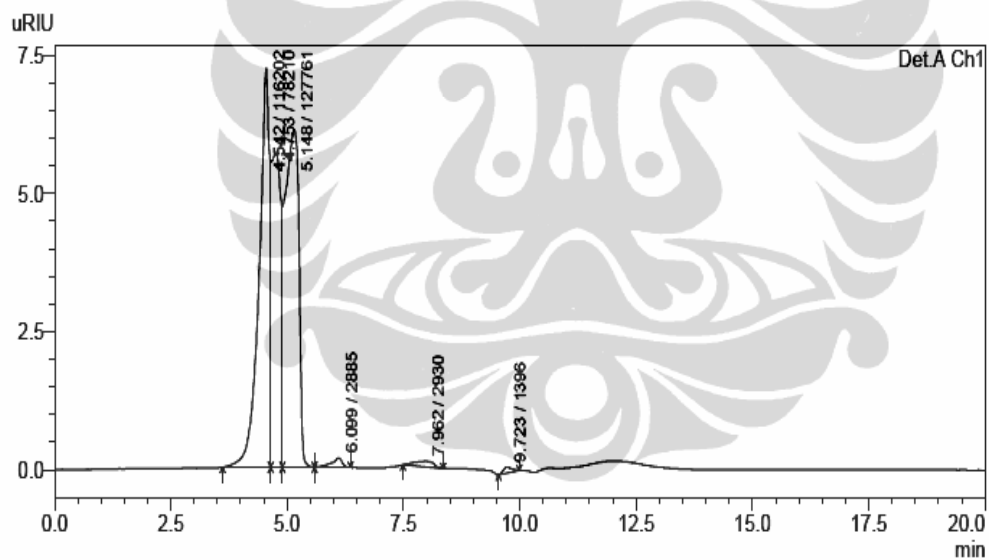
2 Kromatogram hasil fermentasi xilosa 6 jam



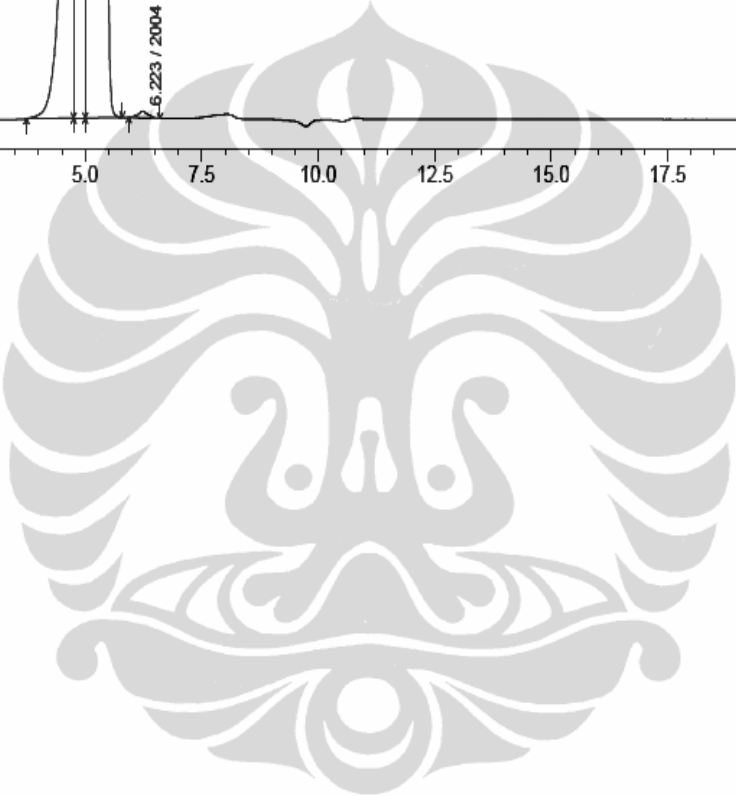
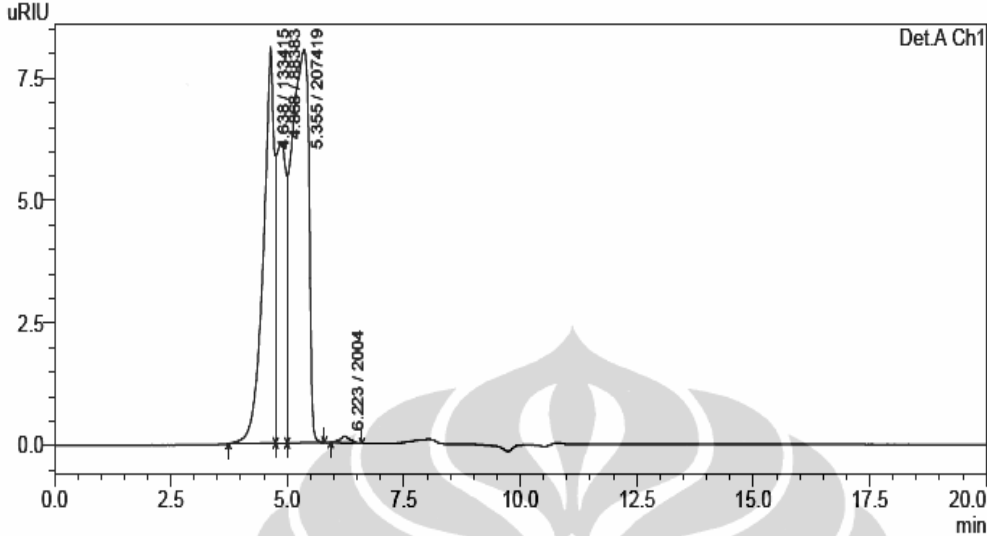
3 Kromatogram hasil fermentasi xilosa 12 jam



4 Kromatogram hasil fermentasi xilosa 18 jam



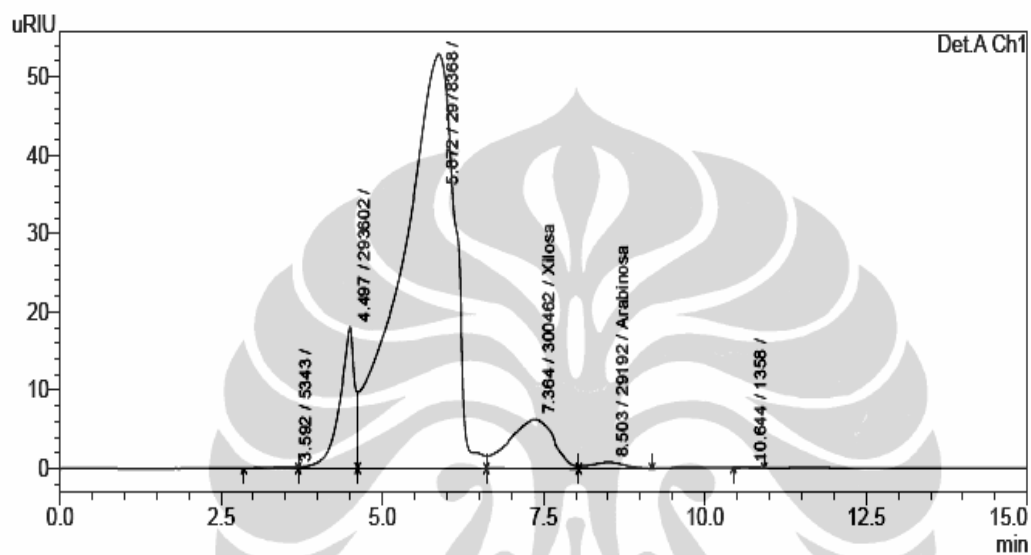
5 Kromatogram hasil fermentasi xilosa 24 jam



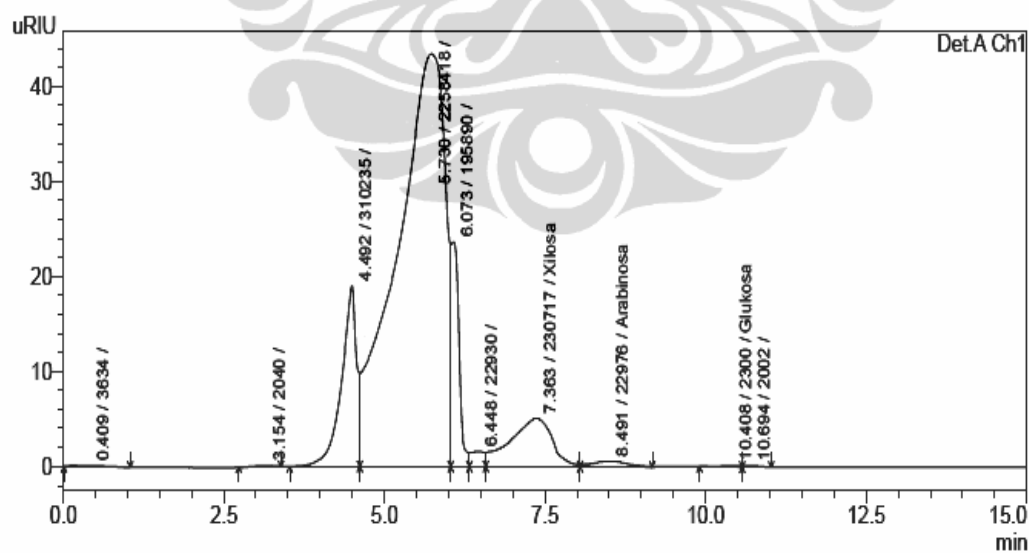
LAMPIRAN 10

Kromatogram hasil fermentasi per 6 jam hidrolisat tangkai dengan penambahan D(-) arabinosa

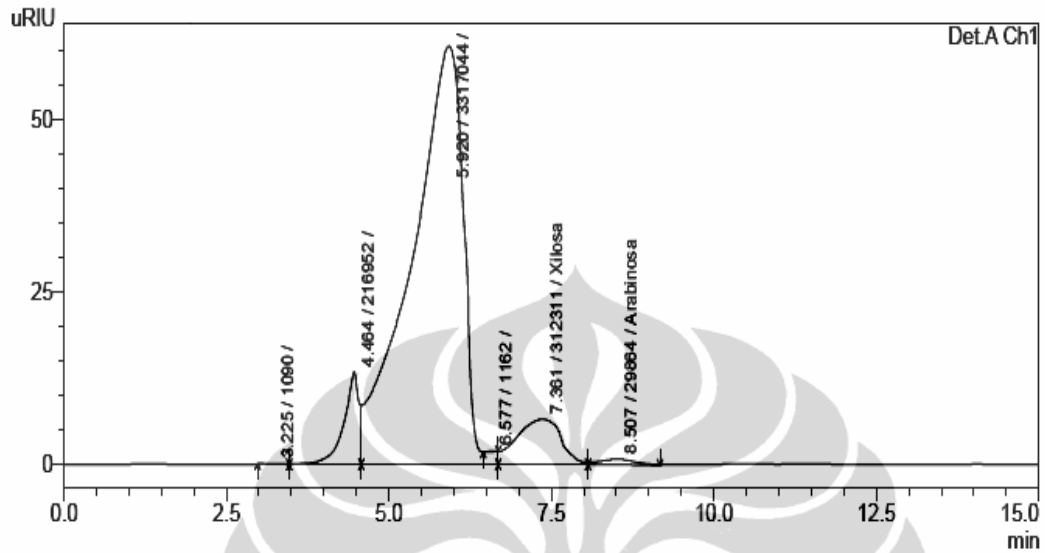
1 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat tangkai + 0 ppm D(-) arabinosa



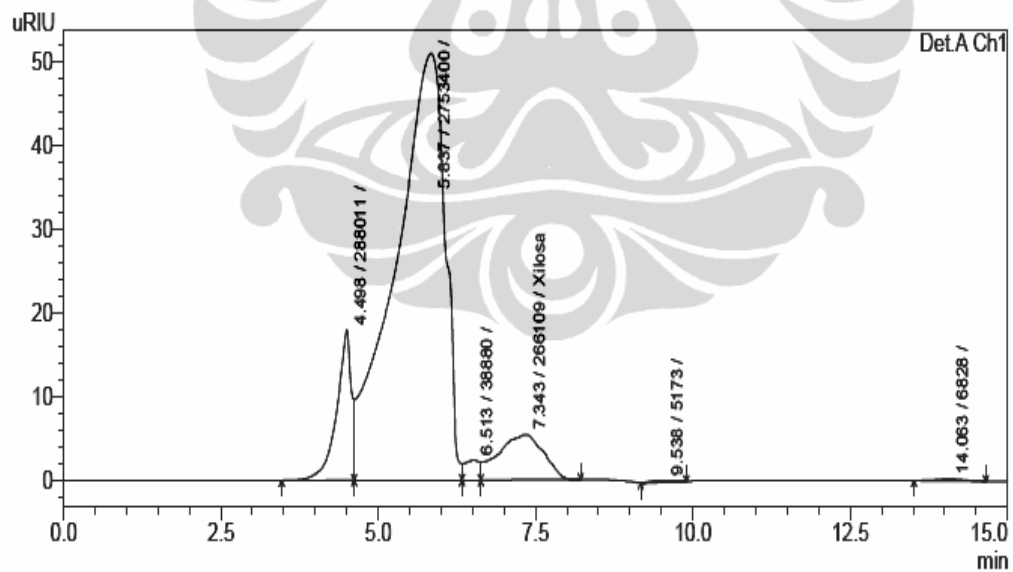
2 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat tangkai + 100 ppm D(-) arabinosa



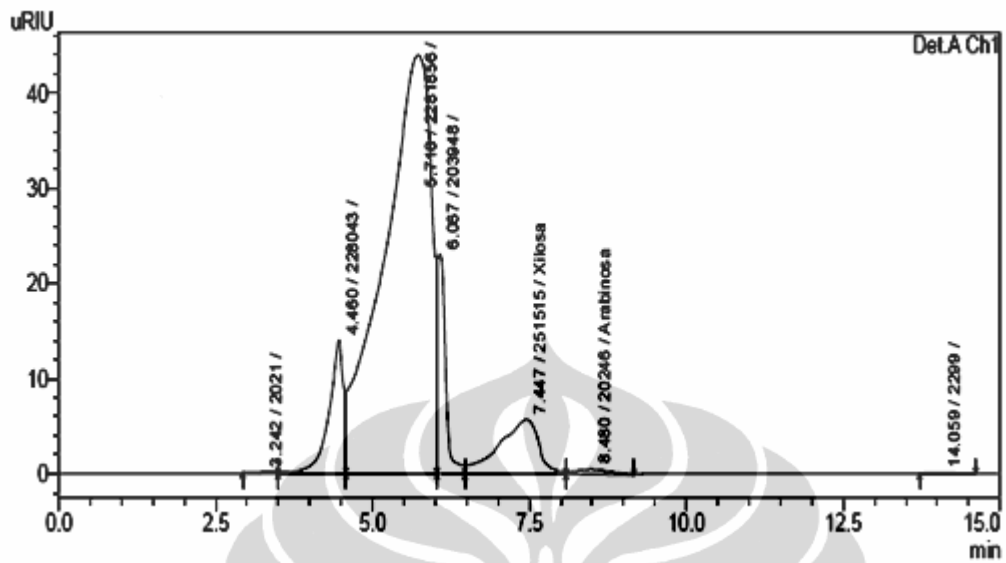
3 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat tangkai + 200 ppm D(-) arabinosa



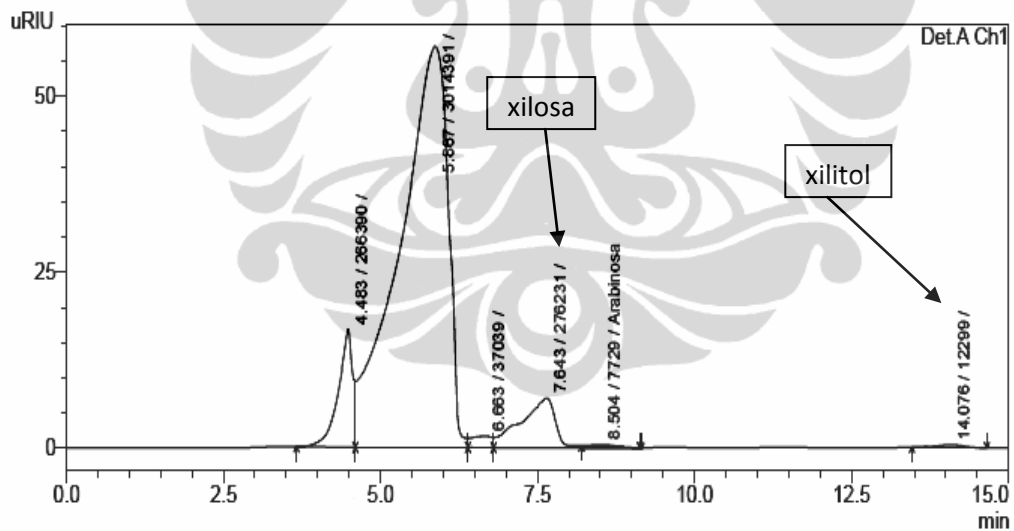
4 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat tangkai + 0 ppm D(-) arabinosa



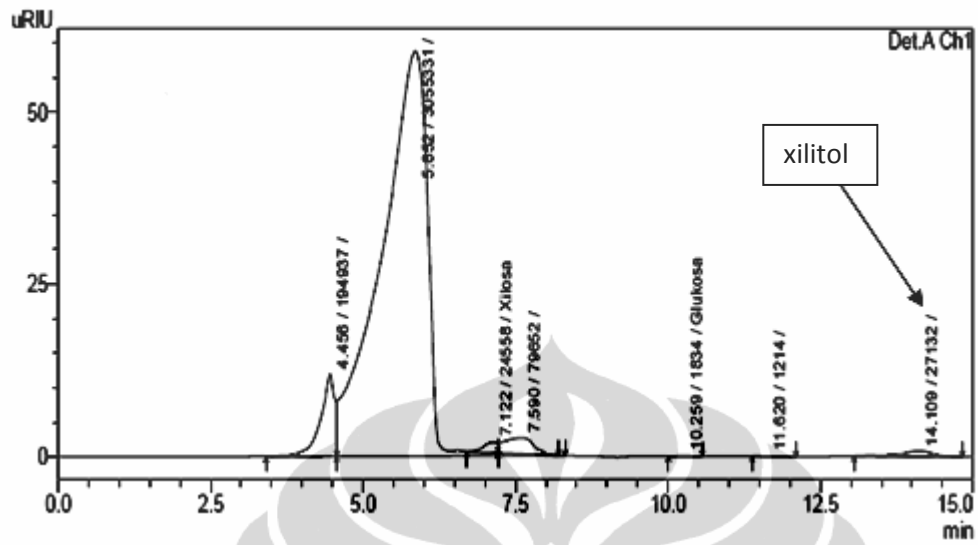
5 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat tangkai + 100 ppm D(-) arabinosa



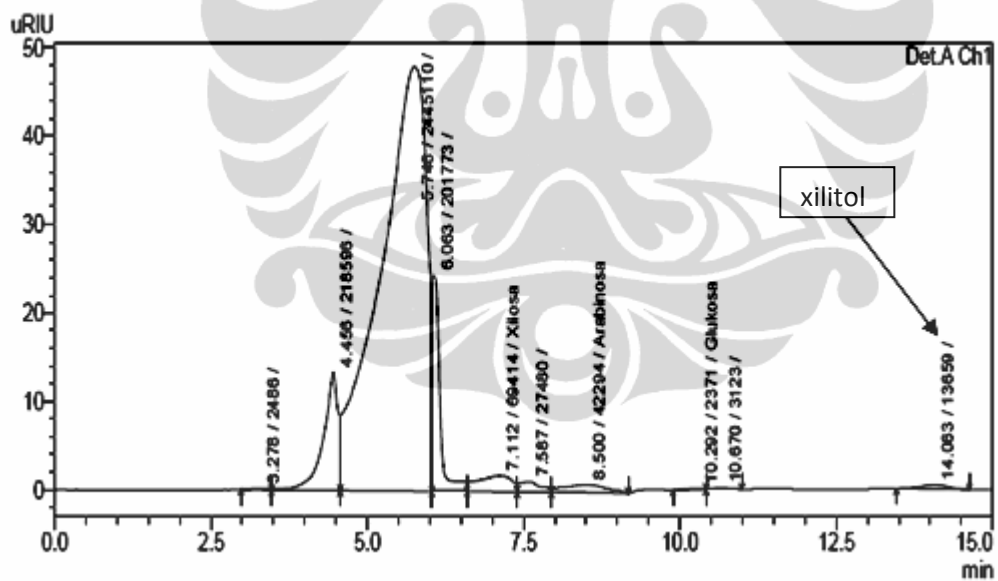
6 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat tangkai + 200 ppm D(-) arabinosa



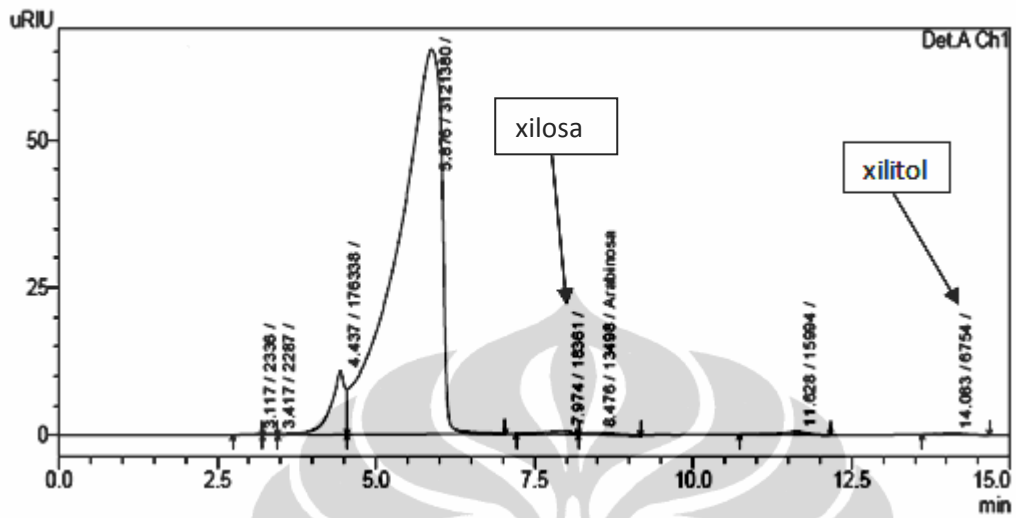
7 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat tangkai + 0 ppm D(-) arabinosa



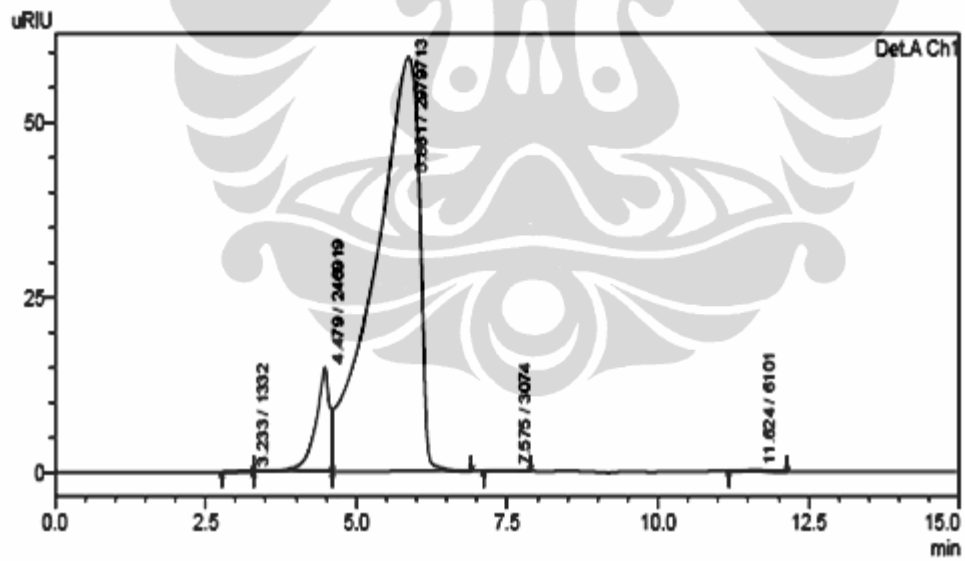
8 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat tangkai + 100 ppm D(-) arabinosa



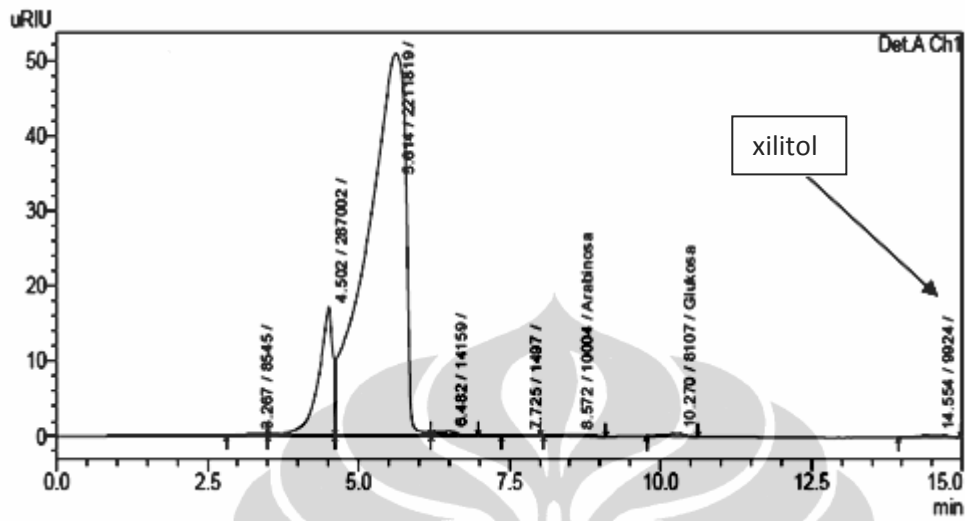
9 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat tangkai + 200 ppm D(-) arabinosa



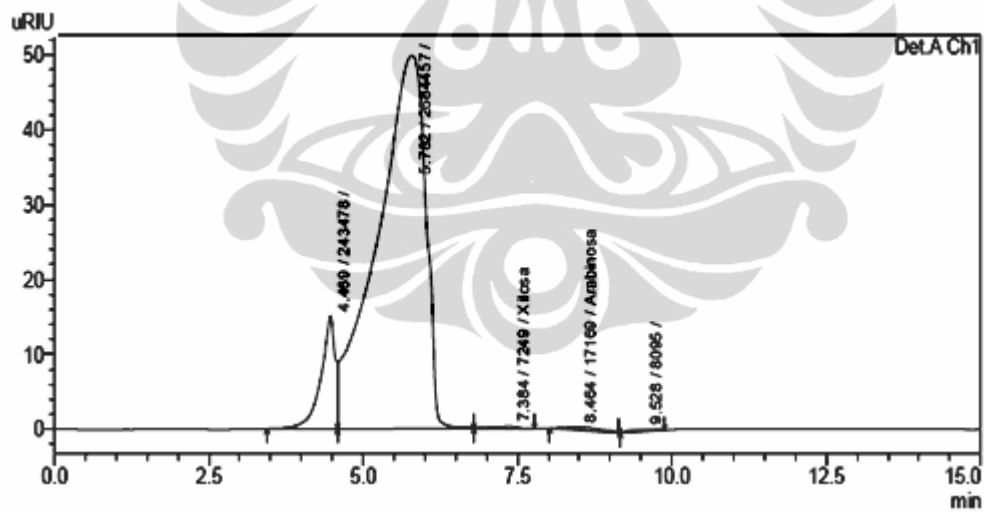
10 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat tangkai + 0 ppm D(-) arabinosa



11 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat tangkai + 100 ppm D(-) arabinosa



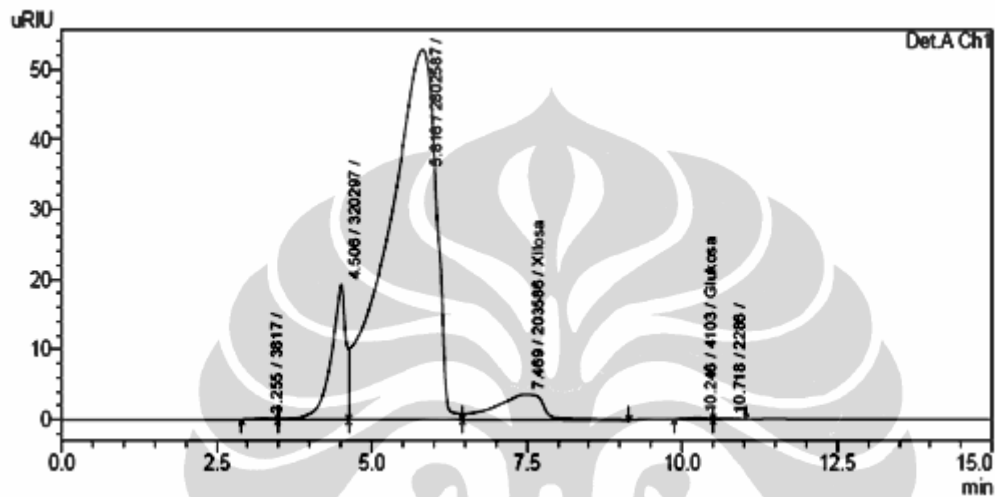
12 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat tangkai + 200 ppm D(-) arabinosa



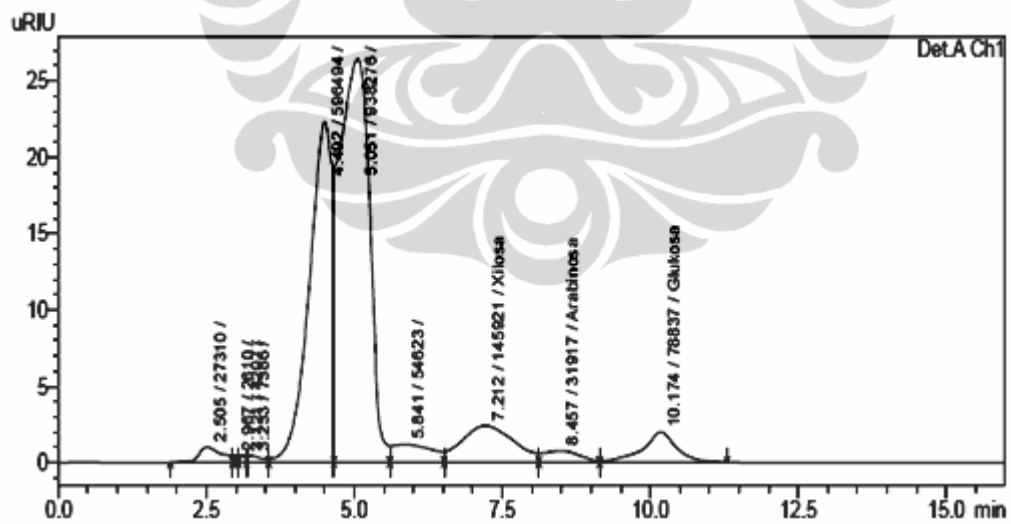
LAMPIRAN 11

Kromatogram hasil fermentasi per 6 jam hidrolisat malai dengan penambahan arabinosa

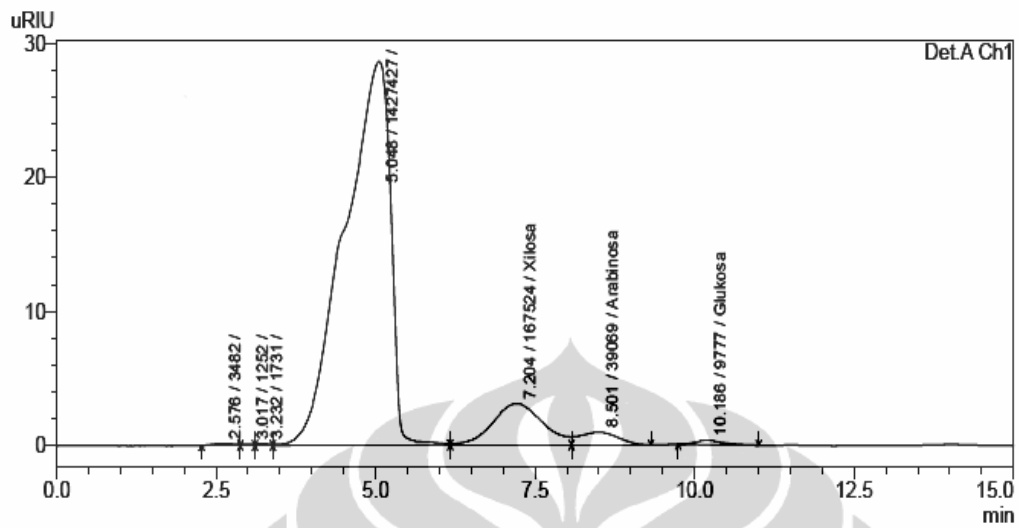
- 1 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat malai + 0 ppm D(-) arabinosa



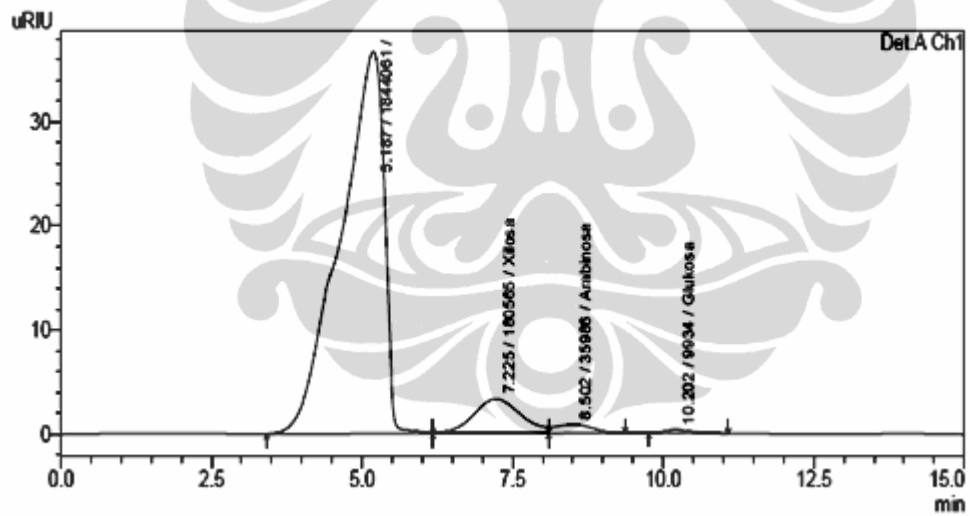
- 2 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat malai + 90 ppm D(-) arabinosa



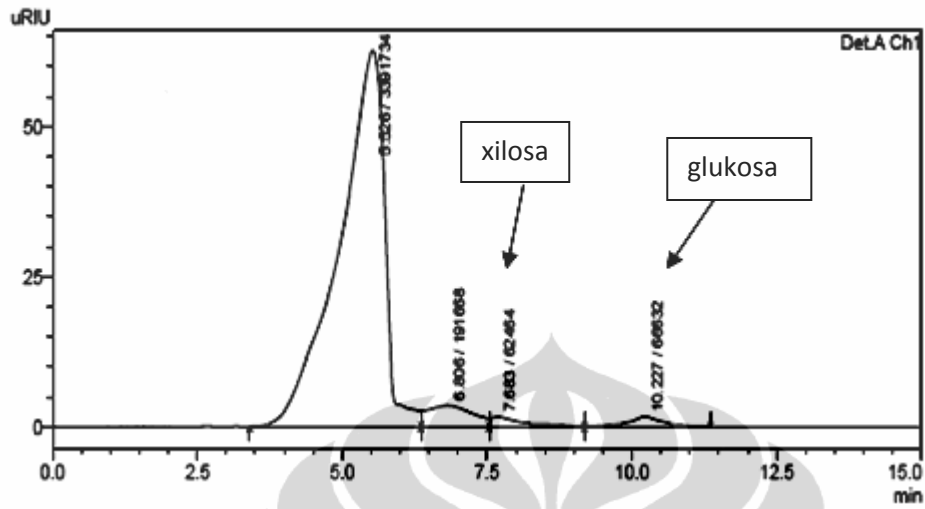
3 Kromatogram fermentasi 0 jam hidrolisat malai + 180 ppm D(-) arabinosa



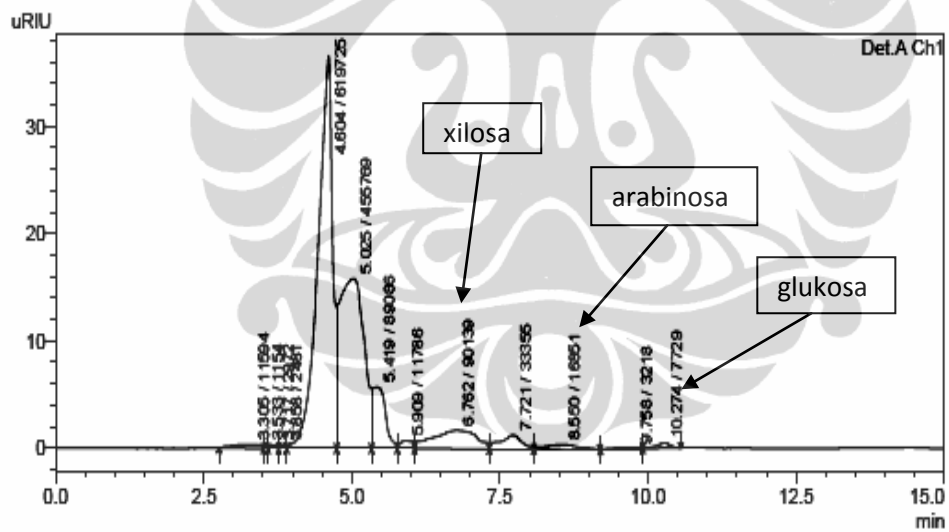
4 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat malai + 0 ppm D(-) arabinosa



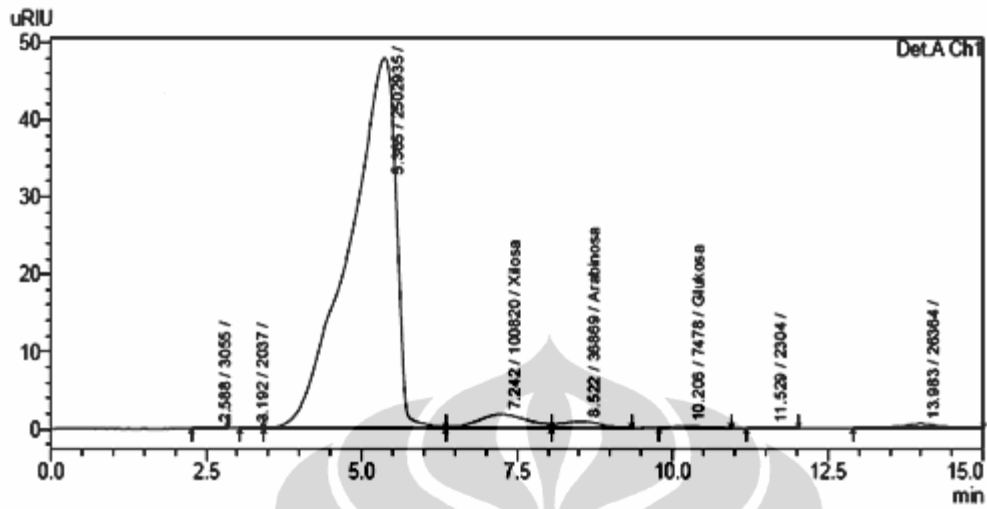
5 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat malai + 90 ppm D(-) arabinosa



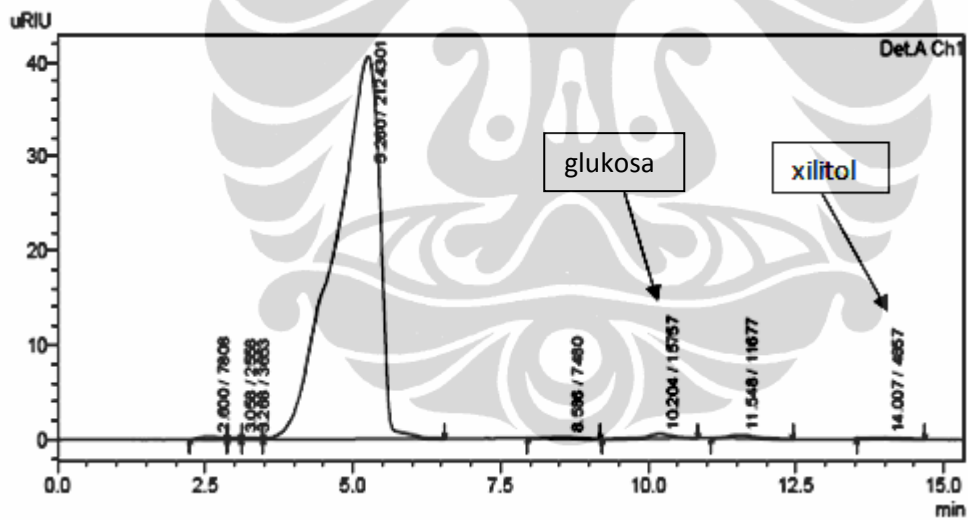
6 Kromatogram fermentasi 6 jam hidrolisat malai + 180 ppm D(-) arabinosa



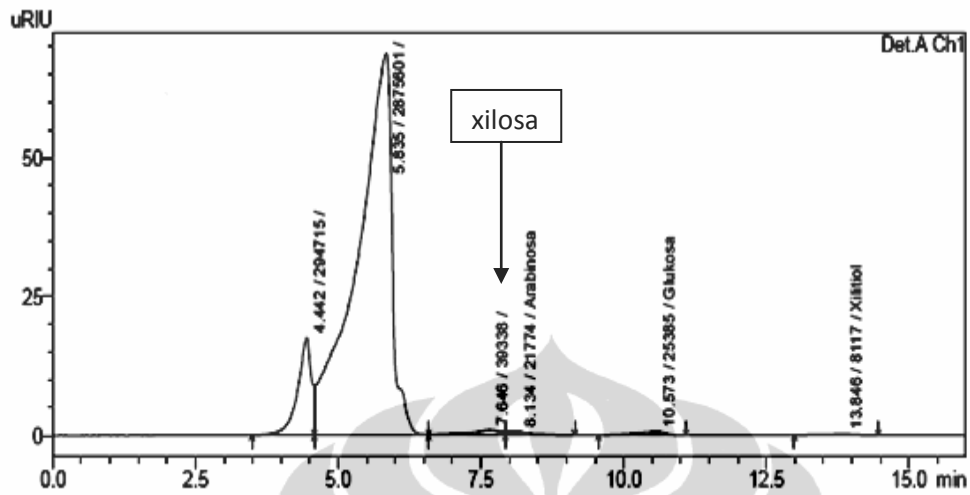
7 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat malai + 0 ppm D(-) arabinosa



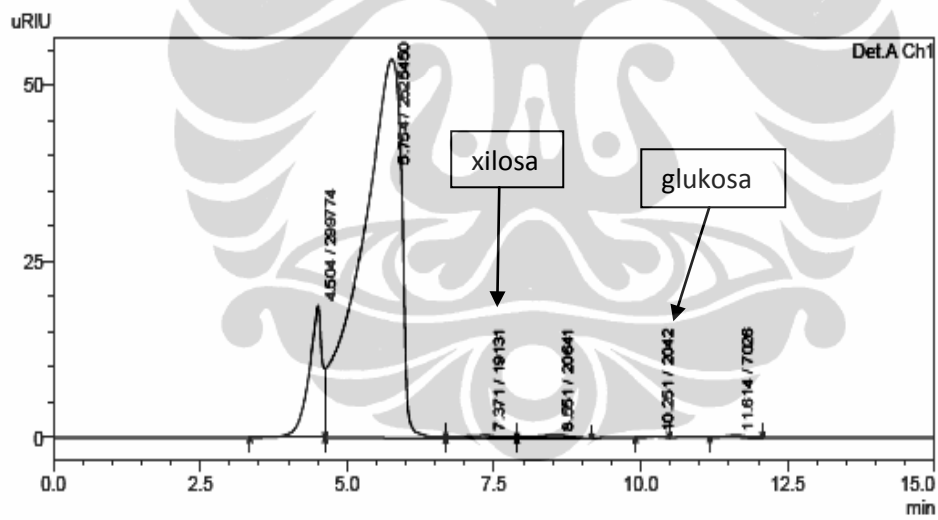
8 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat malai + 90 ppm D(-) arabinosa



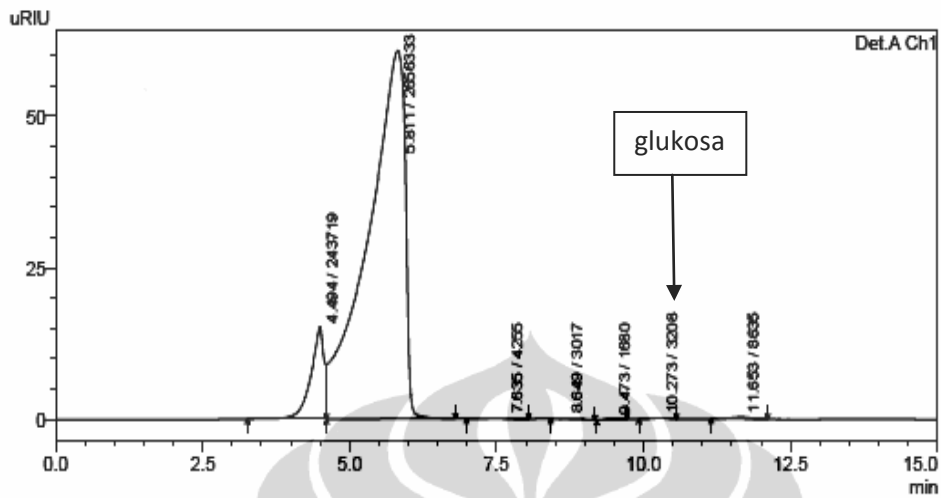
9 Kromatogram fermentasi 12 jam hidrolisat malai + 180 ppm D(-) arabinosa



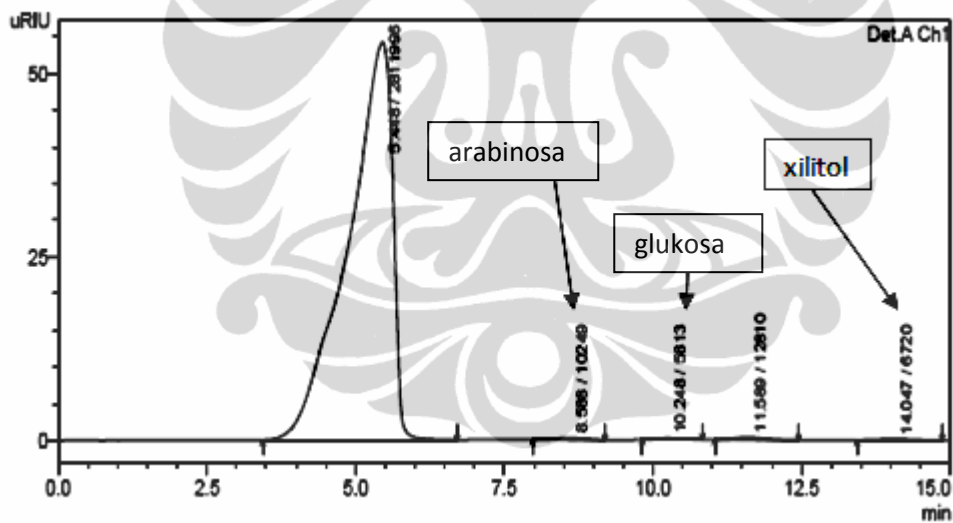
10 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat malai + 0 ppm D(-) arabinosa



11 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat malai + 100 ppm D(-) arabinosa



12 Kromatogram fermentasi 18 jam hidrolisat malai + 180 ppm D(-) arabinosa



LAMPIRAN 12

Contoh cara perhitungan

- 1 Menghitung kadar xilosa berdasar luas area pada kromatogram

Persamaan regresi xilosa adalah : $y = 140,8 x - 690,4$

Luas area optimum xilosa pada kromatogram = 574313

$$\text{ppm xilosa} = \frac{574313 + 690,4}{140,8} = 4083,8 \text{ ppm}$$

Kadar xilosa optimum dari hidrolisat tangkai sorgum = 4083,8 ppm

$$4083,8 \text{ ppm} = 4083,8 \text{ mg/L}$$

Massa xilosa dalam hidrolisat = $4083,8 \text{ mg/L} \times \frac{50}{1000} \text{ L} = 204,19 \text{ mg}$

Kadar xilosa dalam tangkai sorgum = $\frac{204,19 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times 100\% = 20,419\%$

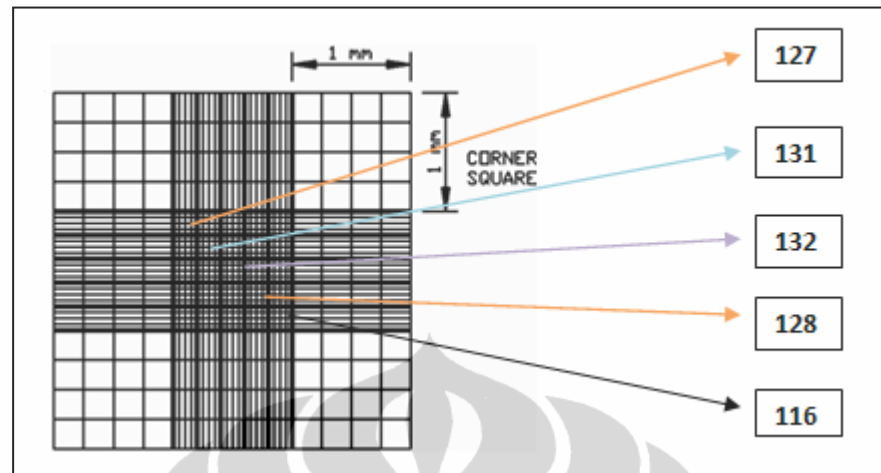
Mol xilosa dalam hidrolisat = $204,19 \text{ mg} \times \frac{1 \text{ mmol}}{150 \text{ mg}} = 1,36 \text{ mmol}$

- 2 Menghitung % konversi xilitol

$$\% \text{ konversi} = \frac{\text{mol xilitol yang terbentuk}}{\text{mol xilosa mula-mula}} \times 100\%$$

- 3 Rendemen xilitol dari sampel = $\frac{\text{massa xilitol yang terbentuk}}{\text{massa sampel}} \times 100\%$

$$= \frac{9,4 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times 100\% = 0,94\%.$$

4 Menghitung jumlah sel *Candida fukuyamaensis* dengan counting chamber

$$\begin{aligned}
 \text{Rata-rata jumlah sel} &= 127 \text{ sel} / 0.004 \text{ mm}^3 \\
 &= 127 \times 250 \text{ sel/mm}^3 \\
 &= 31.750 \text{ sel/mm}^3 \times 1000 \text{ mm}^3 / 1 \text{ cm}^3
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah sel dalam suspensi} &= 31.750.000 \text{ sel/cm}^3 \times \text{faktor pengenceran} \\
 &= 31,750.000 \text{ sel/cm}^3 \times 5 \\
 &= 158.750.000 \text{ sel/cm}^3 = 1,5875 \times 10^8 \text{ sel/cm}^3
 \end{aligned}$$

LAMPIRAN 13

LAMPIRAN 13

13.1 Tabel xilosa hasil hidrolisis tangkai dan malai sorgum dengan variasi waktu hidrolisis

Waktu hidrolisis (menit)	Tangkai sorgum				Malai sorgum			
	Luas area	Ppm (mg/L)	Massa dlm sampel (mg)	Rendemen (%)	Luas area	Ppm (mg/L)	Massa dlm sampel (mg)	Rendemen (%)
25	311945	2220,4	111,02	11,1	200995	1432,4	71,62	7,2
30	484892	3448,7	172,44	17,2	308118	2193,2	109,66	11,0
35	574314	4083,8	204,19	20,4	362558	2579,9	129,0	12,9
40	462533	3289,9	164,50	16,4	515868	3668,7	183,44	18,3
45	387449	2756,7	137,84	13,8	659752	4690,6	234,53	23,5
50	327195	2328,7	116,44	11,6	428216	3046,2	152,31	15,2

13.2 Tabel perhitungan kadar xilosa dan xilitol hasil fermentasi per 12 jam hidrolisat tangkai sorgum

Waktu fermentasi jam	xilosa				xilitol				% Konversi xilosa	Rendemen sampel %
	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol		
0	76753	554,52	27,73	0,18	2842	27,63	1,38	0,01	ttd	ttd
12	39962	293,78	14,69	0,10	29553	209,46	10,47	0,07	32,57	1,04
24	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
36	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
48	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
60	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd

13.3 Tabel perhitungan kadar xilosa dan xilitol hasil fermentasi per 12 jam hidrolisat malai sorgum

Waktu fermentasi jam	xilosa				xilitol				% Konversi xilosa	Rendemen sampel %
	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol		
0	123356	884,81	44,24	0,29	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
12	156002	1116,17	55,81	0,37	13354	99,19	4,96	0,03	11,13	0,50
24	20364	154,88	7,74	0,05	3317	30,86	1,54	0,01	3,45	0,15
36	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
48	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
60	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd

13.4 Tabel xilitol hasil fermentasi per 6 jam larutan xilosa murni

Waktu fermentasi jam	xilosa				xilitol				% Konversi xilosa
	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol	Luas area	Ppm (mg/L)	mg	mmol	
0	279250	1989,65	99,48	0,66	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
6	255374	1820,44	91,02	0,60	3166	29,84	1,49	0,01	1,49
12	15974	123,77	6,19	0,04	6618	53,34	2,67	0,02	2,66
18	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
24	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd

13.5 Tabel perhitungan konversi xilitol hasil fermentasi hidrolisat tangkai sorgum dengan penambahan D(-) arabinosa

Wkt ferm jam	+arab ppm	xilosa				xilitol				Konver xilosa %	residuen sampel %	Luas area arabino sosa
		Luas area	ppm	mg /sampel	mmol	Luas area	ppm	mg	mmol			
0	0	300462	2138,9	106,95	0,71	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	29192
	100	230717	1643,5	82,18	0,55	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	22976
	200	312311	2223,0	111,2	0,74	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	29864
6	0	266109	1894,9	94,7	0,63	6828	49,0	2,45	0,016	2,24	0,25	tttd
	100	251515	1791,2	89,6	0,60	2299	16,8	0,84	0,006	1,09	0,08	20276
	200	276231	1966,8	98,3	0,66	12299	87,9	4,40	0,029	3,91	0,44	7729
12	0	24558	179,3	8,96	0,06	27132	193,4	9,67	0,064	8,98	0,97	tttd
	100	69414	497,9	24,9	0,17	13659	97,6	4,88	0,032	5,84	0,49	42294
	200	18361	135,3	6,77	0,05	6754	48,5	2,43	0,016	2,16	0,24	13498
18	0	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd
	100	tttd	tttd	tttd	tttd	9924	71,0	3,55	0,023	4,2	0,36	tttd
	200	7249	56,39	2,82	0,02	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd	tttd

13.6 Tabel perhitungan konversi xilitol dari fermentasi hidrolisat malai sorgum dengan penambahan D(-) arabinosa

Wkt Ferment jam	+ppm arab	xilosa				xilitol				Konv xilosa %	Residua sampel %	Luas area arabinosa
		Luas area	ppm	mg	mmol	Luas area	ppm	mg	mmol			
0	0	203586	1450,8	72,54	0,484	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	90	145921	1041,3	52,07	0,347	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	31917
	180	167524	1194,7	59,74	0,398	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	39067
6	0	180565	1287,3	64,37	0,429	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	90	62464	448,5	22,43	0,15	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	180	90139	645,1	32,26	0,215	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	16851
12	0	100820	721,0	36,05	0,240	26364	187,97	9,40	0,062	12,48	0,94	ttd
	90	td	td	td	td	4857	35,0	1,75	0,012	3,46	0,18	ttd
	180	39338	284,3	14,21	0,095	8117	58,19	2,91	0,019	4,8	0,29	ttd
18	0	19131	140,8	7,04	0,047	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	90	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	180	ttd	ttd	ttd	ttd	6720	48,26	2,41	0,016	4,0	0,24	10244

LAMPIRAN 14

Determinasi tanaman sorgum ZH-30



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
 (Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 26 Mei 2010

Nomor : 7/7 /IPH.1.02/If.8/V/2010
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Wuryaningsih
 Mhs. FMIPA-Universitas Indonesia
 NPM : 0806422012
 Kampus UI Depok 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Sorghum-ZH-30	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Poaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

 Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001

Universitas Indonesia