

**PRODUKSI XILITOL OLEH KHAMIR PENGHASIL ENZIM
XYLOSE REDUCTASE
DARI HIDROLISAT AMPAS TEBU**

**AHMAD FAISAL
030403003Y**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2008**

**PRODUKSI XILITOL OLEH KHAMIR PENGHASIL ENZIM
XYLOSE REDUCTASE DARI HIDROLISAT AMPAS TEBU**

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

**Oleh :
AHMAD FAISAL
030403003Y**



**DEPOK
2008**

SKRIPSI : PRODUKSI XILITOL OLEH KHAMIR PENGHASIL ENZIM
XYLOSE REDUCTASE DARI HIDROLISAT AMPAS TEBU

NAMA : AHMAD FAISAL

NPM : 030403003Y

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, Juli 2008

Dr. ENDANG SAEPUKIN

Dra. SITARESMI M.Sc

PEMBIMBING I

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana:

Penguji I : Dra. Susilowati Hadisusilo M.Sc

Penguji II : Dr. rer nat. Budiawan

Penguji III : Prof. Dr. Wahyudi Priyono Suwarso

Count Your Blessing

*When there's a dark and cloudy days
think about the sun*

*When you've work you need to do
think of having fun*

*When there's a long hard road to travel
think about the end*

*When you feel lost and all alone
think about a friend*

*When things are going badly
think of when they're going best*

*When you feel blue,
just think of all the happy ways you're blessed*

by : anonymous

untuk semua orang yang menginginkan

KATA PENGANTAR

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

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing pertama yang dengan tulus ikhlas, penuh kesabaran dan pengertian telah memberikan bimbingan, arahan, waktu dan bantuan pemikiran yang tak ternilai selama penelitian ini, juga kepada Dra. Sitaresmi, M.Sc. selaku pembimbing penelitian kedua yang memberikan izin untuk dapat melakukan penelitian di departemen Biologi FMIPA UI dan juga atas bimbingan yang sangat berharga selama penelitian.

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

Cucu, Pak Amin, dan Pak Kiri, Babeh perpus, serta seluruh staf departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

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

1. Kedua orang tua yang telah berkorban begitu besar dalam segala hal, yang telah mengajarkan kesabaran, kerja keras, dan semangat hidup yang sangat berarti bagi penulis. Terutama untuk ibuku yang selalu memberikan dorongan untuk cepat lulus dari kuliah ini.
2. Kakakku Dhony yang telah memberikan banyak fasilitas yang menunjang untuk kebutuhan selama kuliah. Juga kepada kakakku Andry dan teteh May yang juga selalu mendukung dalam segala hal mengenai kuliah. Serta kepada seluruh keluarga besar yang terus mendoakan dan mendukung penulis untuk terus berjuang.
3. Mbem Citra yang telah banyak memberikan dukungan di saat penulis mengalami masa-masa sulit, memberikan semangat ketika penulis merasa jatuh, serta perhatian dan pengertiannya selama ini. “*Three Mr.iious words for you*”
4. Niezha Eka Putri , rekan seperjuangan menghadapi mikroorganisme untuk menghasilkan xilitol. Terima kasih atas bantuan dan kerja samanya selama 6 bulan ini, serta kepada Riki atas arahan dan diskusi selama penelitian, serta kepada Heidy yang membantu penulis saat bekerja di Biologi.

5. Joker, yang mengajarkan untuk selalu tersenyum disaat apapun.
Walaupun hanya ada dalam cerita. *You are my big inspiration.*
6. Danar, Wahyu, Ridlo, Irwan yang tergabung dalam “D’ Gembels & D’ Gombals” yang selalu bisa dindalkan saat berbagi canda dan tawa.
7. Rekan-rekan seperjuangan di lantai 4 (Tina, Kiki, Ima, Tya, Fitri, Lindi, Wakhid, Vero, Uthe, Janti, Ari, Kurnia, Ami, Atri, Kak Vera, Kak Dewi, Kak Laeli, dan Kak Wawan), rekan-rekan seperjuangan di lantai 3 (Nur, Farida, Bernat, Atul, Opik abu, Ratna, Nath, Lani, Basit, Kak Santi, Kak Ela, Kak Dina, dan Kak Vena), serta teman-teman 2004 yang lainnya, terima kasih atas dukungan dan bantuan selama penelitian
8. Semua pihak yang mendukung terlaksananya penelitian ini.

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

Depok, Juni 2008

Penulis

ABSTRAK

Xilitol ($C_5H_{12}O_5$) merupakan pemanis alami yang mempunyai kelebihan dibandingkan gula lainnya. Xilitol mempunyai nilai kalori yang rendah, aman dikonsumsi, memiliki tingkat kemanisan yang sama dengan sukrosa dan juga bersifat non-kariogenik artinya tidak menyebabkan karies pada gigi. Umumnya xilitol diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi xilosa, dengan bantuan katalis nikel pada suhu 80-140 °C dan tekanan 50 atm. Selain itu, terdapat alternatif lain untuk membuat xilitol, yaitu secara fermentasi menggunakan khamir. Sumber xilosa umumnya berasal dari limbah lignoselulosa yang banyak terdapat di Indonesia, misalnya ampas tebu. Bila ampas tebu dihidrolisis, akan didapatkan komponen penyusunnya yang salah satunya adalah xilosa. Pada penelitian ini dilakukan hidrolisis ampas tebu menggunakan asam sulfat dan didapatkan xilosa sebesar 15,41% (w/w). Hidrolisat yang didapatkan kemudian difermentasikan menggunakan *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii*. Dari hasil fermentasi didapatkan bahwa *C.fukuyamaensis* lebih berpotensi dibandingkan *Candida boidinii* sebagai agen biologis untuk mengkonversi xilosa menjadi xilitol dengan persen konversi xilosa menjadi xilitol sebesar 7,3126 % (w/w).

Kata kunci : xilosa, xilitol, *xylose reductase*, fermentasi, *Candida fukuyamaensis*, *Candida boidinii*

xiii + 81 hlm; grb; tab; lamp
Bibliografi 31 (1995-2008)

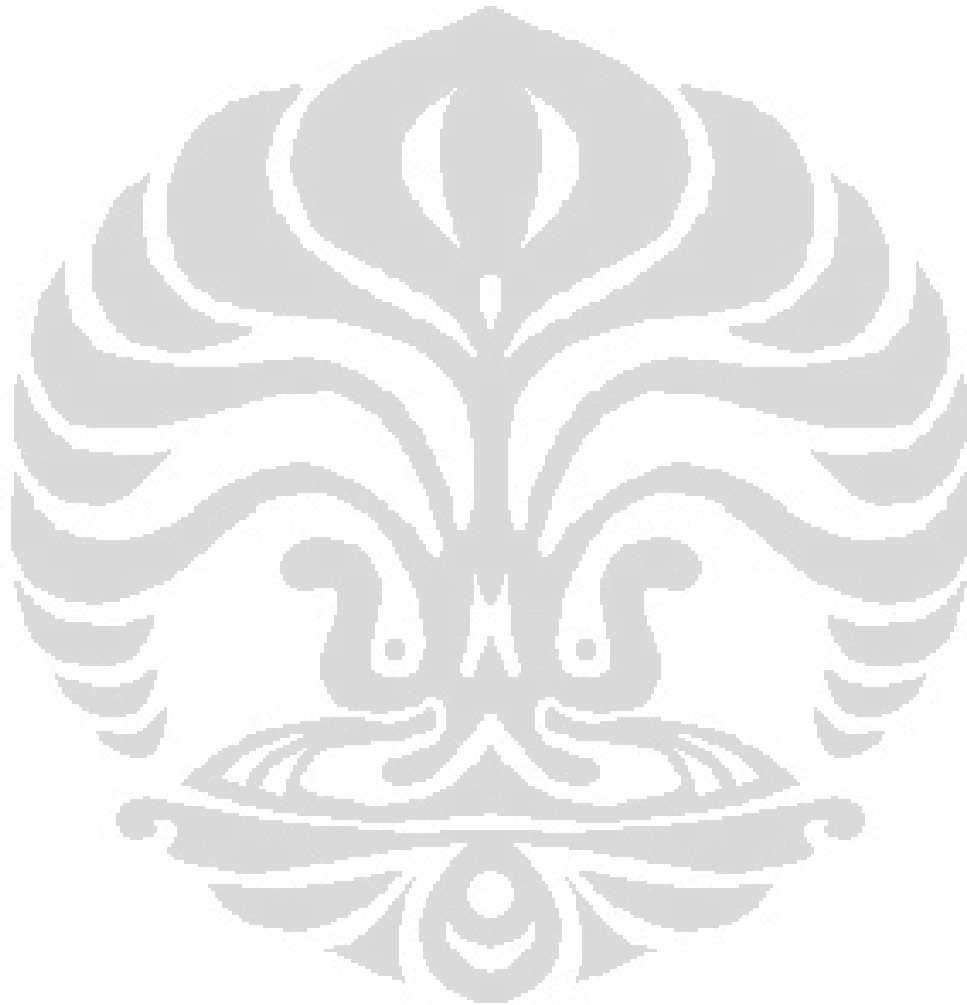
DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Hipotesis	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Xilitol.....	6
2.1.1 Sifat fisika kimia xilitol.....	6
2.1.2 Keunggulan xilitol dibandingkan pemanis lain.....	7
2.1.3 Manfaat xilitol.....	8
2.1.4 Proses produksi xilitol.....	9
2.2 Xilosa.....	9
2.2.1 Sifat fisika kimia xilosa.....	9
2.3 Lignoselulosa.....	10
2.3.1 Hemiselulosa.....	11

2.3.1.1	Xilan.....	11
2.3.1.2	Manan.....	13
2.3.1.3	Galaktan.....	14
2.3.2	Selulosa.....	14
2.4	Tebu.....	16
2.4.1	Taksonomi tebu	18
2.4.2	Morfologi tebu.....	19
2.4.3	Ampas tebu.....	19
2.4.3.1	Komposisi ampas tebu.....	20
2.4.3.2	Manfaat ampas tebu.....	20
2.5	Hidrolisis.....	20
2.6	Khamir.....	24
2.6.1	Candida.....	24
2.7	Fermentasi.....	26
BAB III. METODE PENELITIAN.....		28
3.1	Alat dan Bahan Kimia.....	28
3.1.1	Alat-alat yang digunakan.....	28
3.1.2	Bahan-bahan kimia yang digunakan.....	28
3.2	Prosedur Kerja.....	29
3.2.1	Pembuatan sampel ampas tebu.....	29
3.2.2	Pembuatan hidrolisat.....	29
3.2.3	Pembuatan larutan standar.....	30
3.2.3.1	Larutan standar xilosa.....	30

3.2.3.2 Larutan standar glukosa.....	31
3.2.3.3 Larutan Standar xilitol.....	31
3.2.3.4 Larutan standar arabinosa.....	32
3.2.4 Sterilisasi alat	32
3.2.5 Penyiapan inokulum.....	33
3.2.6 Fermentasi.....	34
3.2.7 Penentuan jumlah sel khamir.....	35
3.2.8 Variasi kondisi fermentasi yang dilakukan.....	35
3.3 Diagram kerja secara umum	36
3.3.1. Hidrolisis	36
3.3.2. Fermentasi	37
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1 Sampling Ampas Tebu.....	38
4.2 Pembuatan Sampel Ampas Tebu.....	39
4.3 Identifikasi Standar Karbohidrat.....	41
4.4 Hidrolisis ampas tebu.....	42
4.5 Fermentasi.....	47
4.6 Perhitungan jumlah sel khamir.....	48
4.7 Hasil fermentasi.....	50
4.7.1. Hasil fermentasi variasi spesies.....	50
4.7.2. Hasil fermentasi variasi oksigen terlarut	54
4.7.3. Hasil fermentasi variasi bentuk substrat.....	56
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	59

5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN.....	65



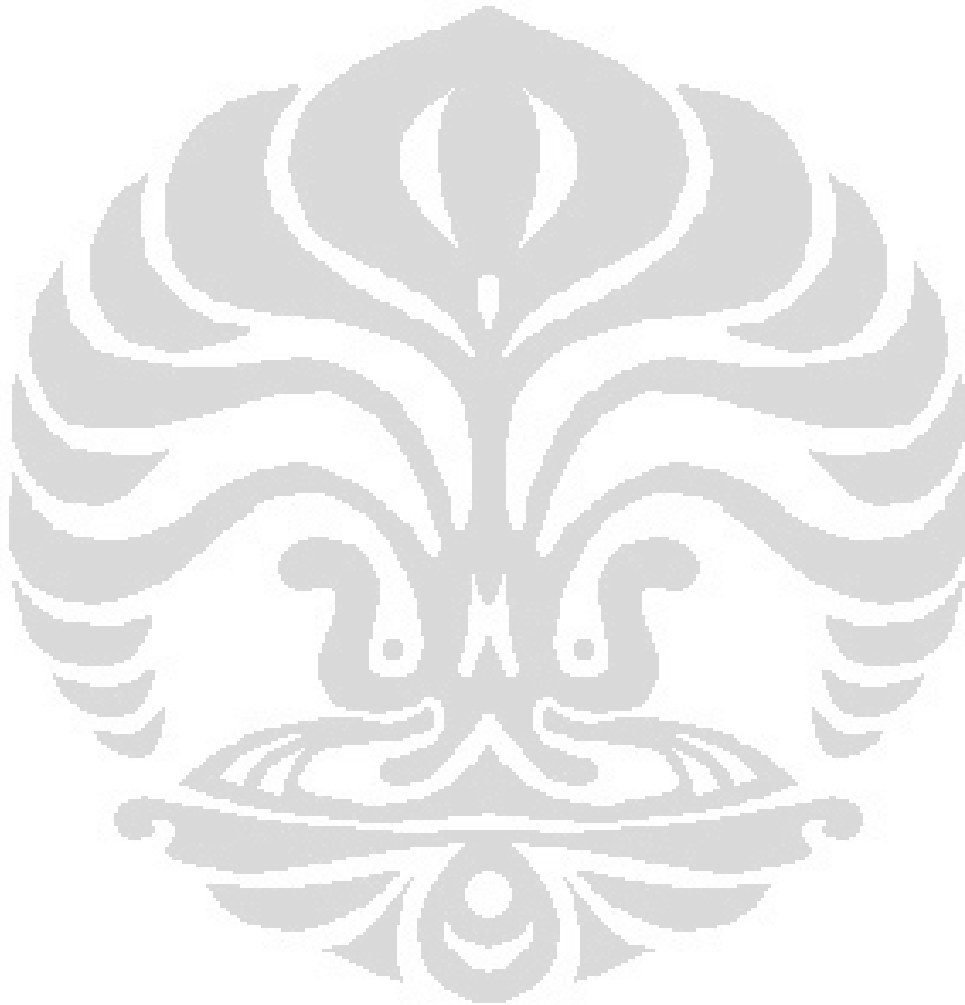
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman.....	10
Gambar 2.2. Struktur Dasar Arabinoglukuronoxilan.....	12
Gambar 2.3. Struktur Dasar Glukuronoxilan.....	12
Gambar 2.4. Struktur Dasar Galaktoglukomanan.....	13
Gambar 2.5. Struktur Dasar Glukomanan.....	13
Gambar 2.6. Struktur Dasar Arabinogalaktan.....	14
Gambar 2.7. Skema ikatan hidrogen pada rantai selulosa.....	15
Gambar 2.8. Serat selulosa.....	15
Gambar 2.9. Bagian amorf pada selulosa.....	16
Gambar 2.10. Grafik produksi tebu Indonesia tahun 1996-2002.....	17
Gambar 2.11. Tanaman tebu	18
Gambar 2.12. Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida.....	23
Gambar 2.13. Foto mikroskopi khamir.....	24
Gambar 3.1. Instrumentasi HPLC	30
Gambar 4.1. Ampas tebu yang masih kasar dan telah dihaluskan.....	39
Gambar 4.2. Alat autoklaf	40
Gambar 4.3. Kromatogram standar karbohidrat.....	41
Gambar 4.4. Kromatogram standar xilosa 500 ppm	41
Gambar 4.5. Kromatogram hidrolisat amaps tebu	44
Gambar 4.6. Hasil TPC <i>Candida fukuyamaensis</i>	49
Gambar 4.7. Kromatogram hasil fermentasi oleh <i>C. boidinii</i>	51

Gambar 4.8. Kromatogram hasil fermentasi oleh *C.fukuyamaensis* 52

Gambar 4.9. Jalur metabolisme xilosa pada khamir secara umum 56

Gambar 4.10. Substrat ampas tebu yang digunakan..... 57



DAFTAR TABEL

2.1.	Perbandingan tingkat kemanisan dan nilai kalori antara xilitol dan pemanis lain.....	8
4.1.	Konsentrasi xilosa terhadap variasi waktu.....	45
4.2.	Hasil hidrolisis variasi bentuk substrat ampas tebu.....	47
4.3.	Hasil fermentasi variasi spesies dengan menggunakan xilosa sintetik (20g/L) sebagai substrat.....	52
4.4.	Hasil fermentasi variasi spesies menggunakan substrat hidrolisat...	52
4.5.	Hasil fermentasi variasi oksigen terlarut	55
4.6.	Hasil fermentasi variasi bentuk substrat hidrolisat.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

1. Kromatogram dan grafik standar xilosa.....	65
2. Kromatogram dan grafik standar xilitol.....	67
3. Kromatogram hasil hidrolisis (variasi waktu, jenis substrat, konsentrasi asam).....	68
4. Kromatogram hasil fermentasi variasi spesies	71
5. Kromatogram hasil fermentasi variasi kondisi oksigen terlarut.....	72
6. Kromatogram hasil fermentasi variasi substrat hidrolisat.....	73
7. Tabel area semua hasil fermentasi dan tabel perhitungan semua hasil fermentasi serta contoh cara perhitungan.....	74
8. Kromatogram semua hasil fermentasi	76

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Indonesia merupakan negara agraris yang hasil pertaniannya cukup melimpah, salah satu hasil dari bumi Indonesia adalah tanaman tebu. Berdasarkan siaran pers No :S. 563/II/PIK-1/2005 yang dikeluarkan oleh Departemen Kehutanan, menyatakan bahwa potensi ampas tebu di Indonesia cukup besar. Hal ini dikarenakan luas tanaman tebu di Indonesia adalah 395.399,44 ha, yang tersebar di pulau Sumatera seluas 99.383,42 ha, pulau Jawa seluas 265.671,82 ha, pulau Kalimantan seluas 13.970 ha, dan pulau Sulawesi seluas 16.373,4 ha. Diperkirakan setiap hektar tanaman tebu mampu menghasilkan 100 ton ampas tebu. Sehingga potensi yang dapat tersedia dari total luas tanaman tebu mencapai 39.539.994 ton per tahun ¹.

Pemanfaatan tebu di Indonesia, umumnya hanya diambil sarinya saja untuk dijadikan gula, sedangkan ampasnya belum termanfaatkan dengan optimal. Selama ini pemanfaatan ampas tebu yang dihasilkan masih terbatas untuk makanan ternak, bahan bakar boiler di pabrik gula, media pertumbuhan jamur, bahan pembuatan pupuk, pulp dan kertas. Diperkirakan masih terdapat kelebihan sekitar 1,6% dari bobot ampas tebu yang belum dimanfaatkan dan terbuang percuma ².

Ampas tebu mengandung hemiselulosa yang cukup tinggi. Bila hemiselulosa ini dihidrolisis, maka akan didapatkan komponen penyusunnya

yang umumnya merupakan monosakarida yang tersusun atas 5 buah rantai karbon. Salah satu hasil hidrolisis hemiselulosa ini adalah xilosa yang dapat diolah lebih lanjut menjadi produk bernilai ekonomi tinggi seperti xilitol.

Xilitol ($C_5H_{12}O_5$) merupakan pemanis alami yang mempunyai sifat nonkariogenik, yaitu dapat melindungi gigi dari kerusakan seperti karies gigi. Hal ini disebabkan karena xilitol dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Selain itu, xilitol mempunyai nilai indeks glisemik yang rendah, sehingga dapat dijadikan sebagai gula alternatif bagi para penderita diabetes. Indeks gula atau istilah ilmiahnya adalah indeks glisemik (glycemic index), merupakan karakteristik fisiologis suatu bahan pangan yang dievaluasi berdasarkan pengaruhnya terhadap peningkatan kadar gula darah. Sebagai indikator evaluasi, digunakan senyawa glukosa murni sebagai standar dengan nilai indeks glisemik 100. Penentuan nilai indeks glisemik suatu bahan pangan ditentukan berdasarkan perbandingan luas kurva perubahan kadar glukosa darah hingga 2-3 jam setelah pemberian, antara bahan pangan tersebut dengan luas kurva glukosa sebagai standar. Sebagai contoh, bahan pangan dengan luas kurva 90% dari luas kurva glukosa berarti memiliki nilai indeks glisemik 90. Dengan kata lain, pada penderita diabetes sebaiknya diberikan jenis karbohidrat dengan nilai indeks gula atau index glisemik yang rendah, artinya peningkatan gula darah penderita diabet akan terjadi secara lambat, sehingga tidak membahayakan penyakitnya.

Penelitian tentang xilitol pun semakin berkembang, antara lain membuktikan bahwa xilitol dapat mengurangi infeksi pada telinga, sinusitis

dan osteoporosis^{3,4}. Dengan beragamnya manfaat xilitol, maka hingga kini xilitol telah banyak digunakan untuk pemanis pada pasta gigi, permen karet, sirup obat batuk, multivitamin, dan obat pencuci mulut.

Survei Kesehatan Nasional (Surkenas) membuktikan bahwa dari 10 kelompok penyakit terbanyak yang dikeluhkan masyarakat, penyakit gigi dan mulut menempati urutan pertama (60%)⁵. Ini menggambarkan bahwa kesadaran masyarakat Indonesia dalam menjaga kesehatan gigi dan mulut masih tergolong rendah, padahal gangguan kesehatan gigi dan mulut dapat meningkatkan resiko terkena berbagai penyakit kardiovaskuler. Ada beberapa faktor penyebab kerusakan gigi, antara lain adalah bakteri mulut dan makanan. Makanan atau minuman yang mengandung sukrosa berpotensi sebagai penyebab gigi berlubang, padahal sukrosa merupakan gula yang biasa dikonsumsi sehari-hari dan penggunaannya sulit dihindari, terutama dalam lingkungan rumah tangga. Untuk itu, perlu dicari pemanis alternatif yang aman dan menyehatkan gigi, salah satunya adalah xilitol.

Xilitol dapat diproduksi dari Xilosa, baik secara fermentasi maupun kimiawi. Dalam skala industri, xilitol dapat diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi xilosa, dengan bantuan katalis nikel pada suhu 80-140 °C dan tekanan 50 atm⁴. Proses kimia ini membutuhkan beberapa tahap pemurnian, karena pada proses kimia ini hanya xilosa murni yang dapat diolah untuk menjadi xilitol. Dari proses kimia ini juga akan terlepas limbah Nikel yang berbahaya bagi lingkungan. Oleh karenanya, penggunaan metode

fermentasi dari khamir yang termasuk dalam genus *Candida*, perlu dipelajari sebagai alternatif produksi xilitol dalam skala industri.

Xilosa ($C_5H_{10}O_5$) merupakan monosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa berupa xilan. Xilosa dikenal sebagai gula kayu, karena terdapat dalam kayu yang kaya akan hemiselulosa.

Hemiselulosa diperoleh dengan cara memanfaatkan limbah lignoselulosa, yang terutama mengandung selulosa 35-50 %, hemiselulosa 20-35%, dan lignin 10-25%. Limbah lignoselulosa yang melimpah jumlahnya di Indonesia antara lain : sekam padi, ampas tapioka, sabut dan tandan kelapa sawit serta ampas tebu.

Sumber hemiselulosa yang dipakai pada penelitian ini berasal dari ampas tebu. Pentosa dalam ampas tebu merupakan suatu bentuk hemiselulosa dengan persentase sebesar 27,97%. Kadar hemiselulosa dalam sekam padi (16,94-21,95%) sedangkan pada kelapa sawit (24%).

1.2 Perumusan Masalah

Dalam penelitian ini, akan dilakukan hidrolisis oleh asam sulfat terhadap ampas tebu untuk menghasilkan xilosa. Setelah itu, xilosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis akan digunakan dalam proses fermentasi oleh khamir yang termasuk dalam genus *Candida*, yaitu *Candida fukuyamaensis* U 62311 UICC Y-247 dan *Candida boidinii* UICC Y-399. Mikroorganisme ini didapat dari laboratorium mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia *Culture Collection*), yang terdapat di Departemen Biologi FMIPA

UI. Alasan pemilihan spesies khamir ini, dikarenakan bahwa spesies khamir ini telah diteliti sebelumnya oleh kelompok kami bahwa dari hasil *screening* 10 jenis khamir yang berpotensi untuk memproduksi xilitol, didapatkan bahwa kedua spesies ini merupakan empat terbaik yang berpotensi sebagai agen biologis yang dapat mengkonversi D-xilosa menjadi xilitol.

1.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan hasil samping ampas tebu untuk dijadikan xilitol sebagai gula alternatif, dengan cara melakukan hidrolisis terhadap ampas tebu, kemudian difermentasikan dengan menggunakan mikroorganisme (khamir) penghasil enzim *xylose reductase* (XR).

1.4 Hipotesis

Hidrolisat ampas tebu yang mengandung xilosa dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan xilitol secara fermentasi dengan menggunakan khamir penghasil enzim *xylose reductase* (XR). Khamir ini akan mereduksi xilosa menjadi xilitol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilitol

Xilitol merupakan karbohidrat yang terdiri dari lima atom karbon (pentosa). Xilitol adalah pemanis alami karena secara alami ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan⁶. Struktur xilitol pertama kali ditemukan oleh Fisher dan Stahe di Jerman dan oleh Bertrand di Perancis pada tahun 1890⁴.

Xilitol pertama kali dibuat dari pohon Birch oleh orang-orang Finlandia selama perang dunia kedua. Pada tahun 1930 terjadi kelangkaan pasokan gula yang mendorong para peneliti untuk mencari gula alternatif. Kemudian baru pada era 1943, ditemukan xilitol yang terdapat secara alamiah di dalam tumbuhan. Jadi dapat dikatakan bahwa xilitol merupakan pemanis yang alami. Bersamaan dengan itu, peneliti menemukan bahwa metabolisme xilitol di dalam tubuh tidak membutuhkan insulin, sehingga di tahun 1960-an xilitol telah dikonsumsi sebagai pengganti gula bagi para penderita diabetes. Kemudian pada tahun 1963, US *Food and Drug Administration* (FDA) menyatakan bahwa xilitol tidak mempunyai efek toksik.

2.1.1 Sifat fisika dan kimia Xilitol⁷

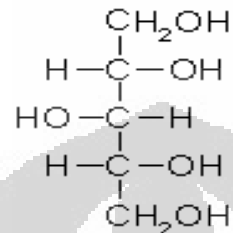
Rumus molekul	:	$C_5H_{12}O_5$
Berat molekul	:	152,15 g/mol
Wujud	:	bubuk atau kristal putih

Nilai kalori : 2,4 Kal/g

Titik leleh : 92-96 °C

Titik didih : 126 °C

Struktur xilitol :



2.1.2 Keunggulan xilitol dibandingkan pemanis lain

1. Xilitol bersifat non-kariogenik, artinya tidak menyebabkan karies pada gigi, karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri kariogenik *Streptococcus mutans*.
2. Xilitol sebagai pemanis yang aman digunakan oleh setiap orang. Pernyataan ini dikeluarkan oleh US *Food and Drug Administration (FDA)*⁸.
3. Xilitol memiliki tingkat kemanisan yang sama dengan sukrosa dan lebih manis daripada sorbitol⁹. Bila sukrosa atau gula pasir dinilai memiliki kemanisan 1, maka glukosa hanya memiliki kemanisan 0,74, laktosa 0,16, maltosa 0,32, galaktosa 0,32 dan fruktosa 1,73 serta gula invert (glukosa dan fruktosa perbandingannya 1 : 1) 1,30. Sedangkan bila dibandingkan dengan pemanis buatan, maka perbandingan kemanisannya adalah sebagai berikut : xilitol 1, siklamat 30,

acesulfame-K 150, dulcin 250, thaumatococcus 3.500, steviosida 300, aspartam 200¹⁰. (Data dapat dilihat pada **Tabel 2.1**).

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

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

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

2.1.3 Manfaat xilitol

Xilitol dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam mulut, sehingga bermanfaat untuk mencegah karies, pembentukan plak, dan menjaga pH saliva. Berdasarkan penelitian, xilitol juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dalam nasofaring, sehingga dapat mengurangi resiko infeksi telinga tengah dan sinusitis. Nilai kalori xilitol yang lebih rendah dibandingkan gula lain, menyebabkan xilitol sangat baik

dikonsumsi oleh orang-orang yang sedang menjalani program penurunan berat badan. Xilitol memberikan sensasi dingin dan fresh di mulut dengan tidak meninggalkan rasa yang tidak menyenangkan.

2.1.4 Proses produksi xilitol ¹¹

Xilitol dapat diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi atau reduksi xilosa, dengan bantuan katalis nikel pada suhu 80-140 °C dan tekanan 50 atm. Xilitol juga dapat dibuat secara fermentasi oleh beberapa jenis khamir, seperti dari genus *Candida* (*Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, dan spesies *Candida* lainnya), dan juga *Debaryomyces hansenii* ¹².

2.2 Xilosa

Xilosa merupakan gula pentosa yang dikenal sebagai gula kayu. Xilosa merupakan unit penyusun xilan, sebagai komponen utama dari hemiselulosa. Salah satu manfaat xilosa adalah sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Xilosa dapat dibuat dari hidrolisis hemiselulosa, dengan memanfaatkan limbah lignoselulosa. Sifat fisika dan kimia dari xilosa dapat dilihat di bawah ini.

2.2.1 Sifat fisika dan kimia xilosa ¹³

Rumus molekul	:	$C_5H_{10}O_5$
Berat molekul	:	150 g/mol
Wujud	:	bubuk atau kristal putih

Titik leleh : 146 °C

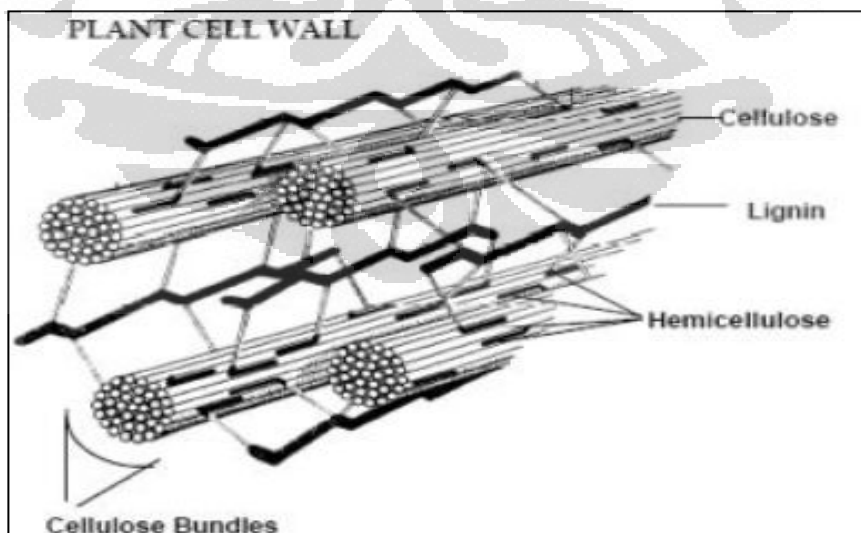
Densitas : 1,52 g/cm³

Struktur :

$$\begin{array}{c}
 \text{H}-\text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2\text{OH}
 \end{array}$$

2.3 Lignoselulosa

Pada umumnya limbah-limbah pertanian mengandung bahan lignoselulosa. Limbah ini terdiri dari tiga komponen utama, yaitu selulosa (35-50%), hemiselulosa (20-35%), dan lignin (10-25%)¹⁴. Lignin merupakan komponen paling keras pada dinding sel tanaman, berupa polimer dari unit-unit fenilpropana yang berikatan silang satu sama lain. Lignin berperan sebagai penguat dan pembentuk dinding sel yang kokoh.



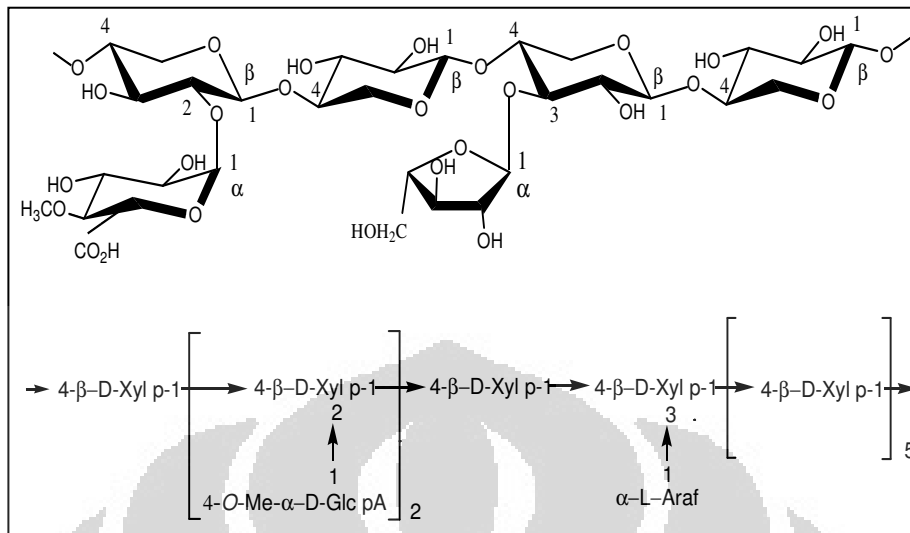
Gambar 2.1 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman¹⁵

2.3.1 Hemiselulosa

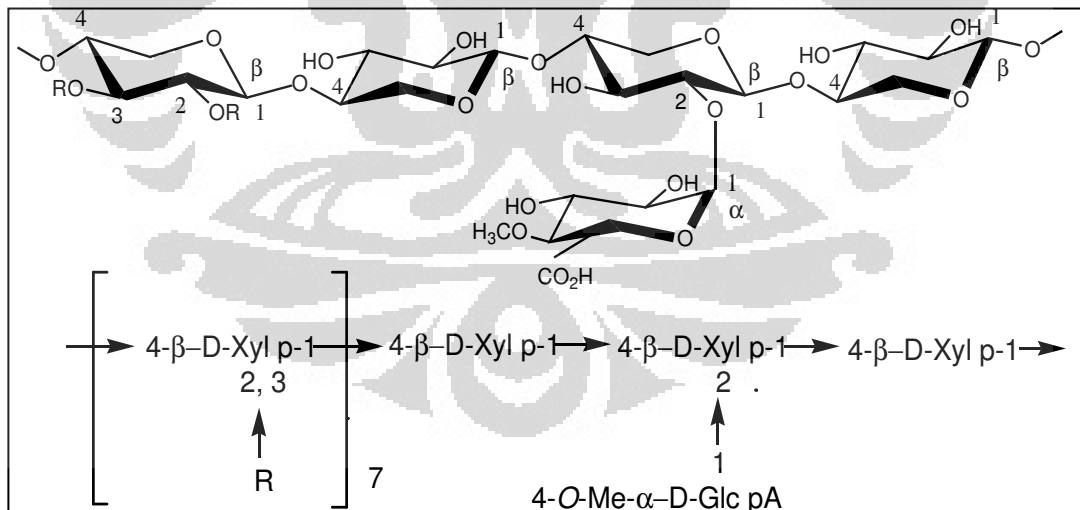
Hemiselulosa merupakan komponen kedua terbesar, yang keberadaannya bersama-sama dengan selulosa berfungsi sebagai bahan pendukung dinding sel tanaman. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang bercabang, terdiri dari beberapa monomer gula yang berbeda, seperti xilosa, arabinosa, dan mannanosa. Rantai polimer hemiselulosa memiliki cabang yang pendek dan amorf¹⁶. Mayoritas hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi hanya sampai 200¹⁴. Hemiselulosa mengikat fibril-fibril selulosa untuk membentuk mikrofibril, yang dapat meningkatkan stabilitas dinding sel¹⁵. Komposisi dan struktur hemiselulosa dalam kayu lunak secara khas berbeda dengan yang ada dalam kayu keras. Secara umum hemiselulosa dapat dibagi menjadi tiga subgrup, yaitu xilan, mannan, dan galaktan¹⁴.

2.3.1.1 Xilan

Rantai utama xilan terdiri dari kerangka yang mengandung unit-unit ikatan glikosida β -1,4-D-xilopiranosa. Pada kayu lunak, xilan berupa arabinoglukuronoxilan (**Gambar 2.2**), sedangkan pada kayu keras, xilan berupa glukuronoxilan (**Gambar 2.3**). Hemiselulosa yang didasarkan pada xilosa dalam kayu lunak dan kayu keras disebut secara sederhana sebagai xilan¹⁴.



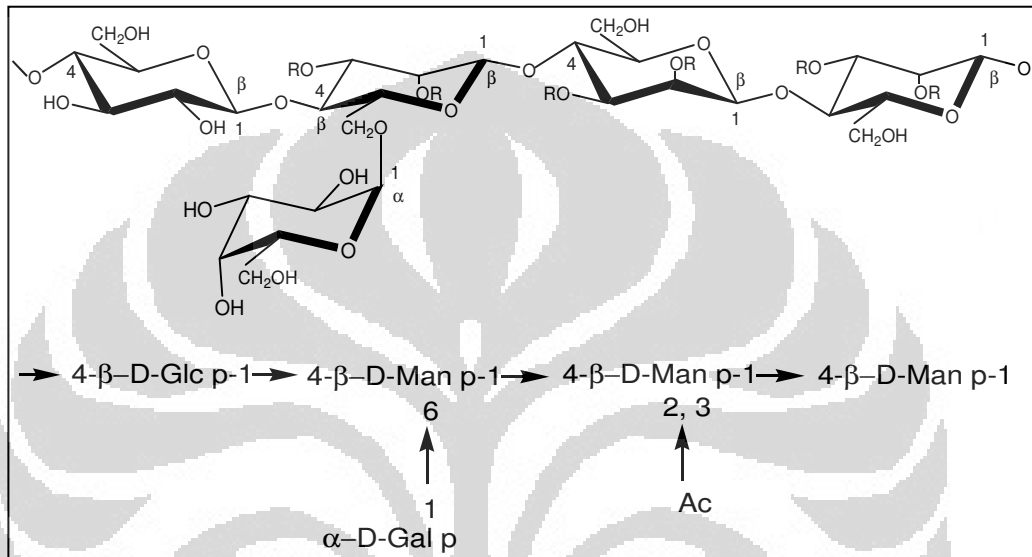
Gambar 2.2 Struktur Dasar Arabinoglucuronoxilan {unit-unit gula: β -D-xilopiranososa (Xyl p); asam 4-O-metil- α -D glukopiranosiluronat (Glc pA); α -L-arabinofuranosa (Araf)}¹⁴



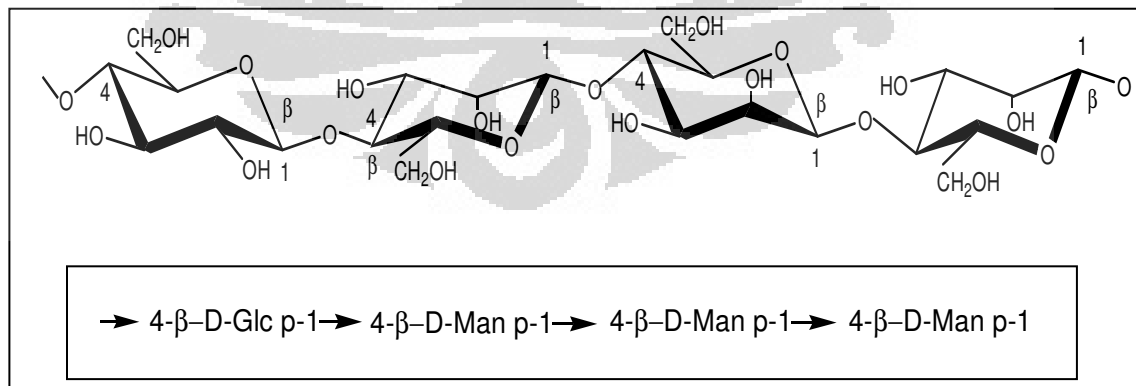
Gambar 2.3 Struktur Dasar Glucuronoxilan {unit-unit gula: β -D-xilopiranososa (Xyl p); asam 4-O-metil- α -D glukopiranosiluronat (Glc pA). R adalah gugus asetil (CH_3CO)}¹⁴.

2.3.1.2 Mannan

Struktur rantai utama mannan terdiri dari β -1,4-D-manopiranosida dan β -1,4-D-glukopiranosida. Pada kayu lunak, mannan berupa galaktoglukomanan, sedangkan pada kayu keras berupa glukomanan¹⁴.



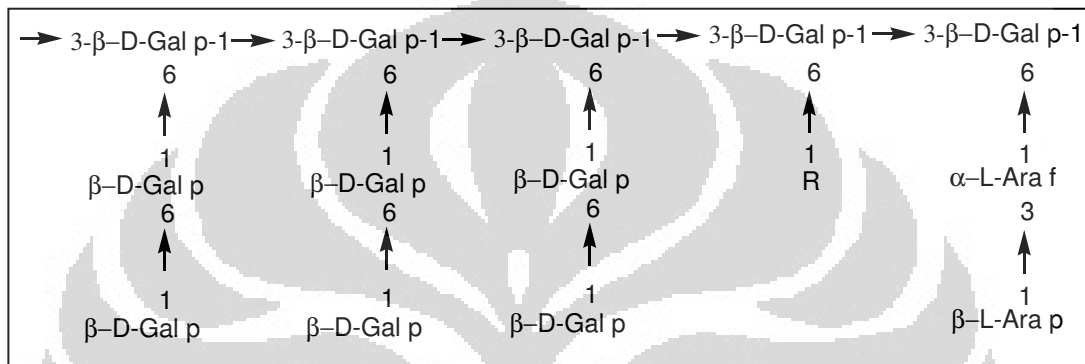
Gambar 2.4 Struktur Dasar Galaktoglukomanan {unit-unit gula: β -D-glukopiranosida (Glc p); β -D-manopiranosida (Man p); β -D-galaktopiranosida (Gal p), R= CH₃CO atau H}¹⁴.



Gambar 2.5 Struktur dasar glukomanan unit-unit gula: β -D-glukopiranosida (Glc p); β -D-manopiranosida (Man p)¹⁴.

2.3.1.3 Galaktan

Galaktan terdiri dari arabinogalaktan. Kayu keras mengandung arabinogalaktan dalam jumlah besar, sedangkan spesies kayu lain hanya merupakan substituen yang kecil¹⁴. Struktur rantai utamanya terdiri dari β -1,3-D-galaktopiranososa.



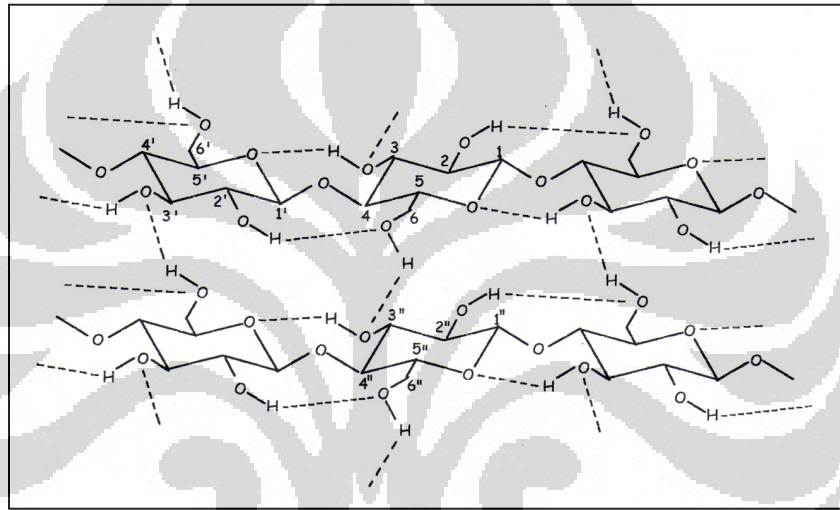
Gambar2.6 Struktur dasar arabinogalaktan unit-unit gula:β-D-galaktopiranososa (Gal p), β-L-arabinopiranososa (Ara p), α-L-arabinofuranosa (Ara f), dan R adalah β-D-galaktopiranososa atau kadang-kadang α-L-arabinofuranosa, atau sisa asam β-D glukopiranosiluronat¹⁴.

2.3.2 Selulosa

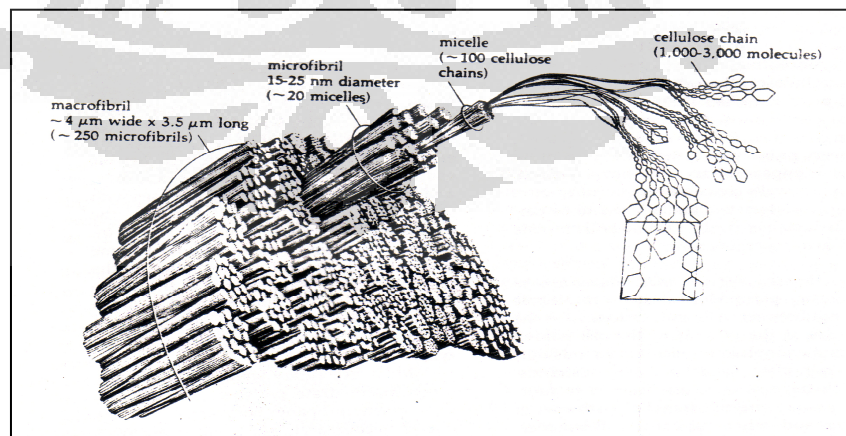
Selulosa sebagai komponen terbesar dalam dinding sel tanaman, mempunyai derajat polimer lebih besar dari hemiselulosa, yaitu antara 7000-15000 molekul glukosa per polimer¹⁶.

Selulosa terdiri dari unit-unit β-D-glukopiranososa dengan ikatan β-1,4-glikosida, membentuk homopolisakarida yang tersusun linier dan memiliki kecenderungan membentuk ikatan hidrogen intra dan intermolekular¹⁷.

Rantai selulosa yang lurus dan panjang saling berhubungan melalui ikatan hidrogen intermolekular (dapat dilihat pada Gambar 2.7) membentuk suatu lembaran-lembaran. Lembaran-lembaran tersebut, tersusun menjadi suatu lapisan yang akhirnya membentuk mikrofibril yang kristalin. Mikrofibril berinteraksi membentuk serat-serat selulosa yang mengandung sekitar 500 ribu rantai selulosa¹⁸. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.8

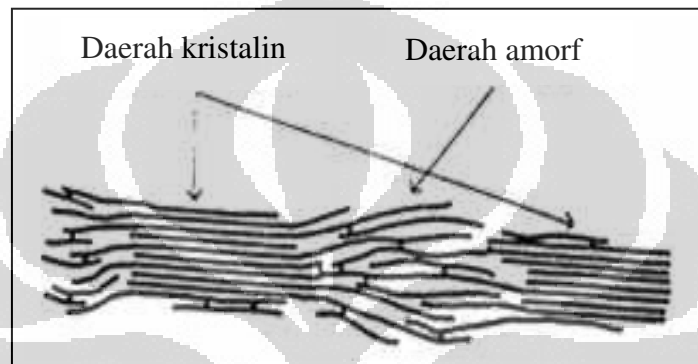


Gambar 2.7 Skema ikatan hidrogen pada rantai selulosa¹⁷.



Gambar 2.8 Serat selulosa¹⁸.

Beberapa daerah dalam mikrofibril, ada yang kristalin dan lainnya amorf. Rantai selulosa berorientasi sejajar dengan sumbu serat, membentuk daerah kristal yang sangat teratur diselingi dengan daerah amorf yang tidak teratur (**Gambar 2.9**). Pada bagian amorf inilah selulosa lebih mudah dihidrolisis dengan enzim atau asam untuk menghasilkan glukosa¹⁹.



Gambar 2.9 Bagian amorf pada selulosa¹⁹.

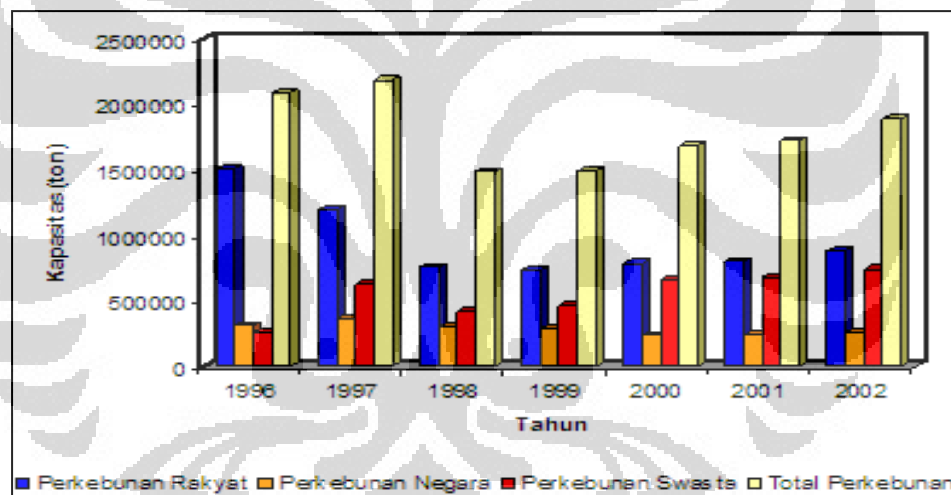
2.4 Tebu

Tebu merupakan salah satu jenis tanaman yang hanya dapat ditanam di daerah yang memiliki iklim tropis. Di Indonesia, perkebunan tebu menempati luas areal \pm 232 ribu hektar, yang tersebar di Medan, Lampung, Semarang, Solo, dan Makassar. Dari seluruh perkebunan tebu yang ada di Indonesia, 50% di antaranya adalah perkebunan rakyat, 30% perkebunan swasta, dan hanya 20% perkebunan negara. Pada tahun 2002 produksi tebu Indonesia mencapai \pm 2 juta ton²⁰.

Tebu merupakan tanaman perkebunan yang termasuk jenis rumput-rumputan. Tanaman ini merupakan komoditi penting karena sebagai bahan

baku pembuatan gula putih. Tanaman tebu cocok ditanam pada daerah yang mempunyai ketinggian tanah antara 1 sampai 1300 m di atas permukaan laut dan mampu tumbuh di daerah beriklim udara sedang sampai panas. Tanah yang ideal bagi tanaman tebu adalah tanah berhumus dengan pH antara 5,7 sampai 7.

Tanaman tebu dari perkebunan diolah menjadi gula di pabrik-pabrik gula. Dalam proses produksi di pabrik gula, ampas tebu dihasilkan sebesar 90% dari setiap tebu yang diproses, gula yang dimanfaatkan hanya 5%, sisanya berupa tetes tebu (*molase*) dan air²¹.



Gambar 2.10 Grafik produksi tebu Indonesia tahun 1996-2002²¹

Selama ini pemanfaatan ampas tebu (*sugar cane bagasse*) yang dihasilkan masih terbatas untuk makanan ternak, bahan baku pembuatan pupuk, *pulp*, dan untuk bahan bakar *boiler* di pabrik gula. Di samping terbatas, nilai ekonomi yang diperoleh juga belum tinggi. Oleh karena itu,

diperlukan adanya pengembangan proses teknologi, sehingga terjadi diversifikasi pemanfaatan limbah pertanian yang ada.

Seperti halnya biomassa pada umumnya, ampas tebu memiliki kandungan polisakarida yang dapat dikonversi menjadi produk atau senyawa kimia yang dapat digunakan untuk mendukung proses produksi sektor industri lainnya. Salah satu polisakarida yang terdapat dalam ampas tebu adalah hemiselulosa (pentosan), dengan persentase sebesar 20-27%. Kandungan pentosan yang cukup tinggi tersebut memungkinkan ampas tebu untuk diolah menjadi xilosa sebagai bahan baku pembuatan xilitol.

2.4.1 Taksonomi tebu²²

Divisi	:	Spermatophyta
Sub divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Monocotyledonae
Ordo	:	Poales
Famili	:	Poaceae
Genus	:	Saccharum
Species	:	<i>Saccharum officinarum</i>



Gambar 2.11 Tanaman tebu²²

2.4.2 Morfologi Tebu ^{20,21}

- Batang : terdiri dari banyak ruas yang setiap ruasnya dibatasi oleh buku-buku sebagai tempat duduknya daun. Tinggi tanaman tebu berkisar 2-4 meter. Batang tebu mengandung serat dan kulit batang (12,5%), dan nira yang terdiri dari gula, mineral, dan bahan-bahan non gula lainnya (87,5%).
- Daun : bentuk daun tebu berwujud helaian dengan pelepah. Panjang daun dapat mencapai panjang 1-2 meter dan lebar 4-8 cm dengan permukaan kasar dan berbulu.
- Bunga : berupa bunga majemuk di puncak sebuah poros gelagah.
- Akar : berbentuk serabut
- Biji : merupakan biji tunggal

2.4.3 Ampas tebu

Ampas tebu adalah limbah padat hasil samping dari industri gula tebu.

Dalam proses produksi di pabrik gula, dari setiap tebu yang diproses dihasilkan ampas tebu sebesar 90%, gula yang dimanfaatkan hanya 5%.

Sisanya berupa tetes tebu (molase) dan air.

2.4.3.1 Komposisi ampas tebu

Hasil analisis serat ampas tebu adalah sebagai berikut : Selulosa 37,65% ; pentosan 27,97 % ; lignin 22,09 % ; SiO₂ 3,01% ; abu 3,82% dan sari 1,81 %²³.

Ampas tebu mengandung komponen pentosan (hemiselulosa) dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan sekam padi dan kelapa sawit. Pentosan dalam ampas tebu merupakan suatu bentuk hemiselulosa dengan presentase sebesar 27,97%, sedangkan kadar pentosan dalam sekam padi (16,94-21,95%) dan pada kelapa sawit (24%)²⁴.

2.4.3.2 Manfaat ampas tebu

Selama ini, pemanfaatan ampas tebu yang dihasilkan masih terbatas untuk makanan ternak, bahan bakar boiler di pabrik gula, media pertumbuhan jamur, bahan pembuatan pupuk, pulp dan kertas. Diperkirakan masih terdapat kelebihan sekitar 1,6% dari bobot ampas tebu yang belum dimanfaatkan dan terbuang percuma.

Melihat ampas tebu yang melimpah, kandungan pentosan yang tinggi dan harga yang murah, memungkinkan ampas tebu untuk diolah menjadi produk bernilai ekonomi tinggi seperti xilitol.

2.5 Hidrolisis

Hidrolisis adalah peristiwa pemecahan molekul besar menjadi bagian-bagian yang lebih kecil yang merupakan komponen monomer dari senyawa

itu sendiri. Proses hidrolisis ini harus ada unsur airnya. Reaksi hidrolisis dapat dipercepat dengan menggunakan enzim atau asam sebagai katalis.

Hidrolisis lignoselulosa dapat dilakukan secara enzimatik maupun kimiawi.

Hidrolisis secara enzimatik menghasilkan produk hidrolisis yang lebih spesifik, akan tetapi monomer gula yang dihasilkan sedikit karena enzim sulit menembus bagian lignin yang merupakan pembentuk dinding sel yang kokoh. Hidrolisis secara kimiawi menggunakan asam dapat menghidrolisis hemiselulosa dan selulosa. Akibatnya akan dihasilkan produk hidrolisis yang berupa campuran. Selain itu, hidrolisis dengan menggunakan asam dapat mengakibatkan monosakarida yang dihasilkan terdegradasi menjadi senyawa bentuk lain²⁵. Dengan mengatur konsentrasi asam yang digunakan selama proses hidrolisis, maka senyawa yang dapat terhidrolisis dapat dikontrol menjadi hanya hemiselulosa saja.

Asam yang biasa digunakan sebagai katalis dalam proses hidrolisis, antara lain adalah H_2SO_4 , HCl , HF , atau CH_3COOH . Asam-asam tersebut melepaskan proton yang memecahkan ikatan eter heterosiklik antara monomer gula dalam rantai polimer yang dibentuk oleh hemiselulosa dan selulosa. Pemecahan ikatan ini menghasilkan berbagai senyawa, terutama gula seperti xilosa, glukosa, dan arabinosa. Senyawa lain yang dihasilkan adalah oligomer, furfural, dan asam asetat^{26 & 27}. Sejumlah tertentu hidrolisis hemiselulosa dapat dilakukan hampir tanpa disertai hidrolisis selulosa, karena ikatan pada hemiselulosa lebih lemah dibandingkan ikatan pada selulosa. Hidrolisat yang diperoleh dapat digunakan untuk diubah menjadi

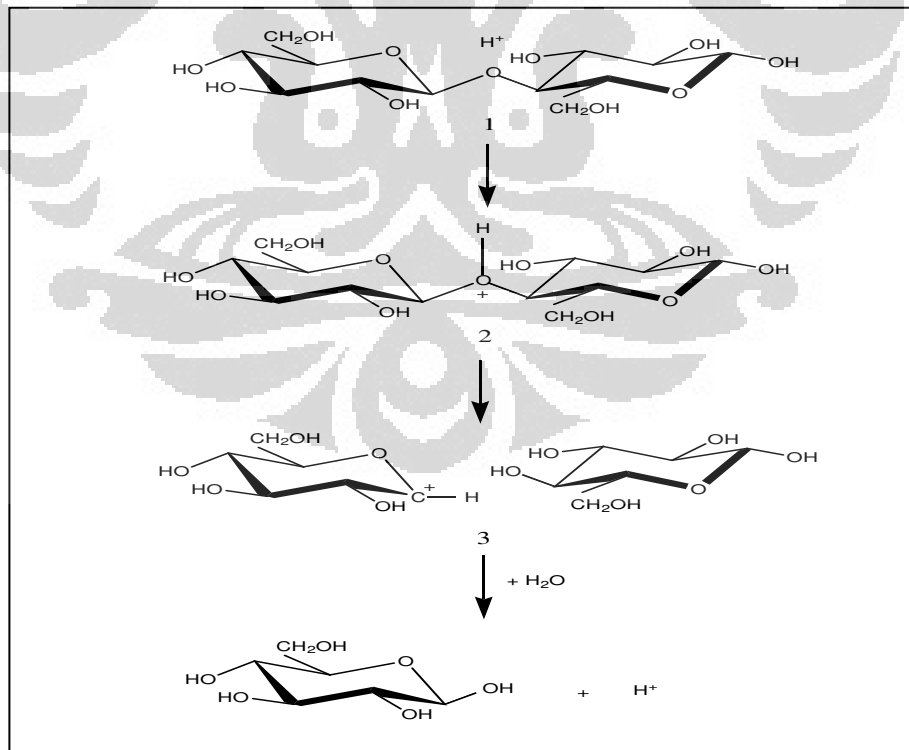
xilitol. Untuk proses fermentasi, kehadiran asam asetat dan atau furfural dalam hidrolisat dapat menghambat atau mencegah proses fermentasi secara berkelanjutan. Oleh karena itu, hidrolisat dengan konsentrasi inhibitor yang rendah sangat dibutuhkan.

Asam asetat dalam bentuk tidak terdissosiasi dapat menginhibisi proses fermentasi mikroorganisme, begitu juga furfural. Furfural dapat dibentuk dengan mudah pada konsentrasi asam dan suhu yang tinggi. Oleh karena itu, untuk mengurangi degradasi xilosa menjadi furfural dapat dilakukan melalui pengurangan konsentrasi asam pada proses hidrolisis. Selain itu, cara lain yang dapat digunakan untuk mengurangi inhibitor (konsentrasi senyawa-senyawa beracun dalam hidrolisat), dapat dilakukan dengan pemberian karbon aktif²⁶.

Hemiselulosa yang merupakan polimer bercabang, tidak membentuk mikrofibril yang kristalin dan rigid seperti selulosa, sehingga lebih mudah diakses saat dihidrolisis¹⁹. Dengan pengaturan pemberian konsentrasi asam untuk tujuan hidrolisis, diharapkan hemiselulosa akan terhidrolisis terlebih dahulu dibandingkan selulosa, sehingga produk hidrolisis (hidrolisat) yang dihasilkan adalah berasal dari hemiselulosa saja. Monosakarida-monosakarida yang terbentuk selama proses hidrolisis oleh asam jumlahnya akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam dan waktu hidrolisis. Begitu pula dengan jumlah pentosa dan heksosa yang cenderung mengalami degradasi menjadi furfural dan 5-hidroksimetil furfural, jika konsentrasi asam, waktu, dan suhu reaksi hidrolisis ditingkatkan²⁸.

Hidrolisis selulosa pada hakikatnya adalah pemutusan ikatan β (1-4) glikosida antara satuan-satuan glukosa dalam molekul poli-glukosa. Selulosa lebih sulit dihidrolisis daripada hemiselulosa, karena memiliki derajat kristalinitas yang tinggi. Adanya ikatan hidrogen intramolekular dan intermolekular menyebabkan selulosa tersusun rapat, teratur dan rigid.

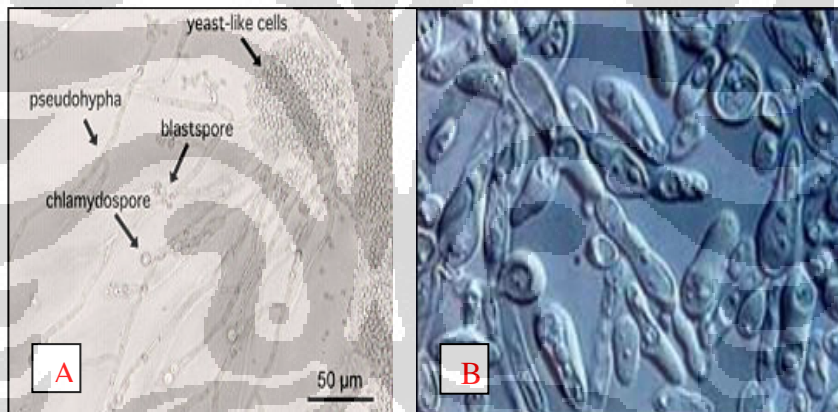
Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida yang terdiri atas tiga tahap. Pada tahap pertama, proton -sebagai katalis asam- berinteraksi dengan oksigen glikosida (ikatan glikosida) yang menghubungkan dua unit gula dan membentuk asam konjugat. Langkah ini diikuti oleh pemecahan secara lambat ikatan C-O (glikosida) menghasilkan intermediet kation karbonium siklik. Setelah mengalami adisi yang cepat, maka terbentuklah gula bebas²⁹. Reaksinya terlihat pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Mekanisme hidrolisis asam pada ikatan glikosida²³

2.6 Khamir

Khamir merupakan bentuk pertumbuhan dari mikroorganisme eukariotik yang berada pada kerajaan fungi. Khamir merupakan golongan fungi yang umumnya merupakan fakultatif anaerob. Terdapat sekitar 1500 spesies khamir yang telah ditemukan, dan kebanyakan bereproduksi secara asexual dengan cara *budding*, walaupun ada sebagian dengan cara pembelahan biner. Khamir memiliki keragaman dalam hal ukuran, ada yang berdiameter 3-7 μm , ada pula yang dapat mencapai 40 μm . Khamir umumnya digunakan dalam produksi etanol dalam produksi biofuel.



Gambar 2.13 Foto mikroskopi khamir³⁰

A : khamir dari genus *Candida*

B : *Candida boidinii*

2.6.1 *Candida*

Candida adalah genus dari khamir. Secara klinis, anggota yang paling berpengaruh dari genus ini adalah *Candida albicans*, yang dapat menyebabkan sejumlah infeksi (disebut *candidiasis* atau *trush*) pada manusia

dan hewan lain, khususnya pada pasien *immunocompromised*. Berbagai spesies candida adalah anggota dari *gut flora* pada hewan, termasuk *Candida albicans*.

Di antara spesies *Candida*, *C. albicans*, yang dapat berkomensalisme pada kulit dan saluran gastrointestinal serta kandung kemih, bertanggung jawab untuk sebagian besar infeksi pembuluh darah (*candidemia*). Selain itu, ada peningkatan kejadian infeksi yang disebabkan oleh *C. glabrata*. Spesies *Candida* lain yang penting secara medis meliputi *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, dan *C. dubliniensis*. Spesies *Candida* yang lain, seperti *C. oleophila* telah digunakan sebagai agen kontrol Biologis pada buah-buahan.

Taksonomi dari *Candida* adalah sebagai berikut:

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

Genus *Candida* sering kali digunakan untuk memfermentasikan xilosa menjadi xilitol, sebagai contoh adalah *Candida tropicalis*. Diketahui bahwa, spesies tersebut memiliki enzim-enzim yang dapat mereduksi D-xilosa menjadi D-xilitol. Selain itu, *Candida tropicalis* juga memiliki enzim *D-xylose reductase* (XR) dan *xylitol dehidrogenase* (XDH), namun tidak memiliki enzim *xylose isomerase*. Spesies ini memiliki aktivitas NAD^+ -linked XDH yang tinggi serta aktivitas NADP^+ -linked XDH yang rendah. Pada kehadiran NADPH dan NAD^+ yang cukup, xilitol akan diproduksi dari D-xilosa dan xilitol yang dibentuk secara perlahan akan didehidrogenasi menjadi D-xilulosa.

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

2.7 Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata ferment yang berarti mendidih. Pada awalnya fermentasi didefinisikan sebagai anggur yang mendidih, kemudian pengertiannya berkembang secara luas menjadi penggunaan mikroorganisme untuk bahan pangan. Fermentasi didefinisikan sebagai

proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO_2) oleh khamir yang terdapat pada cairan ekstrak buah anggur tersebut. Dari definisi ini kemudian berkembang menjadi suatu kultur mikroorganisme dalam proses optimum untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim atau produk lain.

Khamir yang digunakan dalam proses biokonversi xilosa murni menjadi xilitol adalah *Candida* sp. Khamir ini tidak mampu menggunakan xilosa dalam hidrolisat hemiselulosa ampas tebu begitu saja, sehingga perlu dilakukan perlakuan awal terlebih dahulu, yaitu dengan cara menambahkan nutrisi tambahan ke dalam hidrolisat ampas tebu. Nutrisi yang ditambahkan berupa mineral-mineral seperti KH_2PO_4 , MgSO_4 , ekstrak khamir, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Selain itu, dapat juga dilakukan perlakuan awal terhadap ampas tebu, yaitu ampas tebu yang akan digunakan dilakukan penambahan ammonia. Untuk produksi xilitol, perlakuan dengan ammonia bermanfaat dalam mempersiapkan substrat yang kaya akan xilosa dari hemiselulosa ampas tebu. Pendekatan ini tidak hanya untuk memproduksi substrat hemiselulosa yang lebih baik untuk biokonversi, tetapi juga mendapatkan hasil xilitol yang lebih tinggi dan waktu fermentasi yang lebih cepat daripada hidrolisat tanpa perlakuan dengan ammonia²⁵.

Pada proses fermentasi xilosa, kehadiran glukosa mengakibatkan xilitol yang dihasilkan menjadi lebih rendah dibandingkan tanpa kehadiran glukosa³¹.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan bahan kimia

3.1.1 Alat –alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan yaitu: labu erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, pipet volumetri (5; 10; 20; 25mL), pipet ukur (2; 5mL), pipet tetes, *beaker glass* , batang pengaduk, corong gelas, tabung sentrifugasi, labu didih, kondensor, cawan petri, botol semprot, jarum ose, pipet mikro, propipet (*bulb*), tabung reaksi, *tip* ukuran 1 mL.

Instrumentasi yang digunakan yaitu : blender, vortex, autoklaf, oven, alat sentrifugasi, timbangan analisis, alat *degassing*, *shaker (fermentor)*, *heating mantel*, *syringe*, HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, dan detektor Refraktif Indeks (RID-10A), pompa LC-20AB, dan pH meter.

3.1.2 Bahan-bahan kimia yang digunakan

Standar glukosa, xilosa, ampas tebu, H_2SO_4 , air suling, ekstrak khamir, ammonium sulfat, magnesium sulfat, KH_2PO_4 , glukosa, pepton, *malt extract*, agar-agar, NaOH, aquabidest, alkohol 70%, kertas lakmus merah dan biru, karbon aktif, kertas saring, resin penukar kation dan anion, filter membran nitroselulosa nitrat 0.45 μ m

3.2 Prosedur kerja

3.2.1 Pembuatan sampel ampas tebu

Kulit luar ampas tebu yang keras dibuang, lalu diambil bagian dalamnya saja. Kemudian direndam beberapa saat, dan dicuci berulang kali. Ampas tebu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung, lalu digunting kecil-kecil. Kemudian diblender sampai halus. Hasil dari proses blender ini disaring lagi agar dihasilkan serbuk ampas tebu yang lebih halus. Sampel serbuk halus ampas tebu ini selanjutnya digunakan untuk pengujian berikutnya, yaitu untuk dihidrolisis.

3.2.2 Pembuatan hidrolisat

Ampas tebu sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 30 mL larutan H_2SO_4 0.3M. Kemudian, sampel ditutup dengan sumbat kapas dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk dihidrolisis selama 25 menit pada suhu 250°F (121°C). Segera setelah proses hidrolisis selesai, ke dalam hidrolisat ditambahkan NaOH 0,5 M untuk menetralkan asam sulfat, sehingga diharapkan reaksi hidrolisis akan terhenti. Setelah dinetralkan, hidrolisat disaring dengan menggunakan kertas saring biasa dan filtratnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan putaran 3000 rpm. Kemudian supernatannya ditambahkan 1 g karbon aktif, dan didiamkan selama 15 menit lalu disaring dengan kertas saring.

Untuk pengujian kadar xilosa dalam hidrolisat, filtrat yang didapatkan dari hasil sentrifugasi, ditambahkan dengan resin penukar kation dan anion terlebih dahulu. Setelah itu, disaring dengan menggunakan membran nitroselulosa dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C. Dibawah ini adalah gambar alat instrumentasi HPLC yang digunakan.



Gambar 3.1 Instrumentasi HPLC

3.2.3 Pembuatan larutan standar

3.2.3.1 Larutan standar xilosa

Larutan induk xilosa 500ppm dibuat dengan menimbang 25 mg xilosa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat deret larutan standar xilosa berikutnya, dengan variasi konsentrasi sebesar 25, 50, 100 dan 250 ppm. Larutan induk xilosa 500 ppm

dipipet sebanyak 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 12,5 mL, kemudian masing- masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Deret larutan standar xilosa ini dianalisis menggunakan HPLC dengan kondisi kecepatan alir 1mL/menit, suhu oven 80⁰C, 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 garis regresi linier.

3.2.3.2 Larutan standar glukosa

Larutan induk glukosa 40 ppm dibuat dengan cara menimbang 2 mg glukosa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar glukosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 0,5 ; 5 ; 10 ; 25 ppm. Larutan induk glukosa 40 ppm dipipet sebanyak 0,3125; 3,125 ; 6,25 dan 15,625 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Langkah pekerjaan selanjutnya sama seperti tahap 3.2.3.1 di atas.

3.2.3.3 Larutan Standar Xilitol

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

aquades sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar xilitol berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 20 ; 50 ; dan 100 ppm. Larutan induk xilitol 500 ppm dipipet sebanyak 2,0 ; 5,0 ; dan 10,0 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Langkah pekerjaan selanjutnya, sama seperti tahap 3.2.3.1 di atas.

3.2.3.4 Larutan standar arabinosa

Larutan standar arabinosa 500ppm dibuat dengan menimbang 50 mg arabinosa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk membuat deret larutan standar arabinosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 20 ; 50 ; dan 100. Larutan induk arabinosa 500 ppm dipipet sebanyak 2,0 ; 5,0 ; dan 10,0 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Langkah pekerjaan selanjutnya, sama seperti tahap 3.2.3.1 di atas.

3.2.4 Sterilisasi alat

Semua alat-alat gelas yang digunakan untuk fermentasi dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 150⁰ C selama 2 jam. Sedangkan alat plastik (*tip*) dan media yang akan digunakan dilakukan

sterilisasi basah menggunakan autoklaf (tekanan 2 atm pada suhu 160 °C selama 15 menit).

3.2.5 Penyiapan inokulum

Dalam proses ini digunakan sel mikroorganisme berupa khamir dari genus *Candida* yang didapat dari laboratorium mikrobiologi UICC (Universitas Indonesia *Culture Collection*). Khamir yang digunakan adalah *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii*. Spesies khamir yang akan digunakan harus dimurnikan (purifikasi) dengan metode cawan gores. Metode cawan gores ini merupakan cara yang paling umum dan mudah untuk pemurnian mikroorganisme dari kontaminasi mikroorganisme lain. Hasil pemurnian ini diinkubasi dalam media agar miring sebagai *stock culture*, dan bila akan digunakan untuk fermentasi dapat diaktifkan terlebih dahulu dengan cara memindahkan *stock culture* ke dalam media agar miring lain dan diinkubasi selama 2 hari. Media yang digunakan untuk menginkubasi mikroorganisme ini adalah YMA (*yeast malt agar*) yang terdiri dari : Ekstrak khamir (3 g/L) , *malt extract* (3 g/L), pepton (5 g/L), glukosa (10 g/L), agar (15 g/L).

Kultur tersebut kemudian dikembangkan dalam medium yang mengandung 20 g/L xilosa sebagai sumber karbonnya. Sedangkan sebagai nutrisinya digunakan 1 g/L ekstrak khamir dan mineral berupa ammonium sulfat (NH₄)SO₄ sebesar 1 g/L dan magnesium sulfat MgSO₄.7H₂O sebesar 0.1 g/L dengan pH sekitar 6 dengan penambahan basa. Kemudian suhunya

diatur pada suhu 30 °C (suhu kamar rata-rata di Jakarta). Untuk proses fermentasi, xilosa murni digantikan oleh xilosa dari hasil hidrolisis.

3.2.6 Fermentasi

Khamir yang telah diaktifkan dan disesuaikan umurnya selama 2 hari, dijadikan suspensi khamir. Suspensi ini didapatkan dengan cara menambahkan 10 mL aquadest steril ke dalam biakan agar miring kemudian menggoreskan semua khamir yang ada di dalam tabung reaksi sampai larut semua ke dalam air. Suspensi yang didapatkan segera dikumpulkan dalam erlenmeyer dan di *vortex* agar homogen sebelum ditambahkan ke dalam substrat untuk fermentasi. Sebagian dari suspensi yang didapatkan, digunakan untuk uji TPC, untuk mengetahui jumlah sel khamir.

Hidrolisat yang akan digunakan sebagai medium fermentasi ditambahkan dengan mineral - mineral $\{(NH_4)_2SO_4, KH_2PO_4, \text{ dan } MgSO_4\}$ serta ekstrak khamir. Kemudian dilakukan pengukuran pH (pH optimum untuk pertumbuhan khamir adalah sekitar 6), lalu medium disterilisasi dengan menggunakan autoklaf. Sebanyak 2,5 mL suspensi khamir dimasukkan ke dalam medium dengan volume 50 mL. Setelah itu, dilakukan inkubasi dengan menggunakan *shaker* selama 2 hari pada suhu 30 °C, dengan kecepatan putaran shaker adalah 110 rpm.

Fermentasi dihentikan setelah 2 hari dengan cara memanaskannya dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan diambil

filtratnya lalu ditambahkan resin penukar anion dan kation, kemudian disaring dan dilakukan perhitungan kadar xilosa dan xilitol menggunakan HPLC.

3.2.7 Penentuan jumlah sel khamir

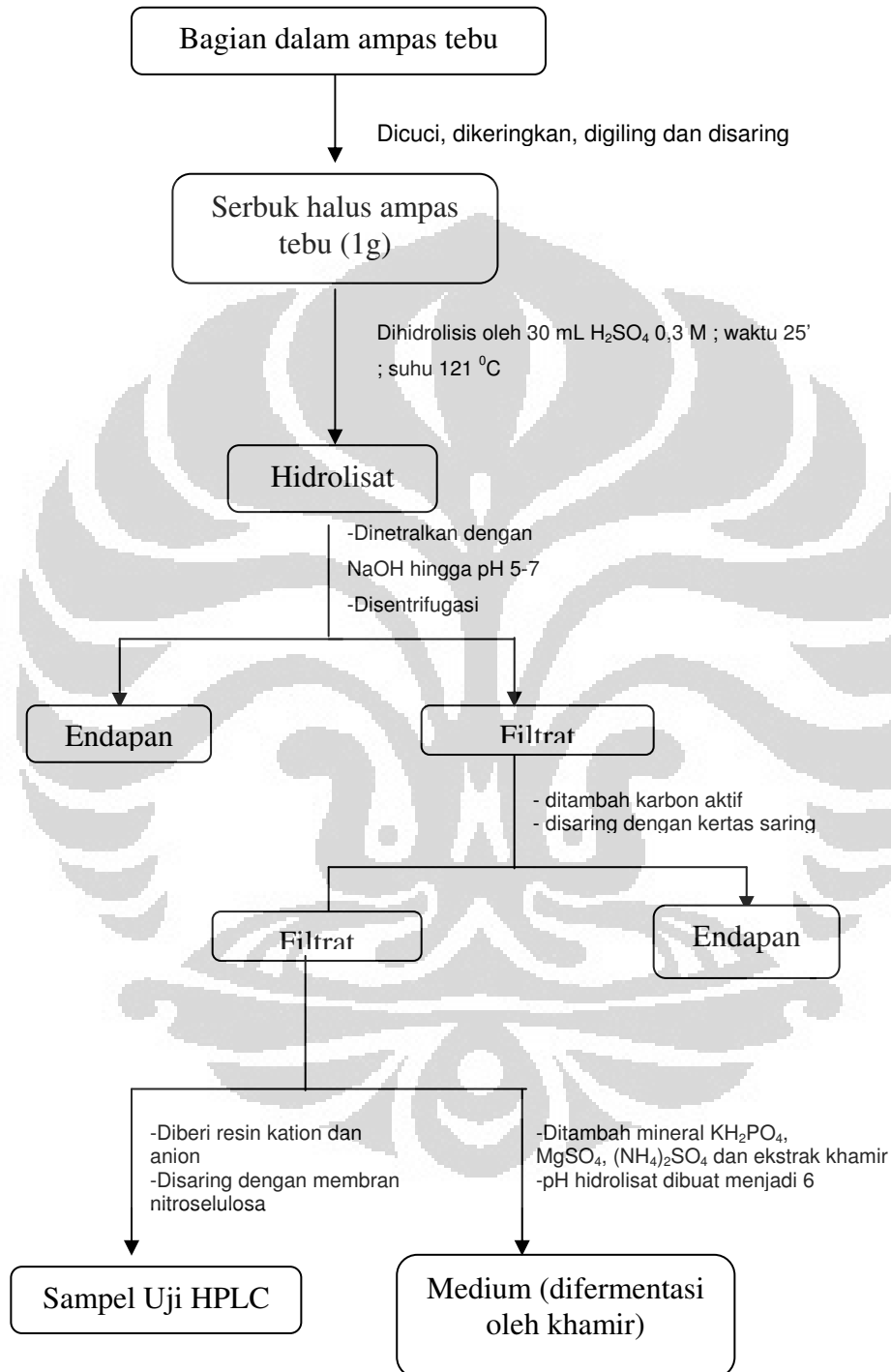
Jumlah sel khamir saat awal proses fermentasi, didapatkan dari perhitungan TPC (*Total Plate Count*). Hal ini dilakukan dengan cara menuangkan 1 mL suspensi khamir ke dalam 99 mL air steril, kemudian dilakukan pengenceran sampai 10^7 kali. Jadi pengenceran ini terbagi menjadi 5 tahap, yaitu pengenceran 10^2 ; 10^4 ; 10^5 ; 10^6 dan 10^7 kali . Pengenceran ini diberi label 1 ; 2 ; 3 ; 4 dan 5. Hasil dari masing-masing pengenceran ini diinkubasi 2 hari pada cawan petri yang mengandung media YMA. Setelah 2 hari dilakukan perhitungan koloni yang diperoleh (diambil yang berjumlah 30 s.d 300 koloni sel).

3.2.8 Variasi kondisi fermentasi yang dilakukan

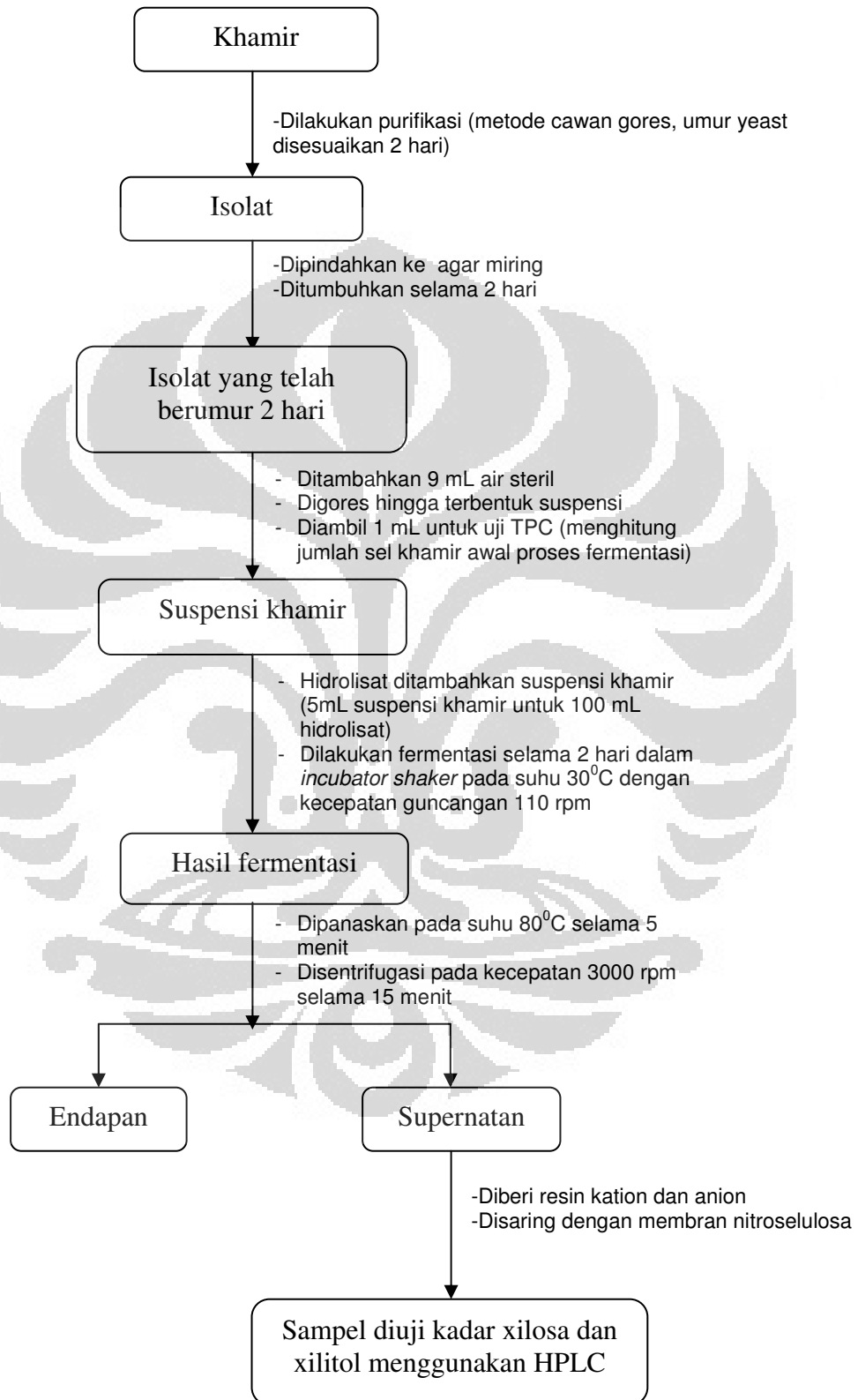
- 1 Variasi jenis khamir yang digunakan (*Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii*)
- 2 Variasi kondisi jumlah oksigen terlarut pada fermentasi (erlenmeyer ditutup rapat dengan plastik dan ditutup dengan kapas)
- 3 Variasi substrat hidrolisat untuk fermentasi (tanpa adanya sisa hidrolisat dan adanya sisa hidrolisat)

3.3 Diagram kerja secara umum

3.3.1 Hidrolisis



3.3.2 Fermentasi



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, hasil hidrolisis kimiawi xilan yang terdapat dalam ampas tebu, digunakan sebagai bahan pembuatan xilitol secara fermentasi menggunakan khamir dari genus *candida*. Spesies *candida* yang digunakan adalah *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii*. Kondisi optimum proses hidrolisis kimiawi xilan menggunakan asam sulfat pada ampas tebu telah diteliti sebelumnya³². Spesies khamir yang digunakan telah diteliti sebelumnya oleh kelompok kami yang dilakukan oleh Riki, dan didapatkan data bahwa khamir tersebut dapat mengkonversi D-xilosa menjadi xilitol melalui proses fermentasi. Jadi pada penelitian ini, akan dibuktikan bahwa xilosa yang terdapat di dalam hasil hidrolisis ampas tebu juga dapat difermentasikan oleh khamir untuk dikonversi menjadi xilitol.

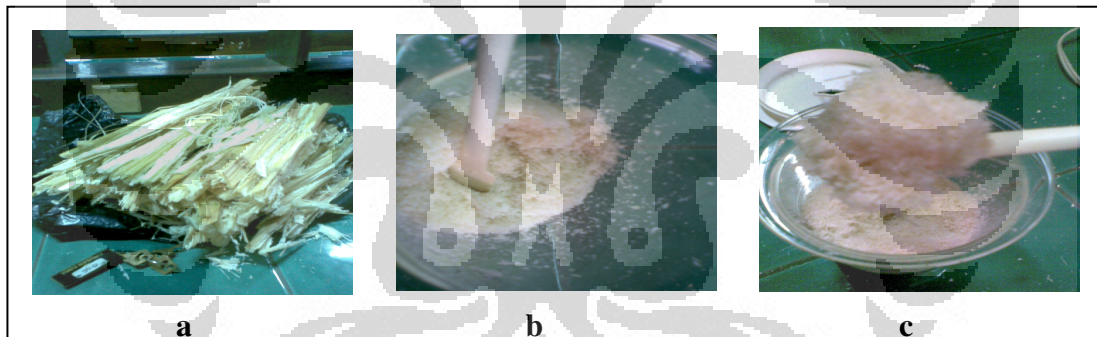
4.1 Sampling Ampas Tebu

Ampas tebu yang digunakan pada penelitian ini, diperoleh dari pedagang sari tebu di sekitar Depok. Tanaman tebu ini dipasok dari daerah Tegal, Jawa-Tengah. Beberapa alasan penggunaan ampas tebu sebagai sumber hemiselulosa, yaitu: Kadar pentosan/xilan pada ampas tebu (27,97 %) lebih tinggi dibandingkan dengan limbah lignoselulosa lainnya yang paling mungkin dimanfaatkan seperti sekam padi (16,94-21,95 %) dan sabut kelapa sawit (24 %) ^{23 & 24}. Kemudian potensi ampas tebu di Indonesia cukup

melimpah (data di sub bab 2.4), ditambah lagi masih terdapat sisa dari limbah ampas tebu yang belum dimanfaatkan sehingga nilainya rendah. Hal ini sangat mendukung apabila suatu waktu penelitian ini dilakukan untuk skala industri. Atas dasar beberapa alasan tersebut, memungkinkan ampas tebu untuk diolah menghasilkan produk bernilai ekonomi tinggi, seperti xilitol.

4.2 Pembuatan Sampel Ampas Tebu

Kulit luar ampas tebu yang keras, dibuang lalu diambil bagian dalamnya saja agar dapat mempermudah proses penghalusan ampas tebu. Berikut merupakan gambar ampas tebu:



Gambar 4.1 Ampas tebu yang masih kasar (a dan b) dan ampas tebu yang telah dihaluskan (c)

Ampas tebu dicuci berulang kali dengan menggunakan air untuk meminimalisir sisa-sisa sukrosa yang kemungkinan masih tertinggal, kemudian segera dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dijemur secara tidak langsung. Pengeringan ini bertujuan agar ampas tebu tidak rusak, karena media yang mengandung kadar air yang tinggi dan adanya gula sangat rentan untuk ditumbuhi jamur.

Ampas tebu yang sudah benar-benar kering, selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk ampas tebu yang halus, kemudian disaring lagi sehingga didapatkan bentuk seperti tepung. Penghalusan ini bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan kontak substrat ampas tebu, sehingga dapat mempermudah reaksi hidrolisis dengan asam.

Reaksi hidrolisis dilakukan di dalam autoklaf. Alat autoklaf digunakan sebagai alternatif agar reaksi dapat berlangsung pada suhu lebih tinggi dari 100 °C dan pada tekanan yang tinggi. Gambar alat autoklaf yang digunakan untuk hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.2



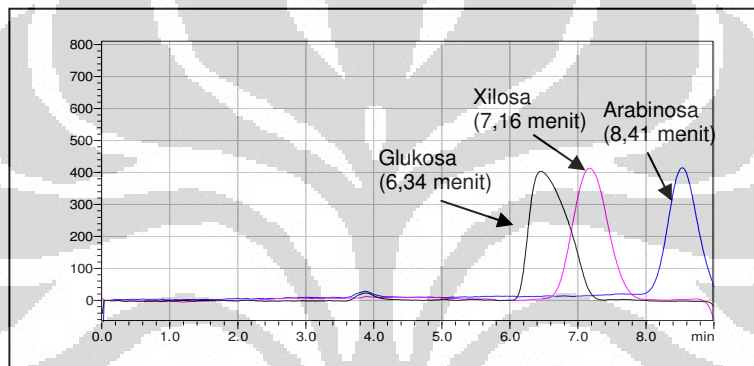
Gambar 4.2 Alat autoklaf

Diharapkan reaksi hidrolisis berlangsung sesingkat mungkin, karena hal ini dapat mempengaruhi pembentukan produk samping yang tidak diinginkan dari hasil degradasi karbohidrat. Ada beberapa parameter yang mempengaruhi terbentuknya produk xilosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis kimiawi ini, yaitu konsentrasi asam sulfat, waktu dan suhu reaksi.

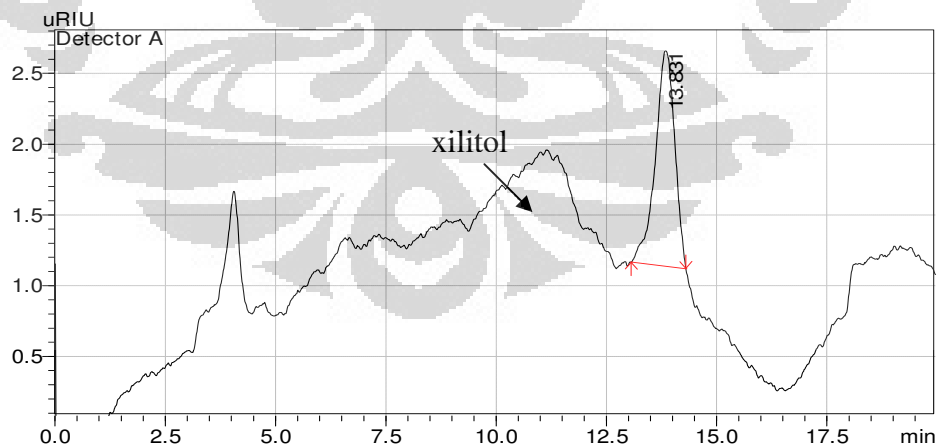
Parameter ini didapatkan dari penelitian sebelumnya³². Hasil yang didapatkan kemudian diukur menggunakan HPLC.

4.3 Identifikasi Standar Karbohidrat

Masing-masing standar karbohidrat diukur dengan HPLC, agar diketahui waktu retensinya untuk uji kualitatif. Berikut kromatogram HPLC untuk setiap standar karbohidrat.



Gambar 4.3 Kromatogram standar karbohidrat



Gambar 4.4 Kromatogram standar xilitol 500 ppm

Semua hasil pengukuran HPLC berupa kromatogram HPLC dan grafik deret masing-masing standar tertera dalam Lampiran 1 dan 2. Untuk kromatogram hasil variasi hidrolisis (bentuk substrat, konsentrasi asam, waktu hidrolisis) ampas tebu tertera pada Lampiran 3. Kromatogram hasil variasi kondisi fermentasi (rapat dan kurang rapat, spesies khamir, substrat hidrolisat) tertera dalam Lampiran 4,5, dan 6.

4.4 Hidrolisis ampas tebu

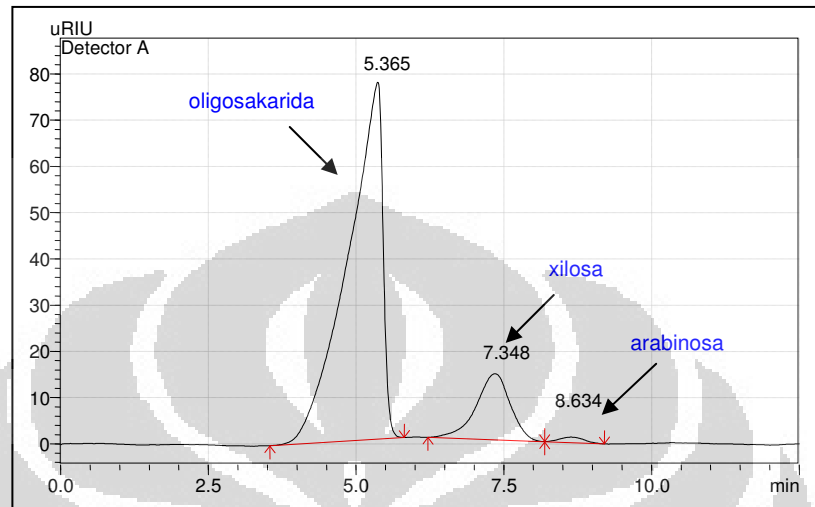
Hidrolisis pada kondisi optimum, dimaksudkan agar didapatkan xilosa dalam jumlah yang paling besar, yaitu dengan cara menggunakan asam sulfat 0,3M sebagai katalis, dan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121^oC selama 25 menit. Penggunaan autoklaf ini, dimaksudkan agar reaksi hidrolisis dapat berlangsung pada suhu tinggi dan tekanan yang tinggi pula.

Proses hidrolisis dihentikan dengan cara menetralkan asam sulfat dengan sejumlah basa sampai didapatkan pH sekitar 5 sampai 6. Pada penelitian ini, digunakan NaOH untuk menetralkan asam sulfat. Penetralan dimaksudkan agar hidrolisat tidak terhidrolisis secara terus-menerus, sedangkan pH penetralan berkisar antara 5,0 - 7,0. Hal ini dilakukan karena apabila pH lebih besar dari 7,0 (hidrolisat bersifat basa) dikhawatirkan akan dapat merusak cincin karbohidrat. Selanjutnya ditambahkan karbon aktif untuk menghilangkan warna coklat yang terbentuk selama proses hidrolisis akibat proses karamelisasi yang menghasilkan senyawa seperti furfural dan hidroksimetilfurfural yang terbentuk ²⁶.

Hidrolisat ampas tebu yang didapatkan mengandung beberapa senyawa-senyawa kimia, karena proses hidrolisis ini dikatalisis oleh asam sulfat yang memecah polisakarida secara acak. Pada penelitian ini, digunakan konsentrasi asam sulfat yang relatif rendah (0,3 M), karena pada konsentrasi ini hemiselulosa telah dapat dihidrolisis, sedangkan selulosa belum sempat terhidrolisis semua. Sejumlah tertentu hidrolisis hemiselulosa dapat dilakukan hampir tanpa kerusakan selulosa karena ikatan pada hemiselulosa lebih lemah dibandingkan ikatan pada selulosa. Mengingat struktur hemiselulosa lebih renggang dibandingkan dengan selulosa²⁴. Hal ini secara umum berkaitan dengan struktur hemiselulosa yang berbentuk amorf, tidak teratur, sehingga lebih mudah dihidrolisis. Sedangkan selulosa membentuk mikrofibril yang kristalin, teratur dengan rigiditas tinggi menjadikan selulosa sulit dihidrolisis, sehingga dibutuhkan konsentrasi H₂SO₄ yang relatif lebih tinggi.

Selain dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis, H₂SO₄ juga menyebabkan degradasi senyawa-senyawa monosakarida membentuk furfural dan 5-hidroksimetil furfural (HMF). Adanya senyawa furfural dan HMF dapat bersifat racun (inhibitor) bagi mikroorganisme²⁶. Bila senyawa ini tidak dihilangkan maka pertumbuhan mikroorganisme akan terganggu dan proses fermentasi tidak akan berjalan dengan baik. Oleh karena itu, perlu ditambahkan karbon aktif pada hidrolisat agar senyawa furfural dan HMF dapat diminimalisir kadarnya. Hasil hidrolisis ini diuji kandungan xilosanya

dengan menggunakan HPLC. Gambar kromatogram hidrolisat ampas tebu yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Kromatogram hidrolisat ampas tebu

Hasil hidrolisis menunjukkan bahwa dalam sampel ampas tebu dihasilkan produk utama berupa monomer xilosa dan produk samping berupa arabinosa serta adanya oligosakarida yang merupakan sisa dari hemiselulosa atau selulosa yang belum terhidrolisis sempurna. Xilosa dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa berupa xilan, sedangkan arabinosa dihasilkan dari hidrolisis cabang rantai induk xilan.

Selain arabinosa, produk samping monosakarida yang biasa dihasilkan dari hidrolisis hemiselulosa pada ampas tebu adalah glukosa yang merupakan hasil hidrolisis selulosa. Namun, dalam kromatogram tidak terdeteksi adanya glukosa. Glukosa adalah hasil hidrolisis dari selulosa. Hal ini membuktikan bahwa hidrolisis hemiselulosa untuk menghasilkan xilosa

dengan konsentrasi asam yang rendah hampir tidak menimbulkan kerusakan pada selulosa, karena ikatan pada hemiselulosa lebih lemah dibandingkan ikatan pada selulosa. Sedangkan dari kromatogram HPLC terlihat adanya arabinosa yang membuktikan bahwa telah terjadi hidrolisis cabang rantai induk xilan. Hidrolisat yang mengandung xilosa ini kemudian dijadikan medium untuk fermentasi, sehingga xilosa dapat dikonversi menjadi xilitol.

Variasi hidrolisis juga dilakukan dengan menggunakan bentuk substrat ampas tebu yang berbeda, yaitu bentuk yang halus (serbuk) dan bentuk yang kasar, waktu hidrolisis yang berbeda (20 menit, 25 menit, dan 1 jam) dan konsentrasi asam yang berbeda (0,3 dan 0,15 M). Pada saat dilakukan variasi waktu, substrat yang digunakan adalah yang berbentuk halus dan digunakan konsentrasi asam sulfat 0,3M. Dari variasi waktu dan substrat, didapatkan waktu yang optimum (artinya dihasilkan xilosa dalam jumlah yang paling besar), yaitu pada saat hidrolisis dilakukan selama 25 menit. Data dapat dilihat pada Tabel berikut.

Tabel 4.1 Konsentrasi xilosa terhadap variasi waktu

waktu (menit)	xilosa (g/L)	xilosa (g/30mL)	% xilosa (w/w)
20	3,966	0.119	11,898
25	5,136	0.154	15,41
60	3,870	0.116	11,605

Semakin lama waktu berlangsungnya proses hidrolisis kimiawi, maka semakin banyak ikatan-ikatan glikosida pada polisakarida yang terputus membentuk monomer-monomernya. Hal ini sesuai dengan kecenderungan kadar xilosa yang semakin meningkat seiring bertambahnya waktu hidrolisis. Namun, setelah mencapai waktu optimum, kadar xilosa cenderung turun. Hal ini dikarenakan furfural dan HMF yang terbentuk semakin bertambah seiring dengan meningkatnya waktu hidrolisis, sehingga jumlah xilosa yang terdegradasi akan jauh lebih banyak, dibandingkan dengan penambahan dari masing-masing xilosa baru yang terbentuk.

Hidrolisis ampas tebu juga dilakukan dengan bentuk yang berbeda, yaitu bentuk yang lebih halus dan bentuk yang lebih kasar. Didapatkan kadar xilosa dari substrat yang halus sebanyak 15,41% (w/w), sedangkan dari substrat yang kasar didapatkan kadar sebanyak 9,098% (w/w). Terlihat bahwa hasil hidrolisis substrat ampas tebu yang berbentuk lebih halus memiliki kadar xilosa yang lebih banyak dibandingkan yang berbentuk kasar. Hal ini disebabkan karena pada substrat yang lebih halus memiliki luas permukaan yang lebih besar, sehingga kontak antara substrat ampas tebu dengan asam sulfat menjadi lebih mudah dan reaksi hidrolisis menjadi lebih sempurna. Hasil pengolahan data untuk variasi substrat ampas tebu dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil hidrolisis variasi bentuk substrat ampas tebu

Bentuk substrat	% Kadar Xilosa (w/w)
Kasar	9,099
Halus	15,41

Hidrolisat yang dihasilkan ini, kemudian dijadikan substrat untuk fermentasi dan diharapkan bahwa xilosa yang terdapat dalam hidrolisat dapat dikonversi menjadi xilitol.

4.5 Fermentasi

Sebelum fermentasi dilakukan, semua alat dan media yang akan digunakan harus disterilkan dengan cara sterilisasi kering untuk alat-alat gelas dan sterilisasi basah (autoklaf) untuk media dan *tip*. Sterilisasi ini penting dilakukan agar tidak terjadi kontaminasi dari mikroorganisme lain.

Sebelum dilakukan fermentasi, spesies khamir yang akan digunakan harus dimurnikan (purifikasi) dengan metode cawan gores. Metode cawan gores ini merupakan cara yang paling umum dan mudah untuk pemurnian mikroorganisme dari kontaminasi mikroorganisme lain. Hasil pemurnian ini diinkubasi dalam media agar miring sebagai *stock culture* dan bila akan digunakan untuk fermentasi dapat diaktifkan terlebih dahulu dengan cara memindahkan *stock culture* ke dalam media agar miring lain dan diinkubasi selama 2 hari. Media yang digunakan untuk menginkubasi mikroorganisme ini adalah YMA (yeast malt agar) yang terdiri dari : Ekstrak

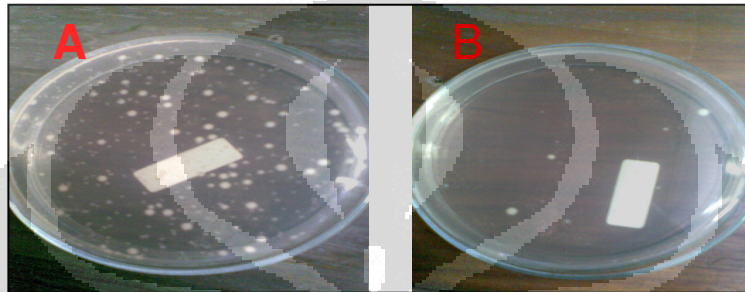
khamir (3 g/L) , *malt extract* (3 g/L), pepton (5 g/L), glukosa (10 g/L), dan agar-agar (15 g/L).

Inokulum khamir yang telah berusia 2 hari siap untuk melakukan fermentasi dan dibuat menjadi suspensi khamir, dengan cara menambahkan air steril secara aseptik. Inokulum ini ditumbuhkan dalam hidrolisat yang mengandung xilosa sebagai sumber karbon dan juga telah disterilkan dan ditambahkan senyawa kimia lain, yaitu : Ekstrak khamir merupakan sumber vitamin B yang baik dan juga sebagai sumber C dan N, sedangkan KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ merupakan sumber mineral. Selanjutnya, medium ini diatur keasamannya pada pH sekitar 6 yang merupakan kondisi optimum untuk pertumbuhan khamir secara umum. Fermentasi dilakukan selama dua hari dalam *incubator shaker* dan diharapkan pada hari kedua xilitol sudah terbentuk. Untuk mengetahui jumlah sel khamir awal yang terdapat dalam fermentor, dilakukan penghitungan dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).

4.6 Perhitungan jumlah sel khamir

Jumlah sel khamir awal yang terlibat dalam proses fermentasi, dapat mempengaruhi hasil yang didapatkan. Perhitungan jumlah sel khamir ini dilakukan dengan metode TPC. Umumnya semakin banyak jumlah sel khamir, maka hasil fermentasi yang terbentuk juga semakin banyak. Tetapi, jumlah sel khamir yang terlibat fermentasi juga memiliki batas optimum, artinya bila jumlah sel khamir yang terlibat terlalu banyak, maka hasil

fermentasi yang didapatkan juga tidak akan optimum, karena sel khamir ini akan berkompetisi dengan sesamanya untuk mendapatkan nutrisi untuk hidup. Pada penelitian ini, jumlah sel khamir dihitung pada awal saja hanya untuk mengetahui jumlah sel khamir awal yang ada dalam suspensi khamir.



Gambar 4.6 Hasil TPC dari *C. fukuyamaensis*
(A) Pengenceran 10^5 kali dan (B) Pengenceran 10^7 kali

Jumlah sel yang dapat mewakili perhitungan TPC adalah yang berkisar antara 30 s.d 300. Dari Gambar 4.7 diperoleh data bahwa jumlah khamir yang terdapat pada cawan petri A (pengenceran 10^5 kali) adalah 233 (setelah dirata-ratakan dari 226 dan 240), sehingga jumlah sel yang terdapat dalam 1 mL suspensi khamir adalah $2,33 \times 10^7$ sel khamir untuk *C.fukuyamaensis*. Sedangkan untuk *C.boidinii* didapatkan hasil TPC sebanyak 241,5 (setelah dirata-ratakan dari 232 dan 251) untuk pengenceran 10^5 , sehingga jumlah sel yang terdapat dalam 1 mL suspensi khamir adalah $2,415 \times 10^7$ sel.

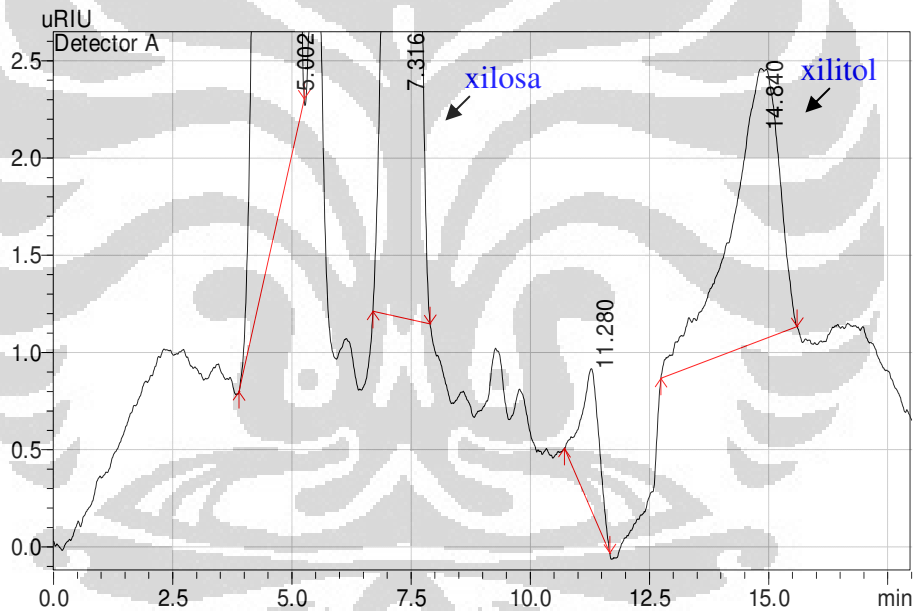
4.7 Hasil fermentasi

Fermentasi dihentikan setelah 2 hari, dengan cara memanaskan erlenmeyer yang berisi medium fermentasi dalam penangas air pada suhu 80°C selama 10 menit. Diharapkan pada suhu ini khamir akan berkurang aktivitasnya tanpa merusak struktur karbohidrat yang ada. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan putaran 3000 rpm selama 15 menit, agar sel khamir memisah dengan supernatannya. Setelah 15 menit, dilakukan dekantasi untuk memperoleh supernatannya, lalu supernatannya diberi resin penukar kation dan anion untuk menghilangkan ion-ion yang terdapat dalam supernatan (keberadaan ion dapat merusak kolom kromatografi). Supernatan yang telah bebas ion dianalisis kadar xilosa dan xilitolnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Setelah didapatkan kromatogram HPLC, kemudian ditentukan luas areanya dan besarnya dibandingkan dengan luas area standar xilosa dan xilitol yang sebelumnya sudah ditentukan. Kromatogram hasil variasi kondisi fermentasi (ditutup plastik dan ditutup sumbat kapas; spesies khamir dan substrat hidrolisat) tertera dalam Lampiran 4,5, dan 6.

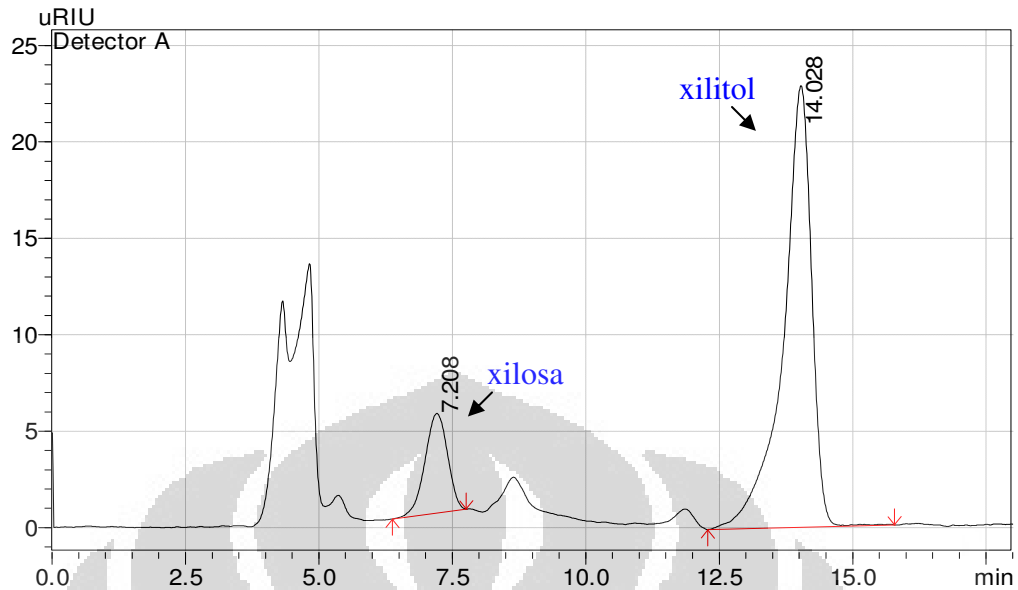
4.7.1 Hasil fermentasi dari variasi spesies

Pada proses fermentasi ini dilakukan variasi terhadap jenis khamir, dengan cara menggunakan 2 jenis khamir yang berbeda, yaitu *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii*. Dari hasil *screening* 10 spesies khamir yang dilakukan oleh kelompok penelitian kami, didapatkan

data bahwa kedua spesies ini merupakan empat terbaik yang berpotensi sebagai agen biologis yang dapat mengkonversi D-xilosa menjadi xilitol. Diduga khamir tersebut memiliki aktivitas enzim *xylose reductase* dan *xylitol dehidrogenase*, sehingga dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Pada penelitian sebelumnya (*screening* spesies khamir) digunakan D-xilosa sintetik yang berbentuk serbuk berwarna putih. Kromatogram hasil fermentasi untuk variasi spesies dapat dilihat pada Gambar 4.7 Untuk kromatogram hasil fermentasi lainnya dapat dilihat pada Lampiran 4, 5 dan 6.



Gambar 4.7 Kromatogram hasil fermentasi oleh *C. boidinii*



Gambar 4.8 Kromatogram hasil fermentasi oleh *C.fukuyamaensis*

Untuk hasil pengolahan data yang diperoleh dari kromatogram dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Tabel 4.4 berikut ini.

Tabel 4.3 Hasil fermentasi dari variasi spesies dengan menggunakan xilosa sintetik (20g/L) sebagai substrat.

Spesies	Xilosa awal (g/L)	Xilosa sisa (g/L)	Xilitol yang terbentuk (g/L)	Xilosa yang dikonsumsi (g/L)	% konversi (w/w)
<i>C.fukuyamaensis</i>	20	1,711	5,53	18,288	30,24
<i>Candida boidinii</i>	20	8,553	0,779	11,446	6,805

Tabel 4.4 Hasil fermentasi variasi spesies menggunakan substrat hidrolisat.

Spesies	Xilosa awal (g/L)	Xilosa sisa (g/L)	Xilitol yang terbentuk (g/L)	Xilosa yang dikonsumsi (g/L)	% konversi (w/w)	% yield (w/w)
<i>C.fukuyamaensis</i>	4,7401	0,069	0,341	4,671	7,312	1,025
<i>Candida boidinii</i>	4,7401	0,077	0,086	4,663	1,850	0,260

Nilai persen konversi (w/w) adalah jumlah berat xilitol yang dihasilkan dibagi dengan jumlah berat xilosa yang dikonsumsi oleh khamir. Sedangkan nilai persen yield adalah jumlah berat xilitol yang dihasilkan dari 1g ampas tebu. Dari Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa 1 g ampas tebu dapat menghasilkan 0,01025 g xilitol.

Hasil fermentasi tersebut menyatakan bahwa konversi xilitol lebih besar pada spesies *C. fukuyamaensis* dibandingkan pada *C. boidinii*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa spesies *C. fukuyamaensis* lebih berpotensi untuk menghasilkan xilitol, baik menggunakan substrat hidrolisat maupun menggunakan substrat xilosa sintetik. Maksud dari xilosa sintetik adalah xilosa yang didapatkan langsung dalam bentuk padatnya.

Kemudian dari Tabel 4.3 dan Tabel 4.4 juga dapat dilihat bahwa persen konversi xilitol lebih besar bila menggunakan substrat xilosa sintetik. Hal ini disebabkan karena pada substrat hidrolisat dimungkinkan masih ada senyawa yang bersifat inhibitor bagi khamir, sehingga kemampuan khamir untuk mereduksi xilosa menjadi berkurang. Selain itu juga karena konsentrasi xilosa pada hidrolisat kadarnya lebih kecil dibandingkan dengan kadar xilosa sintetik yang diberikan. Pada *C. fukuyamaensis* digunakan hidrolisat yang mengandung xilosa sebesar 4,7 g/L sedangkan pada substrat xilosa sintetik digunakan xilosa 20 g/L, sehingga nutrisi yang diberikan pada substrat hidrolisat dan substrat xilosa murni berbeda. Pada substrat hidrolisat, khamir hanya mendapatkan sumber karbon sebanyak 4,7 g/L untuk menunjang hidupnya, sehingga kemampuan khamir untuk mengkonversi xilosa menjadi

xilitol juga berkurang. Biasanya untuk menunjang sumber karbon agar khamir dapat tetap hidup, dilakukan penambahan glukosa sebagai sumber karbon. Namun ternyata penambahan glukosa ini memperkecil persen konversi xilitol³¹. Hal ini dikarenakan adanya glukosa menyebabkan khamir memilih untuk memetabolisme glukosa terlebih dahulu, sehingga xilosa yang ada tidak dimetabolisme. Kemudian, setelah kadar glukosa menipis, khamir ini menggunakan xilosa dari hidrolisat untuk dimetabolisme menjadi xilitol. Jadi penambahan glukosa memang akan menunjang kehidupan khamir, namun mengurangi kemampuan khamir untuk memetabolisme xilosa.

4.7.2 Hasil fermentasi dari variasi oksigen terlarut

Proses fermentasi dilakukan dalam keadaan ditutup plastik dan ditutup sumbat kapas. Diharapkan kadar oksigen yang ada pada kondisi ditutup plastik lebih rendah dibandingkan dengan ditutup dengan sumbat kapas. Sumbat kapas masih memungkinkan udara untuk bisa masuk ke dalam labu erlenmeyer, sedangkan bila menggunakan plastik diharapkan udara tidak dapat masuk ke dalam labu erlenmeyer. Diharapkan dengan menutup erlenmeyer dengan plastik, maka oksigen mula-mula yang terdapat dalam erlenmeyer akan semakin berkurang seiring dengan berjalannya waktu fermentasi. Hasil pengolahan data untuk fermentasi dari variasi oksigen terlarut ini dapat dilihat pada Tabel 4.5

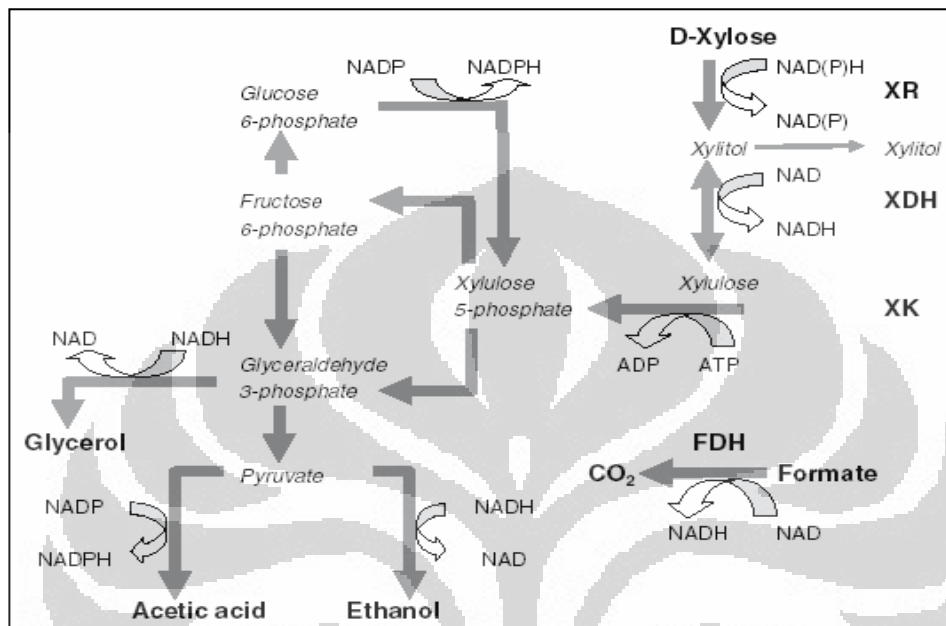
Tabel 4.5 Hasil fermentasi variasi oksigen terlarut

Candida fukuyamaensis	Xilosa awal (g/L)	Xilosa sisa (g/L)	Xilitol yang terbentuk (g/L)	Xilosa yang dikonsumsi (g/L)	% konversi (w/w)	% yield (w/w)
Sumbat kapas	4,307	0,137	0,235	4,170	5,65	0,706
Ditutup plastik	4,740	0,069	0,341	4,671	7,312	1,025

Dari Tabel 4.5 tersebut, terlihat bahwa konsentrasi oksigen terlarut dapat mempengaruhi hasil fermentasi. Ketika konsentrasi oksigen terlarut berkurang maka hasil fermentasi ke arah pembentukan xilitol menjadi lebih besar. Hal ini dapat terlihat dari hasil yang diperoleh, dimana pada saat labu erlenmeyer ditutup dengan menggunakan plastik didapatkan kadar xilitol yang lebih besar. *Candida fukuyamaensis* dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol lebih baik bila erlenmeyer ditutup rapat dengan menggunakan plastik. Pada kondisi oksigen terlarut yang lebih rendah, terjadi kenaikan kadar NADPH dan NADH di dalam sel yang menyebabkan terjadinya reaksi reduksi D-xilosa secara intensif dan terakumulasinya xilitol di dalam medium. Ketika aktivitas NADP-linked XDH menjadi rendah (hampir tidak ada aktivitas), proses dehidrogenasi xilitol menjadi D-xilulosa melalui NADP⁺ tidak terjadi. Pada saat yang bersamaan, aktivitas NADH-linked XR juga sangat rendah, sehingga produksi NAD⁺ oleh enzim ini tidak terjadi. Oleh karena itu, XDH tidak akan mengkatalisis reaksi dehidrogenasi xilitol menjadi D-xilulosa melalui NAD⁺. Hal inilah yang menjadi alasan, mengapa *C. fukuyamaensis*

mengakumulasi lebih banyak xilitol pada kondisi oksigen yang terbatas.

Berikut adalah jalur metabolisme pada khamir³¹ :



Gambar 4.9 Jalur metabolisme xilosa pada khamir secara umum³¹

4.7.3 Hasil fermentasi dari variasi bentuk substrat

Fermentasi juga dilakukan dengan menggunakan substrat hidrolisat ampas tebu yang berbeda, yaitu dengan cara membiarkan sisa hidrolisat ampas tebu diikutserakan dalam proses fermentasi sedangkan untuk substrat yang lainnya sisa hasil hidrolisisnya dibuang. Hal ini dilakukan untuk melihat pengaruh dari sisa hidrolisat terhadap proses fermentasi.

Gambar substrat ampas tebu yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.10 Substrat ampas tebu yang digunakan
 A : sisa hidrolisat tidak dibuang
 B : sisa hidrolisat dibuang (disaring)

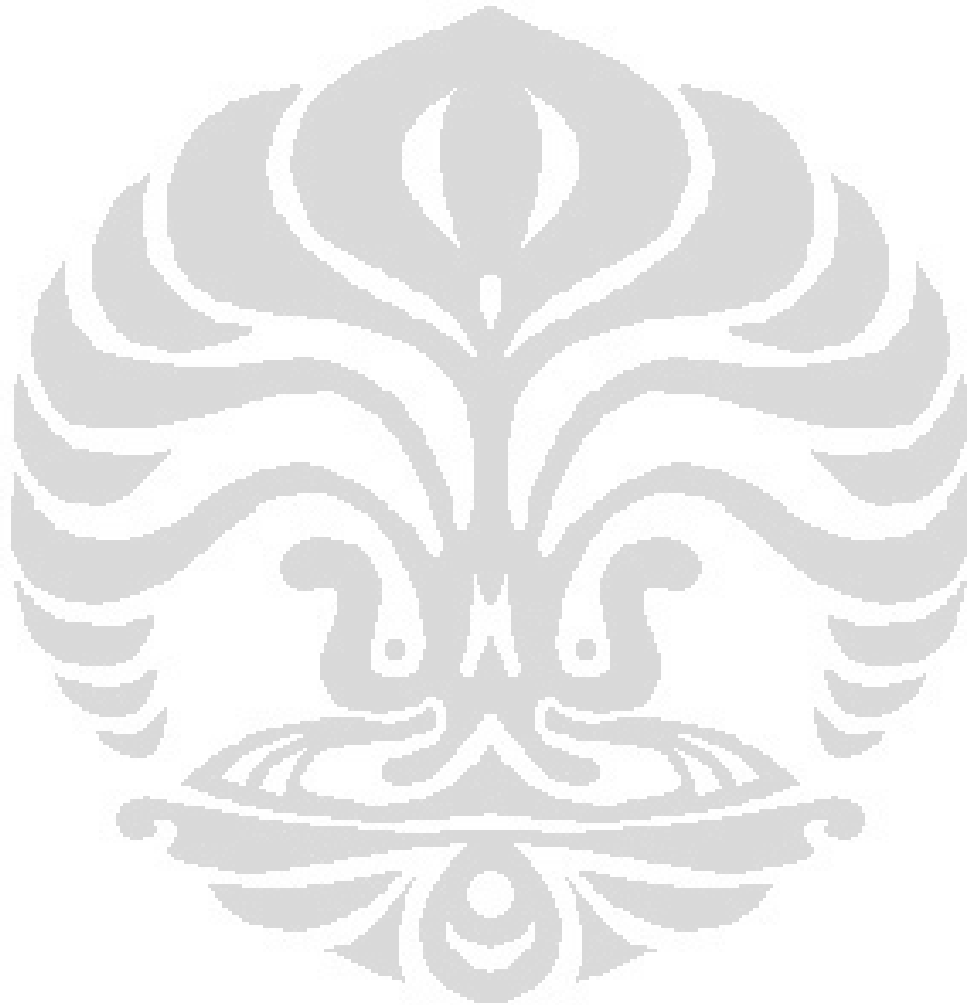
Hasil fermentasi untuk kedua substrat hidrolisat yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil fermentasi variasi bentuk substrat hidrolisat

<i>C. fukuyamaensis</i>	Xilosa awal (g/L)	Xilosa sisa (g/L)	Xilitol yang terbentuk (g/L)	Xilosa yang dikonsumsi (g/L)	% konversi (w/w)
Disaring	4,307	0,137	0,235	4,170	5,65
Tidak disaring	4,236	0,044	0,225	4,191	5,37

Pada umumnya bentuk substrat tidak terlalu mempengaruhi hasil fermentasi. Walaupun hasil persen konversi yang didapatkan untuk substrat yang disaring lebih besar dibandingkan dengan yang tidak disaring, tetapi nilainya tidak jauh berbeda. Sisa hidrolisat yang belum terhidrolisis masih mengandung lignin, sisa hemiselulosa yang belum terhidrolisis dan selulosa dalam jumlah yang banyak. Sebenarnya diharapkan bahwa sisa hidrolisat ini dapat dimanfaatkan oleh khamir untuk dijadikan sumber nutrisi tambahan

untuk menunjang hidupnya, namun ternyata keberadaan sisa hidrolisat ini hanya menjadi inhibitor bagi proses fermentasi untuk merubah xilosa menjadi xilitol. Jadi keberadaan sisa hidrolisat dapat menjadi inhibitor bagi khamir untuk memfermentasikan xilosa menjadi xilitol, walaupun pengaruhnya kecil.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hidrolisis kimiawi 1 g ampas tebu pada konsentrasi H_2SO_4 0,3M, waktu hidrolisis 25 menit dan suhu 121°C menghasilkan xilosa sebesar 15,41 % (w/w) dengan persen hidrolisis 55,09% (w/w).
2. *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii* dapat mengkonversi xilosa yang terdapat dalam hidrolisat ampas tebu menjadi xilitol.
3. Fermentasi menggunakan *Candida fukuyamaensis* menghasilkan kadar xilitol tertinggi sebesar 0,341 g/L dengan persen konversi 7,312% (w/w) dan persen yield 1,024% (w/w), sedangkan *Candida boidinii* menghasilkan kadar xilitol tertinggi sebesar 0,208 g/L dengan persen konversi 5,02% (w/w) dan persen yield 0,62% (w/w).
4. Kondisi fermentasi yang dilakukan mempengaruhi hasil fermentasi, dimana pada saat kondisi oksigen terlarut berkurang, maka xilitol yang dihasilkan menjadi lebih banyak.

5.2 Saran

Perlu dilakukan optimasi terhadap kondisi fermentasi (pH awal fermentasi, lamanya proses fermentasi, penambahan ko-substrat lainnya seperti arabinosa, glukosa atau monosakarida lainnya), sehingga dapat dihasilkan xilitol dengan jumlah yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siaran pers No : S.563/II/PIK-I/2005

<http://www.dephut.go.id/informasi/humas/2005/563-05.html>. 26

[Januari 2008](#) pukul 10:20.

2. Situs web kimia Indonesia

<http://www.chem-is-try.org/fokus.html>. 26 Januari 2008 pukul 10:36.

3. "Can chewing gum made with the naturally-occurring substance "xylitol" aid in preventing ear infections?"

http://xylitol.org/dr_green.asp 26 Januari 2008 pukul 10:45.

4. Kontiokari, T. Uhari, M , Kosleka, M.1995. *Effect of Xylitol on growth of Nasopharyngeal Bacterian Vitro*. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 39 (*) : 1820-1823.

5. "Gigi bermasalah, jantung terancam."

<http://www.republika.co.id>. 19 Januari 2008 pukul 14:08.

6. Makinen, K. K.. "History, Safety, and Dental Properties of Xylitol."

<http://www.xylitol.org/drmakinen.html>. 27 Januari 2008, pukul

16:56.

7. Sifat fisik dan kimia xilitol

<http://en.wikipedia.org/xylitol> 27 Januari 2008, pukul 15:36.

8. "Reduced-calorie sweeteners Xylitol." 3 halaman.

<http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html>. 26 Januari 2008 pukul 11:08.

9. Koswara, Sutrisno, MSi, "Makanan Bergula dan Kerusakan Gigi"

<http://www.ebookpangan.com> 27 Januari 2008, pukul 15:48.

10. Kiet, L. A. , Peter, M. , Marilyn, R. 2006. *Xylitol, sweeteners, and Dental Caries*. *Pedriatic Dentistry*. 28:154-163.

11. Saha, C. B. 2003. *Hemicellulose Bioconversion*. *J Ind, Microbial Biotechnol*, 30:279-291.

12. Converti, Attilo. 2000. *Influence of Temperature and pH on Xylitol Production from Xylose by Debaryomyces hansenii*. University of Genoa, Italy.

13. "Safety data for D- (+)-xylose. "

[http://www.physchem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-\(+\)-xylose.html](http://www.physchem.ox.ac.uk/MSDS/XY/d-(+)-xylose.html) 27 Januari 2008, pukul 15:41.

14. Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu, dasar-dasar dan penggunaan*,
terjemahan dari Wood Chemistry, fundamentals and applications,
oleh Sastrohamidjoyo, H. Gajah Mada University press,
Yogyakarta : viii + 390 halaman.
15. Denmark's Technical University.2007. *Ethanol Potential for Empty
Fruit Bunches Pre-treated by Wet-Explosion. Bio Centrum-DTU.*
Halaman 5.
16. Palonen, H. 2004. *Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of
Lignocellulose. VTT Biotechnology. Espoo.*
17. Nelson, D. L. , Michael, M. C. 2005. *Principles of Biochemistry.*
*Lehninger. Halaman 247-252. 5th Edition. WH Freeman and
Company, New York.*
18. Der Reyden, D. Van. 1992. *Recent Scientific Research in Paper
Consevation. J.Am. Inst. Conservation.31 (1) :117-138.*
19. Nur Bayti, S. 2002. *Produksi dan Karakterisasi Selulase Penicillium
nalgiovense Laxa dari Sarang Rayap. Karya Utama Magister Kimia.*
FMIPA Universitas Indonesia, Depok.

20. "Tanaman Obat Indonesia"

http://www.iptek.net.id/ind/cakra-obat/tanaman_obat.html 26 Januari 2008, pukul 14:04.

21. "Tanaman Penghasil Gula." (26 Januari 2008, pukul 14:23)

<http://www.warintek.progressio.or.id/ttg/pangan/gula.html>.

22. Slamet, P. G. 2006. "Tebu(*Saccharum officinarum*)."

<http://www.warintek.progressio.or.id>. 26 Januari 2008, pukul 14:29.

23. Husin, A.A. 2006. "pemanfaatan Limbah untuk bahan bangunan". hal.8.

24. Aditya, A .2004. *Studi Pendahuluan Penentuan Kondisi Optimum*

*Hidrolisis Sekam Padi dengan Menggunakan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viridae* untuk Menghasilkan D-xilosa sebagai Bahan dasar Xilitol.* FMIPA Universitas Indonesia, Depok.

25. Pessoa, JR. A , Mancilha, I . M ., Sato, S. 1997. *Acid Hydrolysis of*

Hemicellulose from Sugarcane Bagasse. Braz. J. Chem. Eng.14(3).

26. Solange I. Musatto dkk. 2004. *Optimal experimental Condition for*

Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. Department of Biotechnology. Brazil.

27. Meinander, Q, Nina et.al. 1996. *Fed-batch Xylitol Production with Two recombinan Saccharomyces cerevisiae Strains Expressing XYL1 at Different Levels, Using Glucose as a Cosubstrate : A Comparison of Production Parameters and Strain Stability*. Lund Institute of Technology / University of Lund. Sweden.

28. Buhner, J. , Anglebevor, F.A. “*Dilute Acid Hydrolysis and fermentation of Corn Fiber to Xylitol.*” 2 halaman.
<http://www.p2pays.org/ref/35/34369.pdf>. 19 Januari 2008, pukul 14:35.

29. Xiang,Q. , Yong, Y. L., Robert, W. T. 2004. *Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*. *App. Biochem. Biotech.* 113-116.

30. <http://en.wikipedia.org/wiki/Candida> .28 Januari 2008 pukul 14:24

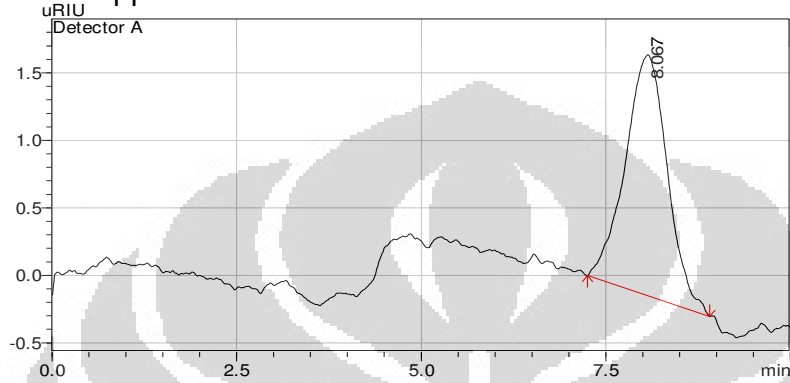
31. Birger, Tom & Ken Izumori & Matti Leisola. 2007. *A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol*. Springer-Verlag.

32. Nurmalia, 2005. *Studi Optimasi Hidrolisis Kimiawi Ampas Tebu Untuk Menghasilkan D-Xilosa sebagai Bahan Pembuatan Xilitol*. Karya utama sarjana kimia. FMIPA Universitas Indonesia. Depok.

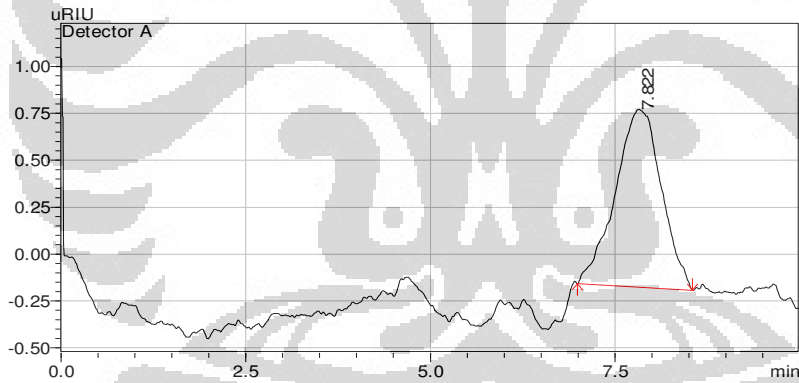
LAMPIRAN 1

Kromatogram standar xilosa

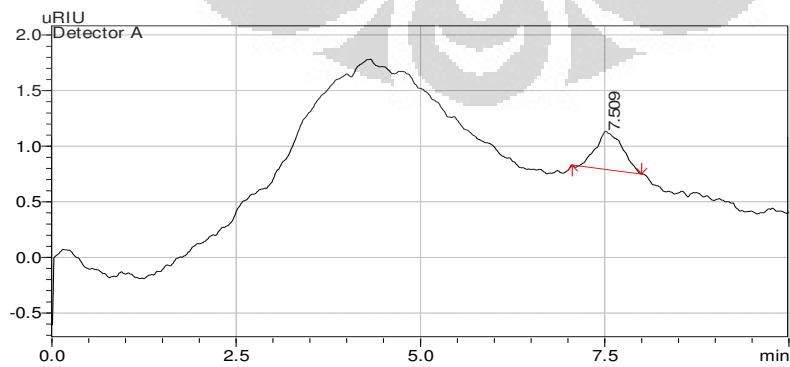
xilosa 500ppm



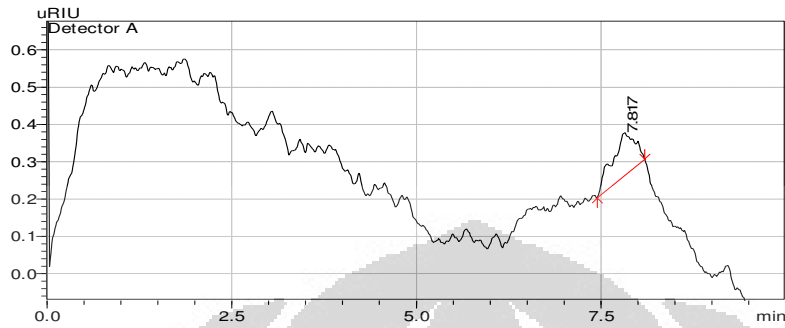
xilosa 250 ppm



xilosa 100 ppm

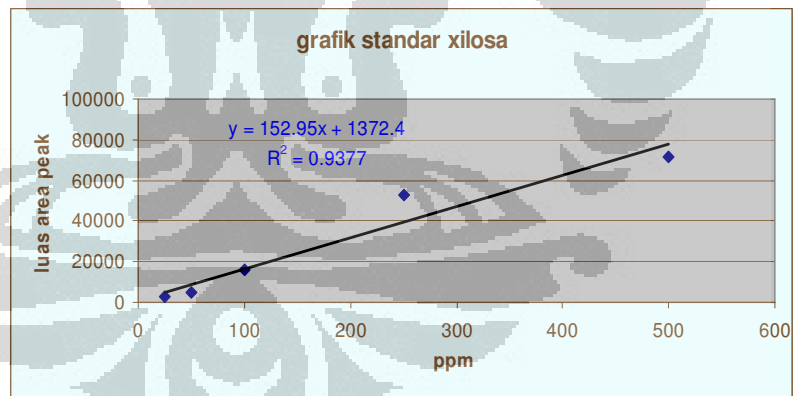


xilosa 50 ppm



xilosa (ppm)	luas area peak
25	2541
50	4945
100	16025
250	53018
500	71813

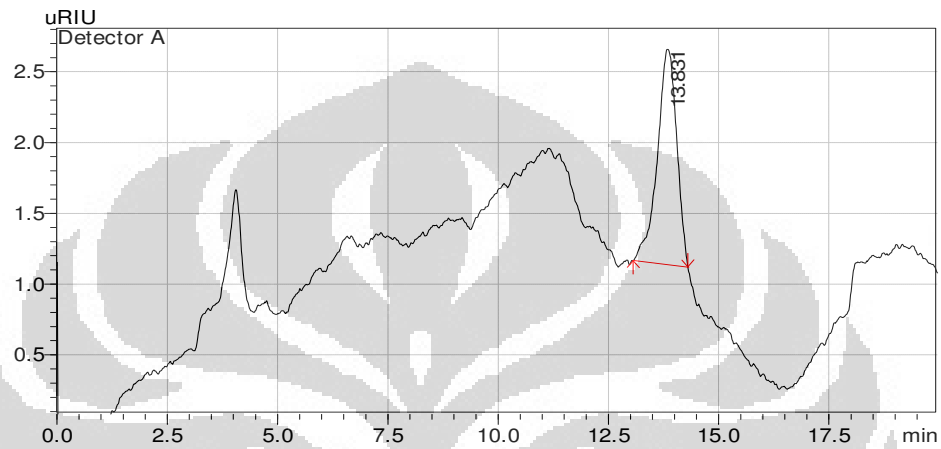
Kurva standar xilosa



LAMPIRAN 2

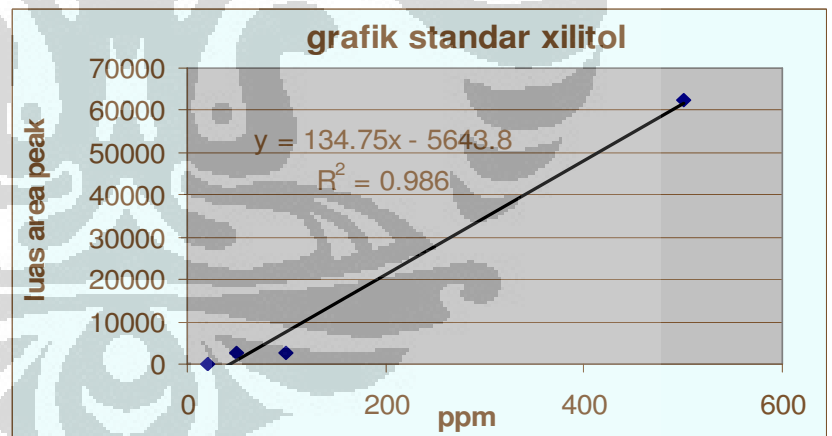
Kromatogram standar xilitol

Xilitol 500 ppm



Kurva standar xilitol

xilitol (ppm)	luas area
500	62511
100	2626
50	2495
20	75

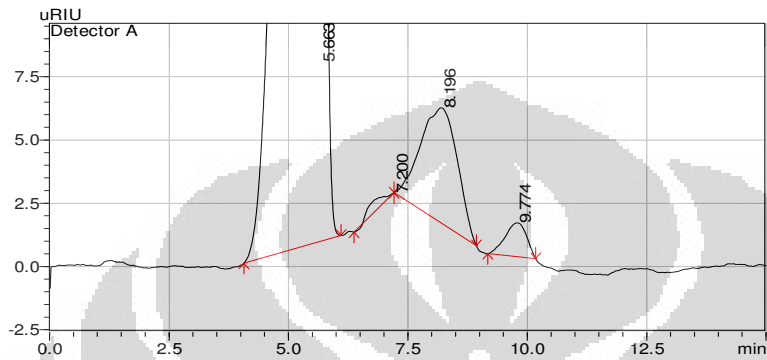


LAMPIRAN 3

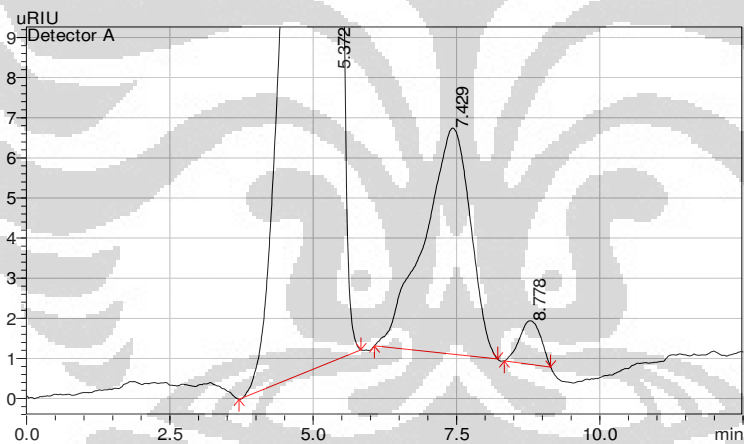
Kromatogram hasil hidrolisis

variasi waktu proses hidrolisis

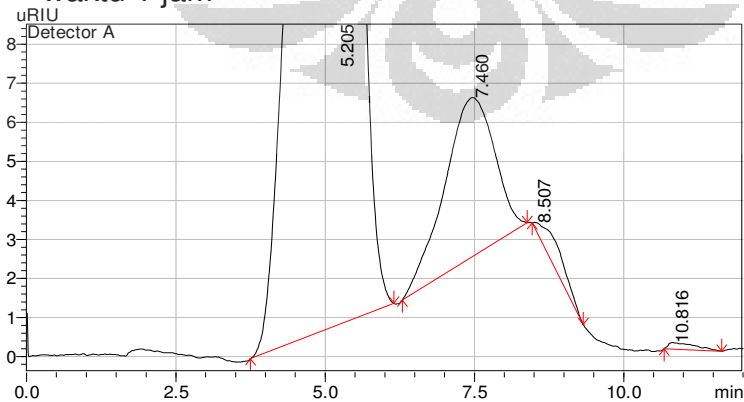
waktu 20 menit



waktu 25 menit

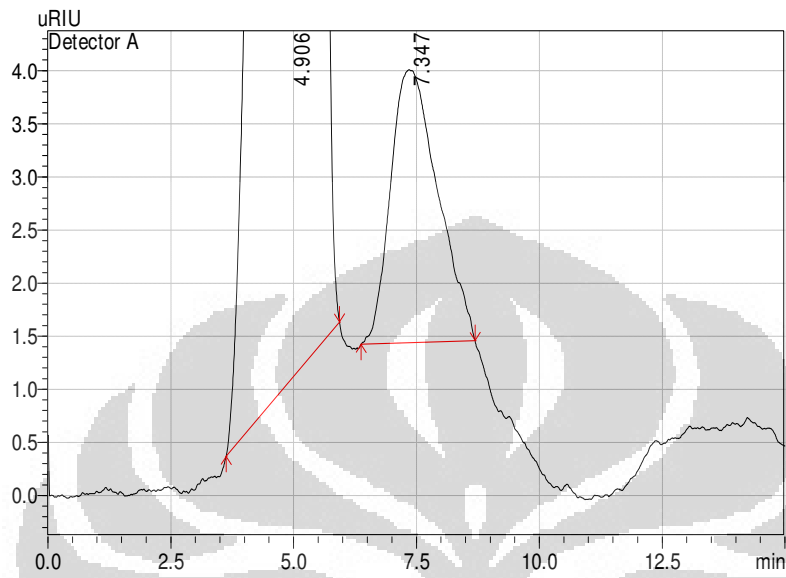


waktu 1 jam

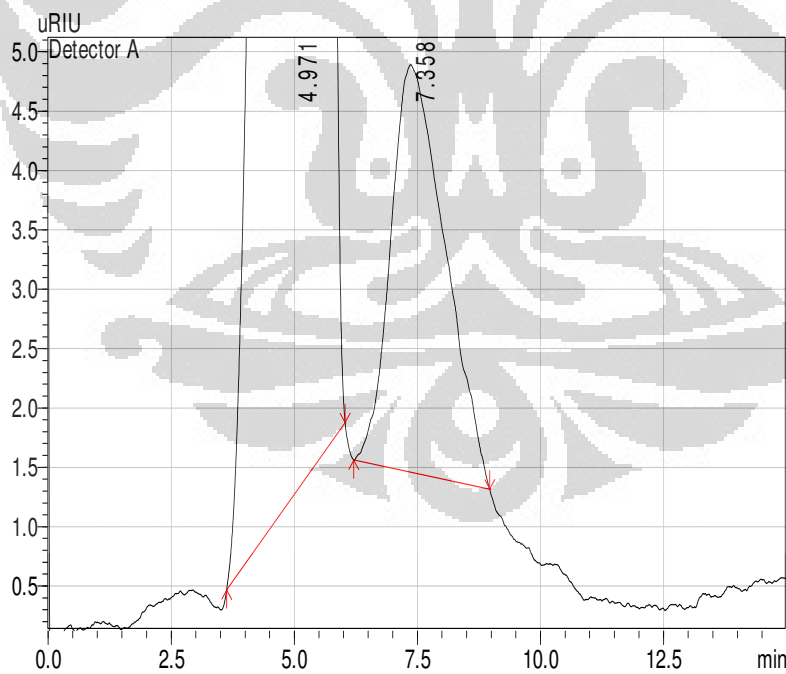


variasi konsentrasi

H₂SO₄ 0,2 M

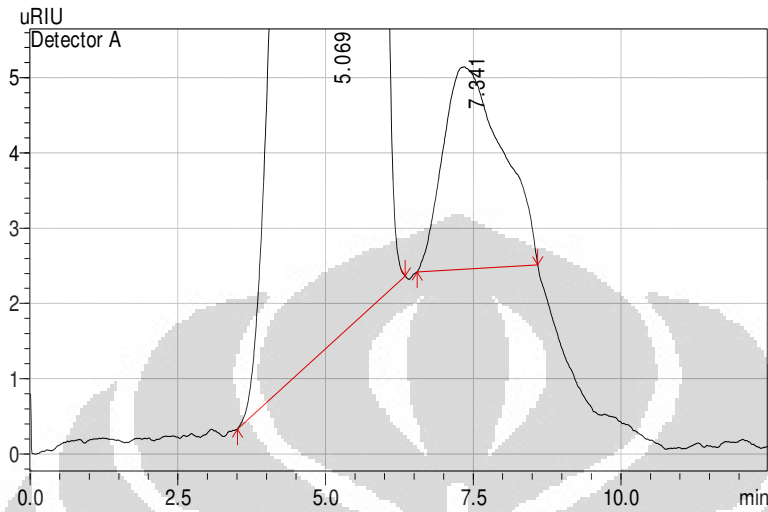


H₂SO₄ 0,3 M

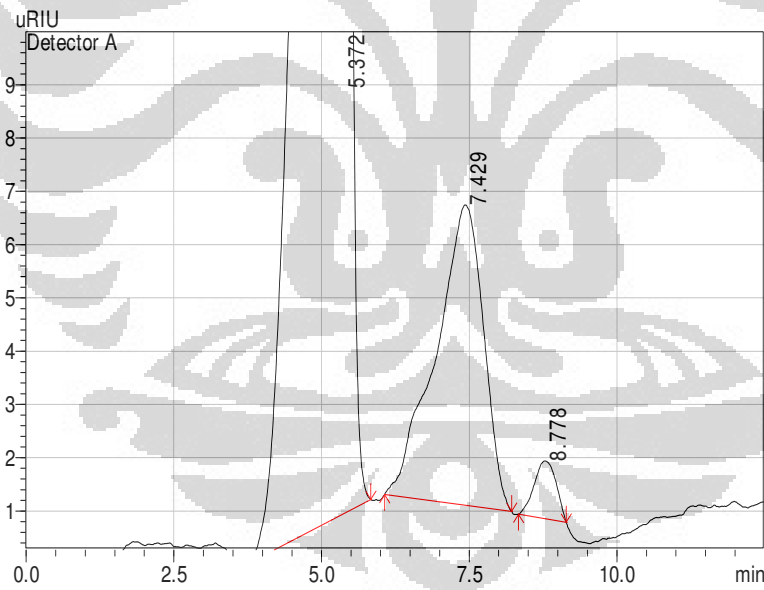


variasi substrat ampas tebu (kasar dan halus)

ampas tebu kasar



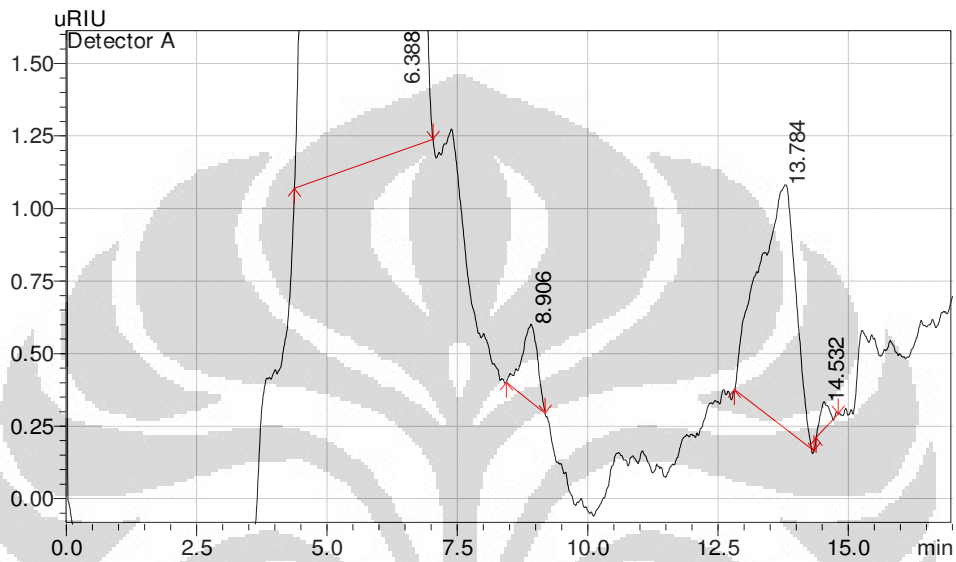
Ampas tebu halus



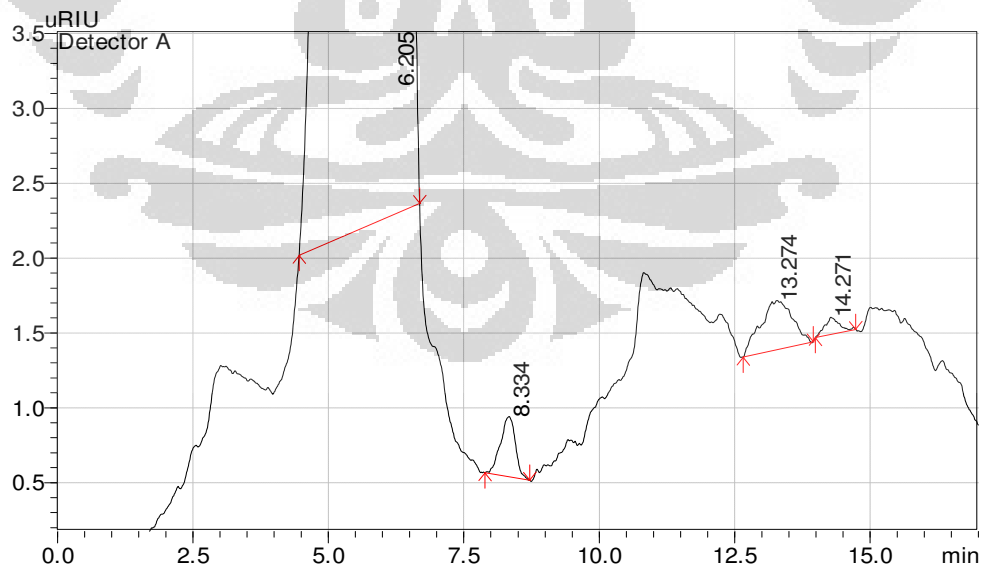
LAMPIRAN 4

Kromatogram hasil fermentasi variasi spesies

1. *C. fukuyamaensis*



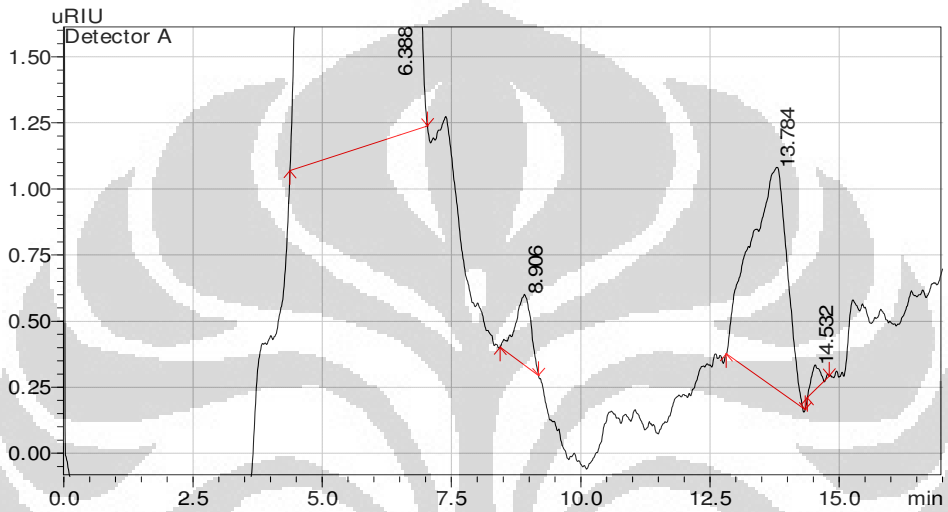
2. *C. boidinii*



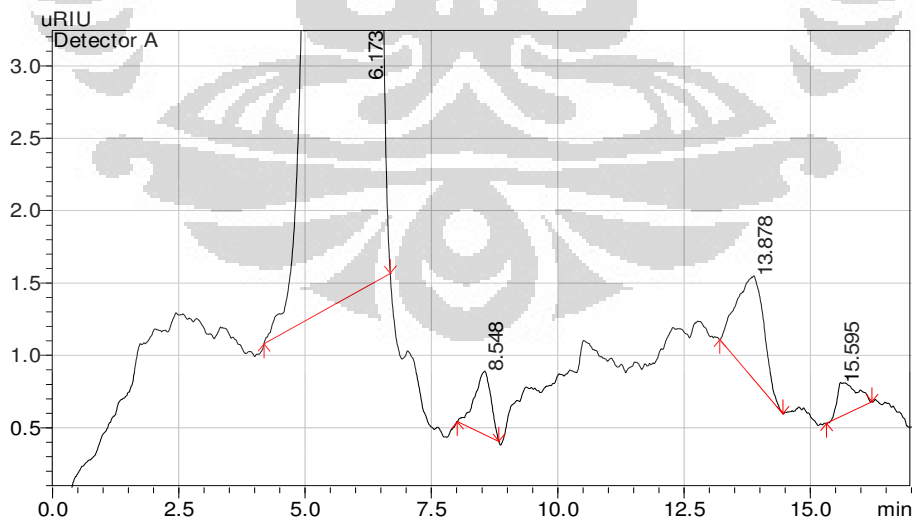
LAMPIRAN 5

Kromatogram hasil fermentasi variasi oksigen terlarut (ditutup dengan plastik dan ditutup dengan sumbat kapas)

1. ditutup plastik



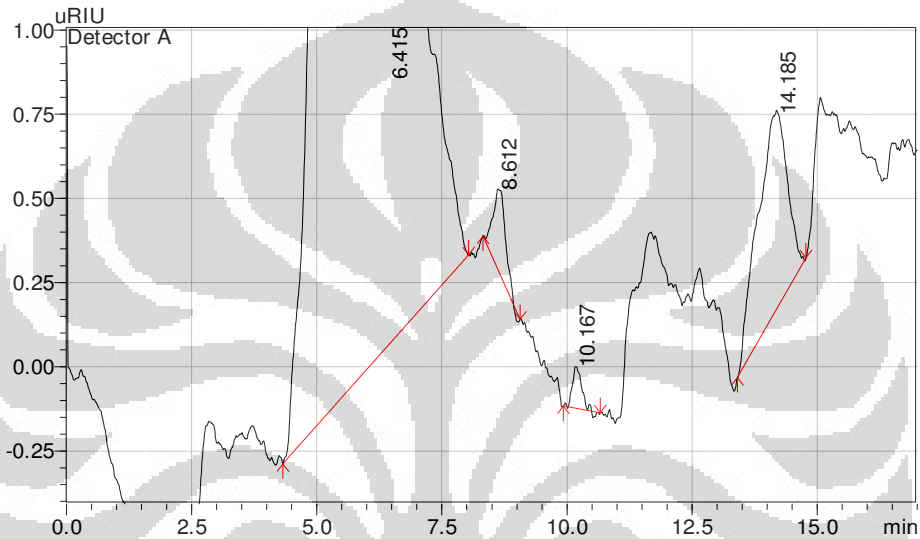
2. ditutup sumbat kapas



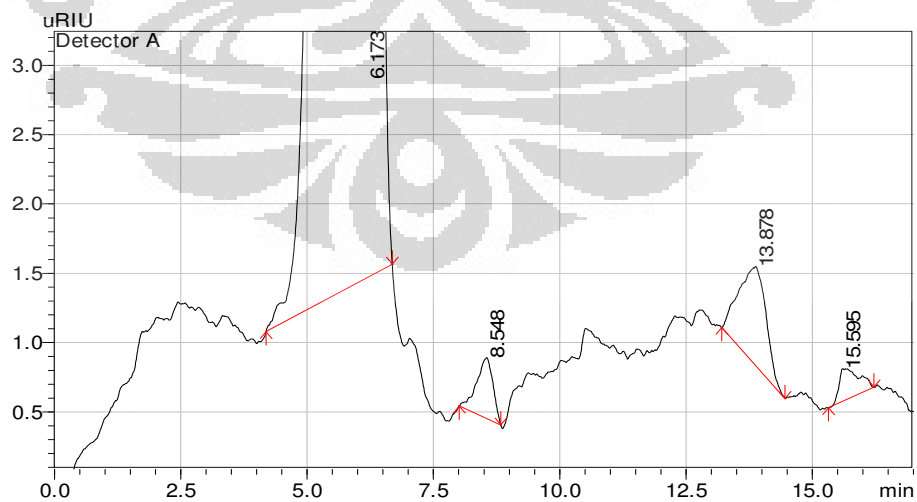
LAMPIRAN 6

Kromatogram hasil fermentasi variasi substrat hidrolisat yang digunakan (sisa hidrolisat dibuang dan sisa hidrolisat diikutsertakan dalam fermentasi)

1. sisa hidrolisat diikutsertakan dalam fermentasi (tidak disaring)



2. sisa hidrolisat tidak diikutsertakan dalam fermentasi (disaring)



LAMPIRAN 7

Tabel area semua hasil fermentasi

parameter	area xilosa	area xilitol
A boi 1	10661	22451
A boi 2	6065	5985
A fuk 1	5580	40386
A fuk 2	9767	26104
B boi 2	6065	5985
B boi 1	7804	8456
B fuk 1	4110	24695
B fuk 2	tidak terdeteksi adanya xilosa dan xilitol	
X boi 1	524678	99321
X boi 2	413699	98738
A TY 2	291370	Tidak terdeteksi
B TY 1	260557	Tidak terdeteksi
B TY 2	131026	Tidak terdeteksi
A TY 1	264892	Tidak terdeteksi

Keterangan parameter :

1. huruf pertama menandakan substrat yang digunakan

(A : sisa hidrolisat dibuang, B : substrat yang sisa hidrolisatnya ikut serta dalam fermentasi, X : xilosa murni bukan dari hidrolisat)

2. Kata kedua menandakan spesies yeast yang digunakan

(fuk : *Candida fukuyamaensis* , boi : *Candida boidinii*, TY : tanpa adanya yeast)

3. Huruf ketiga menyatakan keberadaan oksigen

(1: keadaan ditutup kapas 2 : keadaan ditutup plastik)

Contoh : A Fuk 1 : fermentasi menggunakan substrat hidrolisat yang dibuang sisanya hidrolisatnya, menggunakan khamir *C. fukuyamaensis* dan ditutup dengan kapas (kurang rapat)

Tabel perhitungan semua hasil fermentasi

parameter	xilosa awal (g/L)	xilosa sisa (g/L)	xilosa yang dikonsumsi (g/L)	xilitol yang terbentuk (g/L)	%konversi (xil/xol) (g/g)
A Boi 1	4,307	0,151	4,155	0,208	5,017
A Boi 2	4,740	0,076	4,663	0,086	1,850
A Fuk 1	4,307	0,137	4,170	0,235	5,649
A Fuk 2	4,740	0,068	4,671	0,341	7,312
B Boi 1	4,236	0,105	4,131	0,105	2,533
B Boi 2	2,119	0,077	2,042	0,086	4,225
B Fuk 1	4,236	0,045	4,191	0,225	5,371
B Fuk 2	2,119	tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	tidak terdeteksi	0
X boi 1	20,000	8,553	11,446	0,779	6,805
X boi 2	20,000	6,739	13,260	0,775	5,841
B TY 1	4,236	4,236	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
B TY 2	2,119	2,119	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
A TY 1	4,307	4,307	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
A TY 2	4,740	4,740	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
X Fuk 1	20	1,712	18,288	5,529	30,237

Persamaan regresi linier dari grafik std xilosa $Y=152,95X + 1372,4$:

y = luas area dan x = konsentrasi xilosa(ppm)

Misal pada sampel 0,3 M => Luas area (y) = 315616

maka konsentrasi xilosa (x) = $(315616 - 1372,4)/152,95 = 2054,55\text{ppm}$

Karena terjadi pengenceran 2,5 x,

maka dalam larutan terdapat: $2054,55\text{ppm} \times 2,5 = 5136,378 = 0.005136 \text{ g/mL}$

Karena volume larutan 30 mL,

maka dalam 30 mL larutan terdapat $0.005136 \text{ g/mL} \times 30 \text{ mL} = 0,1541 \text{ g}$

Sehingga kadar xilosa dalam 1 g Ampas tebu = $(0,1541 \text{ g} / 1 \text{ g}) \times 100 \% =$

15,41% (w/w)

Dengan persen hidrolisis xilan menjadi xilosa = $(15,41\% / 27,97\%) \times 100\% =$

55,09% (w/w)

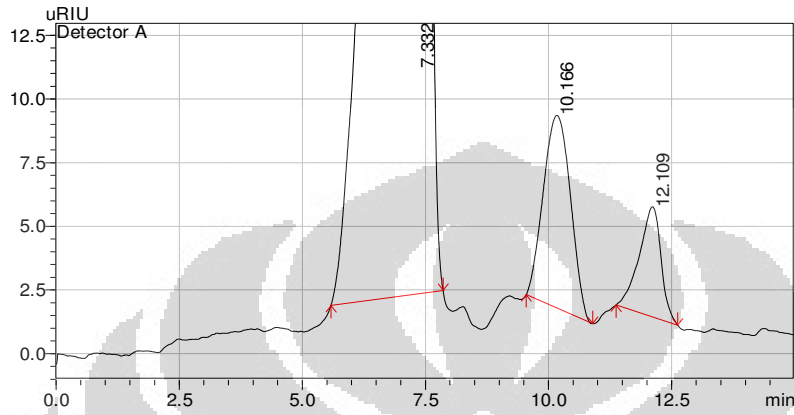
Dimana 27,97% adalah kadar hemiselulosa dalam ampas tebu

Angka % konversi adalah jumlah gram xilitol yang terbentuk dibagi jumlah gram xilosa yang dikonsumsi. Sedangkan % yield adalah jumlah gram xilitol yang dihasilkan dari hasil pengolahan 1 gram ampas tebu.

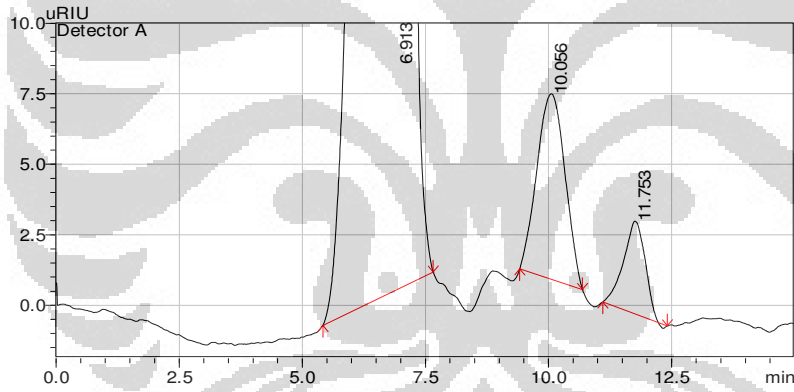
LAMPIRAN 8

Kromatogram semua hasil fermentasi

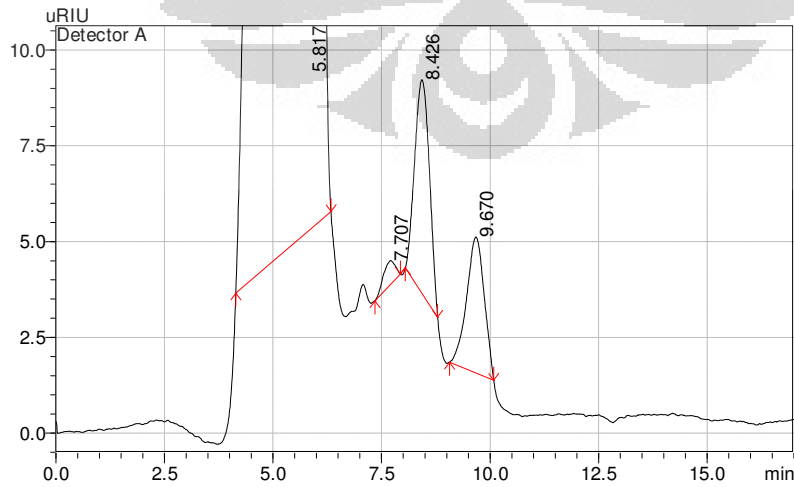
A TY 2



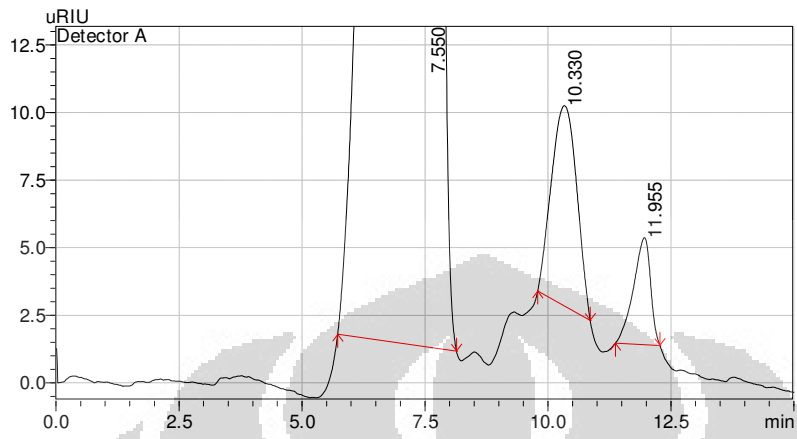
B TY 1



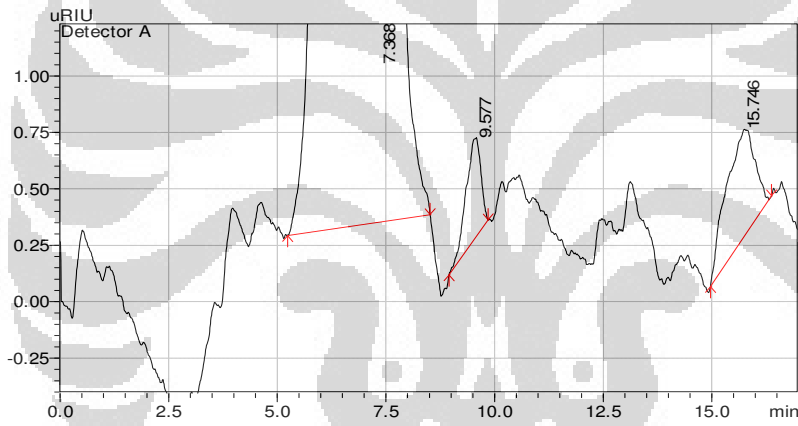
B TY 2



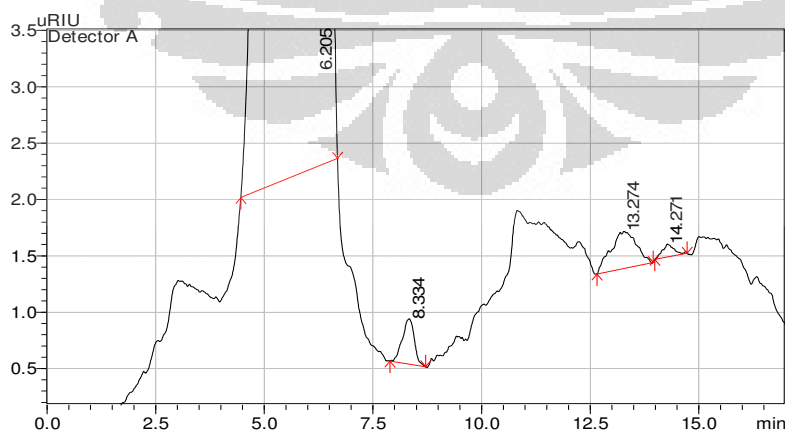
A TY 1



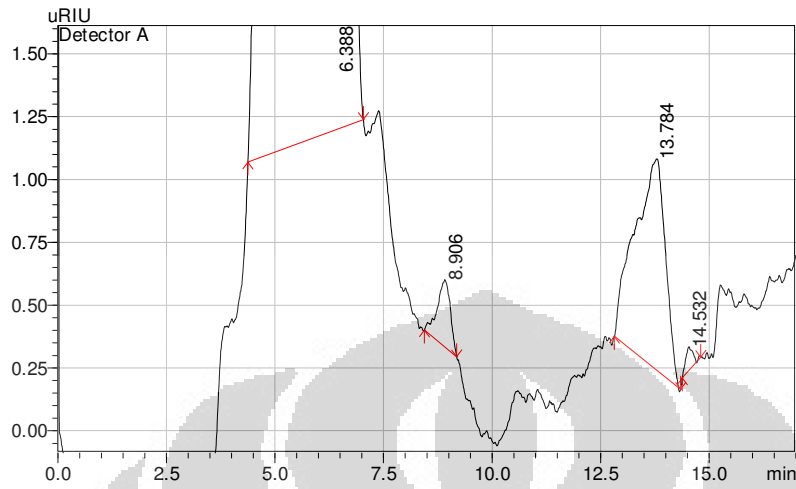
A boi 1



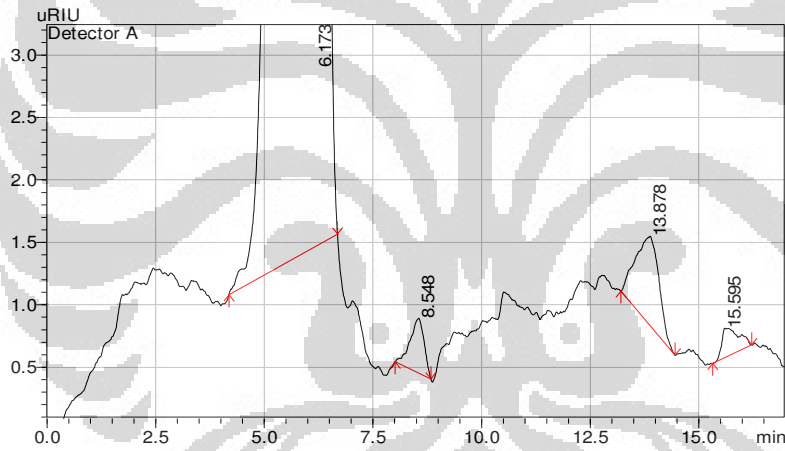
A boi 2



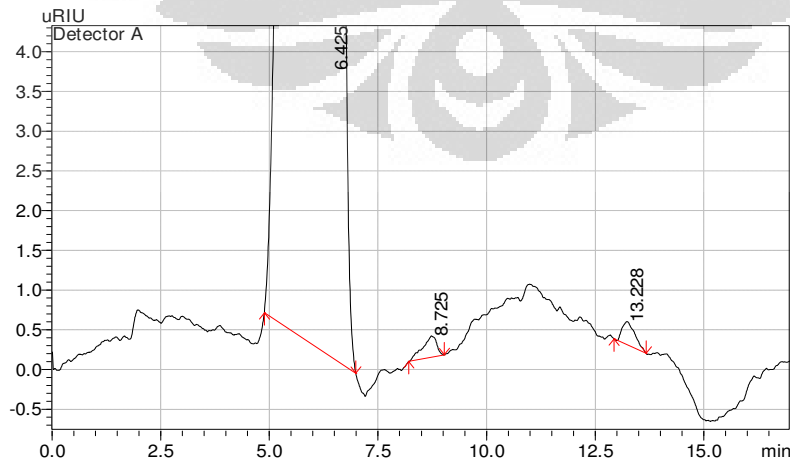
A fuk 2



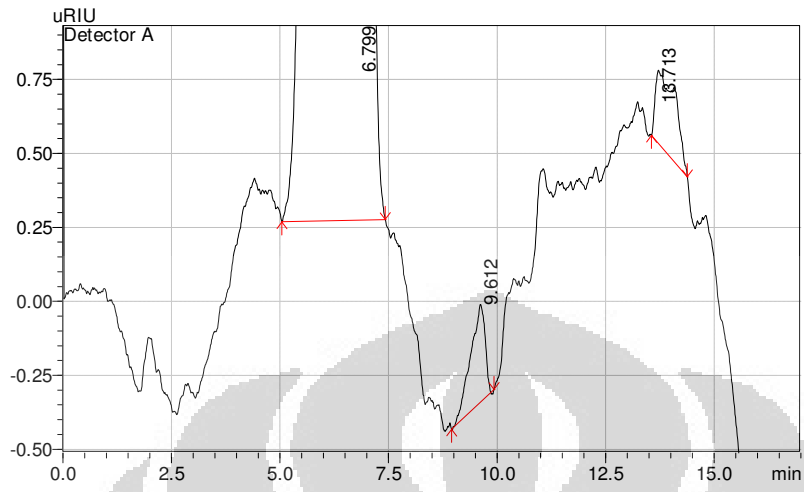
A fuk 1



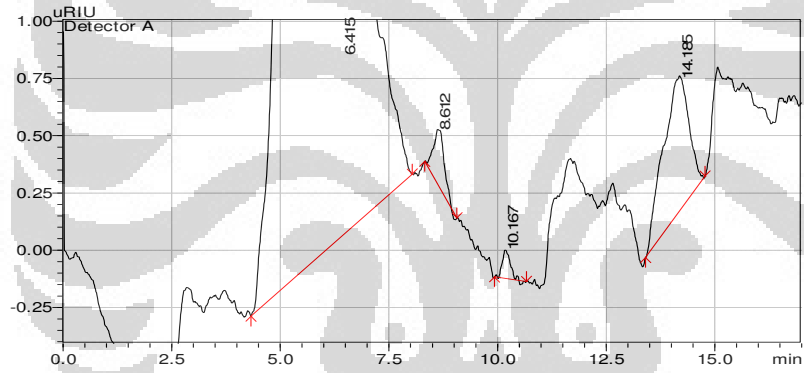
B boi 2



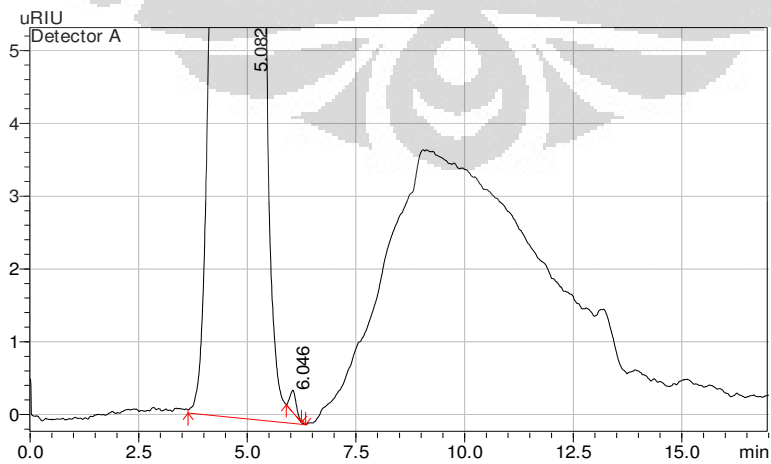
B boi 1



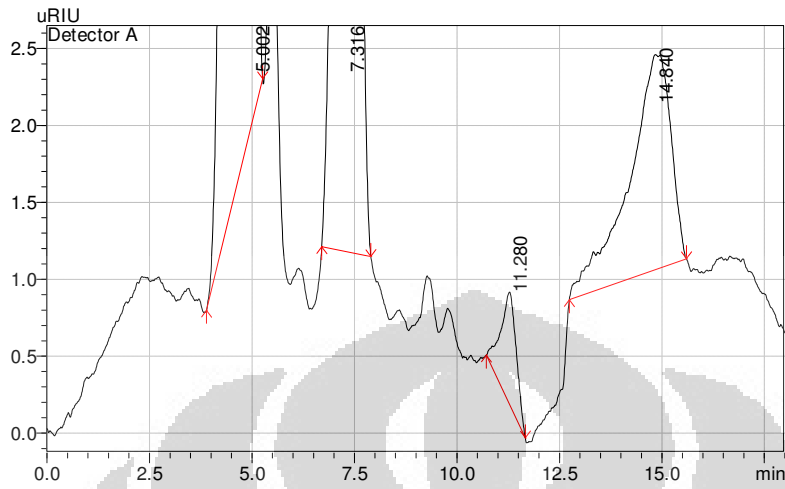
B fuk 1



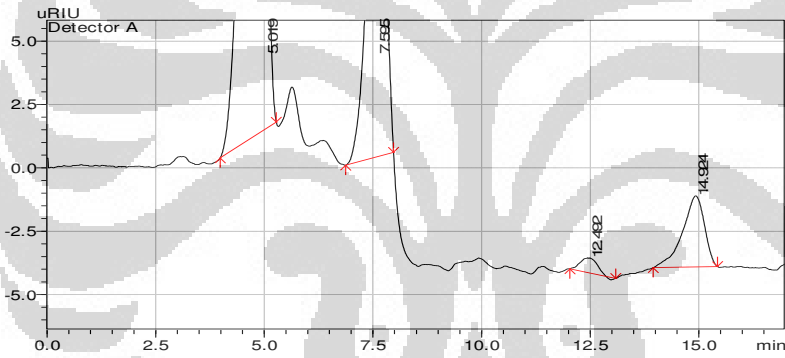
B fuk 2



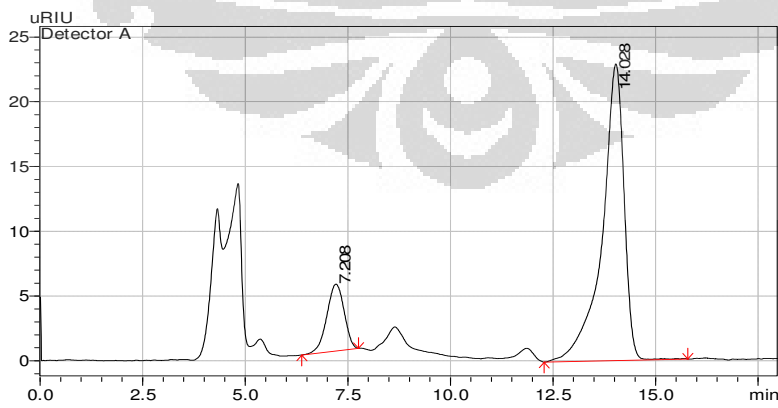
X boi 1



X boi 2



X Fuk 2



X Fuk 1

