

**ISOLASI, DEGRADASI HEMISELULOSA DARI BATANG
KELAPA SAWIT SECARA KIMIA DAN ENZIMATIS**

MDK 22/06

Kur
i

SKRIPSI

ANITA KURNIATI



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



**ISOLASI, DEGRADASI HEMISELULOSA DARI BATANG
KELAPA SAWIT SECARA KIMIA DAN ENZIMATIS**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana sains Bidang
Kimia Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga**

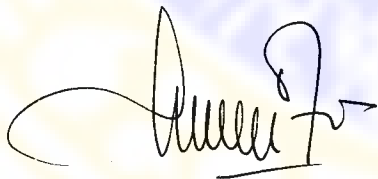
Oleh :

ANITA KURNIATI
NIM. 080112408

Tanggal Lulus : 26 Januari 2006

Disetujui Oleh :

Pembimbing I



Drs. Hery Suwito
NIP. 131 653 453

Pembimbing II



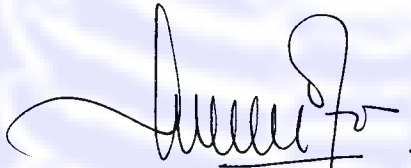
Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 131 653 446

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : **Isolasi, Degradasi Hemiselulosa Dari Batang Kelapa Sawit Secara Kimia Dan Enzimatis**
Penyusun : **Anita Kurniati**
NIM : **080112408**
Tanggal Ujian : **26 Januari 2006**


Disetujui Oleh :

Pembimbing I



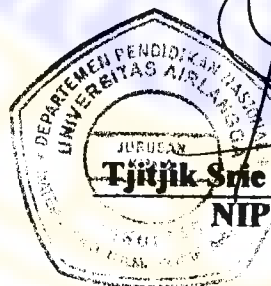
Drs. Hery Suwito
NIP. 131 653 453

Pembimbing II



Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 131 653 446

Mengetahui :
Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Airlangga




Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D.
NIP. 131 801 627

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga





*Kupersembahkan karya
ini kepada*

*Mama, bapak,
kakak*Andi* dan
Adik*Arie* yang tercinta*

*Semua guru dan dosenku
yang telah memberikan
bekal ilmu padaku*

I love you all

Terima kasih mama

Atas kasih sayang yang telah kau berikan padaku

Terima kasih mama

Atas doa yang kau panjatkan untukku

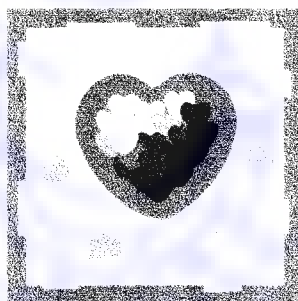
Terima kasih mama

Atas dukungan yang selalu menyertai langkahku

And special thanks

To my father for your attention

I love you.....



Cintailah Allah

Yang menganugerahkan nikmat-Nya atasmu

Cintailah Allah

Yang memberikan ujian tidak melebihi kemampuanmu

Dan cintailah Allah.....

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT karena dengan rahmat dan hidayah-Nya sehingga naskah skripsi dapat terselesaikan dengan lancar.

Naskah skripsi yang berjudul **“Isolasi, Degradasi Hemiselulosa dari Batang Kelapa Sawit Secara Kimia dan Enzimatis”** ini disusun sebagai syarat untuk memenuhi mata kuliah skripsi, sekaligus sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga.

Semoga naskah skripsi ini dapat berguna bagi penelitian selanjutnya. Akhir kata saya mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penyusunan naskah skripsi ini.

Surabaya, Januari 2006

Penyusun

Anita Kurniati

Ucapan Terima Kasih

1. Bapak dan mama yang telah banyak memberikan dukungan moral dan materi dalam penyelesaian penulisan skripsi ini. "Tiada kata yang terucap untuk semua yang telah kau berikan, aku sayang kalian".
2. Bapak Drs. Hery Suwito selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bantuan, saran, dan nasehat dalam penulisan skripsi ini. "Makasih ya pak atas bimbingan, bantuan, dan semuanya. Saya tidak bisa menyebutkan semua pak, kalau saya sebutkan semua ntar halamannya tidak cukup".
3. Ibu Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bantuan, saran, dan nasehat dalam penulisan skripsi ini. "Makasih ya bu atas bimbingan, bantuan, dan semuanya. Saya belajar banyak hal dari ibu. Saya minta maaf karena banyak merepotkan dan membuat ibu khawatir, yang jelas saya tidak bisa mengungkapkan rasa terima kasih saya dengan kata-kata. Saya hanya bisa mengucapkan terima kasih dan saya sayang ibu".
4. Bapak Drs. Bambang Kurniadi Apt. selaku dosen penguji proposal.
5. Dr. Alfinda Novi Kristanti DEA. dan Drs. Tokok Adiarto M.Si. selaku dosen penguji skripsi.
6. Dra. TjiTjik Srie Tj. Ph.D selaku ketua jurusan kimia, FMIPA Universitas Airlangga yang telah menyediakan sarana dan prasarana pada penyusunan skripsi ini.

7. Ir. Inge Lunardi selaku dosen wali serta seluruh dosen jurusan kimia FMIPA Universitas Airlangga yang telah memberikan bekal ilmu kepada penyusun.
8. Adikq, Kakakq, dan sepupuq”n@sH” makasih sudah membantu dalam transportasi serta keluarga besarku di Bima (NTB), Flores dan Kupang (NTT).
9. One”onde-onde”, Ani”kumal”, Nanik”niknak” makasih ya atas bantuan dan dukungannya selama ini. Onde-onde jangan lupa jaga kesehatan dan makan yang banyak dong supaya cepat gede seperti saya, Ani”kumal” sorry ya kalau banyak tanya tentang kuliah dan penyusunan naskah skripsi ”tidak masalahkan? kamukan baik hati dan tidak sombong”, Nanik”niknak” yang selalu ingat sama kita dalam hal fotokopi hand out tapi kadang-kadang kita lupa sama kamu ”sorry banget ya”. Semoga semuanya tidak berakhir sampai disini.
10. Teman seperjuangan dalam penelitian skripsi Choi, erni, kak Evi, Nora, Dimas”samidzu”, Paulus, Nurul, Asti”Jreng”, Azhar”bajuri”, Juwa, Sandra dan semua teman-teman angkatan 2001 yang tidak bisa disebutkan semua. Azir, Wacid, Aan, Estu dan tintus selamat berjuang untuk menyelesaikan skripsi.
11. Pak Damam makasih ya pak atas semua bantuannya selama penelitian, jangan suka ngagetin dan godain anak-anak dong pak.

12. Mbak Ambar, mas fendi, mas Rohadi, pak Gimani, mbak Yuli, pak Kamto pak Erwin dan mbak Andri atas semua bantuannya memperlancar penyusunan skripsi ini.
13. Rizky”ki2”2004 terima kasih ya atas bantuannya selama penelitian dan jangan suka godain orang dong, tetap semangat dan jangan sedih kalau aku tinggal. Ana, Rohma, Wi2k, Nyom dan elly tetap semangat ya serta adik-adik angkatan 2002 dan angkatan 2003 yang tidak bisa disebutkan semua..
14. Pak Tantowi dan mbak Fia di Bogor, terima kasih sudah mau menerima saya dan one di rumah bapak serta sudah mau mengantar kami keliling kota Bogor.
15. Pak Yudi dan pak Lalu dari BPPPT Bogor, Pak Refdinal (ITS) atas bantuannya dalam penyusunan skripsi ini.

Anita Kurniati., 2006, Isolasi Degradasi Hemiselulosa dari Batang Kelapa Sawit secara Kimia dan Enzimatis, Skripsi ini dibawah bimbingan Drs. Hery Suwito dan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih M.Si, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit dan mengetahui produk hidrolisis hemiselulosa secara kimia dan enzimatis. Isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit menggunakan NaOH pada berbagai variasi konsentrasi dan berbagai variasi waktu refluks. Setelah proses refluks, dilakukan penambahan asam asetat untuk mengendapkan hemiselulosa A dan penambahan etanol 95% untuk mengendapkan hemiselulosa B. Hidrolisis hemiselulosa secara kimia menggunakan asam sulfat 72% sedangkan hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis menggunakan enzim xilanolitik dari *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510). Hasil menunjukkan bahwa kondisi optimum isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit pada konsentrasi NaOH 2M dan waktu refluks 6 jam. Sedangkan untuk hasil hidrolisis hemiselulosa secara kimia dan enzimatis mempunyai produk yang sama yaitu fruktosa, glukosa, xilosa, arabinosa dan xilooligosakarida.

Kata kunci : *hemiselulosa, isolasi, batang kelapa sawit, kondisi optimum, hidrolisis kimia dan enzimatis.*

Anita Kurniati., 2006, Isolation Degradation Hemicellulose from Trunk of Oil Palm Tree Chemically and Enzymatically, Script is under guidance of Drs. Hery Suwito and Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih M.Si, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

The purposes of this research were to investigate the optimum condition isolation hemicellulose from trunk of oil palm tree and to investigate product of hemicellulose using chemical and enzymatic methods. Hemicellulose from trunk of oil palm tree was isolated with various NaOH concentrations and reflux time. After reflux process, acetic acid was then added to the mixture to get hemicellulose A, whereas hemicellulose B was precipitated by adding ethanol 95%. Chemical Hydrolysis was performed using H₂SO₄ 72% and enzymatic hydrolysis was carried out using xylanolytic enzyme from recombinant of *E.coli* DH5 α (pTP510). The result showed that optimum isolation of condition hemicellulose was NaOH 2M with 6 hours reflux time. Both hydrolysis process gave the same products, namely fructose, glucose, xilose, arabinose and xilooligosaccaride

Keywords : *hemicellulose, isolation, trunk of oil palm tree, optimum condition, chemical and enzymatic hydrolysis.*

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Kelapa Sawit	6
2.2. Hemiselulosa	7
2.3. Ekstraksi	8
2.4. Enzim	10
2.5. Hidrolisis Hemiselulosa Xilan	14
2.5.1. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis.....	14
2.5.1.1. Enzim endo- β -xilanase.....	15
2.5.1.2. Enzim β -xilosidase.....	15
2.5.1.3. Enzim α -L-arabinofuranosidase.....	16
2.5.2. Hidrolisis hemiselulosa dengan asam	19
2.6. Kromatografi	19
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2. Sampel Penelitian.....	21
3.3. Alat dan Bahan	21
3.3.1. Alat-alat.....	21
3.3.2. Bahan-bahan.....	22
3.4. Cara Kerja	22
3.4.1. Pembuatan larutan NaOH	22
3.4.2. Pembuatan larutan CH_3COOH 4N.....	22
3.4.3. Pembuatan larutan etanol 95%.....	22
3.4.4. Pembuatan larutan buffer fosfat sitrat 100 mM pH 7	23
3.4.5. Pembuatan larutan oat spelt-xylan 1%.....	23
3.4.6. Pembuatan larutan hemiselulosa 1%.....	23
3.4.7. Pembuatan larutan asam sulfat 72%	23
3.4.8. Isolasi dan pemurnian hemiselulosa.....	23
3.4.9. Hidrolisis hemiselulosa dengan larutan asam	24
3.4.10. Produksi enzim xilanolitik	25
3.4.10.1. Media tumbuh	25

3.4.10.2. Produksi enzim xilanase.....	25
3.4.11. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan.....	26
3.4.12. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis.....	27
3.4.13. Analisis produk hidrolisis.....	27
3.5. Skema Kerja.....	28
3.5.1. Isolasi dan pemurnian hemiselulosa.....	28
3.5.2. Hidrolisis dan analisis hemiselulosa.....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1. Isolasi Hemiselulosa dari Batang Kelapa Sawit.....	30
4.2. Penentuan Kondisi Optimum Rendemen Hemiselulosa.....	31
4.3. Hidrolisis Hemiselulosa.....	33
4.3.1. Hidrolisis hemiselulosa dengan asam.....	33
4.3.2. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis.....	35
4.3.2.1. Produksi enzim xilanolitik.....	35
4.3.2.2. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan.....	36
4.3.3.3. Hidrolisis hemiselulosa.....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
5.1. Kesimpulan.....	40
5.2. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
1.	Pengaruh konsentrasi enzim pada laju aktivitas enzim	12
2.	Pengaruh konsentrasi substrat pada laju aktivitas enzim	12
3.	Pengaruh pH pada aktivitas enzim	13
4.	Pengaruh suhu pada aktivitas enzim	13
5.	Struktur xilan tumbuhan dan lokasi kerja enzim xilanase	18
6.	Kromatogram Monosakarida Standar	33
7.	Kromatogram Hemi A Hidrolisis Kimia	34
8.	Kromatogram Hemi B Hidrolisis Kimia	34
9.	Kromatogram Hemi A Hidrolisis Enzim	38
10.	Kromatogram Hemi B Hidrolisis Enzim	39

DAFTAR TABEL

<u>Tabel</u>	<u>Judul Tabel</u>	<u>Halaman</u>
1.	Data Rendemen Hemiselulosa	32
2.	Hasil Hidrolisis Hemiselulosa.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul Lampiran
1.	Gambar Kelapa Sawit
2.	Gambar Batang Kelapa Sawit
3.	Gambar Hemiselulosa A
4.	Gambar Hemiselulosa B
5.	Penentuan Standar Xilosa
6.	Hasil Pengukuran Absorbansi
7.	Perhitungan Aktivitas Enzim
8.	Kromatogram Standar
9.	Kromatogram Hasil Hidrolisis Enzim
10.	Kromatogram Hasil Hidrolisis Kimia
11.	Perhitungan Persen Hidrolisis

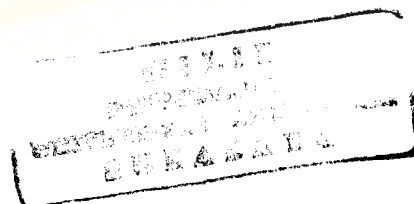
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kelapa sawit adalah salah satu komoditi andalan Indonesia yang bernilai ekonomi tinggi. Selain produksi minyak kelapa sawit, produk samping yang dihasilkan berupa limbah kelapa sawit juga tinggi. Secara umum limbah kelapa sawit dibagi tiga macam yaitu limbah cair, padat, dan gas. Pada umumnya limbah cair industri kelapa sawit mengandung bahan organik yang tinggi sehingga dapat mencemari air tanah dan badan air. Limbah padat dikelompokkan menjadi dua yaitu limbah padat yang berasal dari proses pengolahan berupa Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS), cangkang atau tempurung, serabut atau serat, *sludge* atau lumpur, bungkil dan OPT (*Oil Palm Trunk*). Limbah padat yang diperoleh dari pengolahan limbah cair berupa lumpur aktif, TKKS dan lumpur yang tidak tertangani mengakibatkan bau busuk, tempat bersarang lalat, dan potensial untuk menghasilkan air lindi (*leachate*) (Wahyono *et al.*, 2005).

Limbah padat yang berasal dari proses pengolahan kelapa sawit biasanya dimanfaatkan untuk bahan bangunan dan dibakar. Selain itu dapat juga dimanfaatkan menjadi bahan-bahan yang mempunyai nilai ekonomis. Oleh karena itu diperlukan suatu upaya untuk lebih memanfaatkan limbah padat kelapa sawit khususnya batang kelapa sawit. Batang kelapa sawit terdiri dari tiga komponen utama yaitu selulosa (45%), hemiselulosa (25%), dan lignin (18%) (Anis *et al.*, 2005).



Hemiselulosa merupakan kumpulan beberapa unit gula yang berbeda. Hemiselulosa tersusun dari monomer-monomer seperti D-xilosa, D-manosa, D-galaktosa, D-glukosa, L-arabinosa dan D-asam galakturonat. Monomer-monomer tersebut sangat potensial pemanfaatannya untuk bahan baku industri, misalnya untuk bahan baku pembuatan pelarut organik, produksi xilitol, dan produksi alkohol (Puspaningsih, 2004).

Pada umumnya kandungan hemiselulosa pada kayu diekstraksi dengan larutan alkali. Larutan alkali yang sering digunakan pada proses ekstraksi adalah kalium hidroksida (KOH) dan natrium hidroksida (NaOH). Hidroksida yang lebih disukai adalah kalium hidroksida karena kalium asetat yang dibentuk selama netralisasi ekstrak alkali mempunyai kelarutan yang lebih tinggi dalam alkohol yang digunakan untuk proses pengendapan dibandingkan dengan natrium asetat (Fengel, 1995).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi hemiselulosa dari limbah kelapa sawit yaitu OPT (*Oil Palm Trunk*) menggunakan larutan alkali KOH dengan variasi konsentrasi antara 0,5 M sampai 3,5 M dan variasi waktu perendaman antara 2-8 jam. Berdasarkan penelitian tersebut kondisi ekstraksi hemiselulosa yang optimum adalah pada konsentrasi alkali 3,0 M dengan waktu perendaman selama 4 jam (Anis *et al.*, 2005).

Setelah dilakukan isolasi hemiselulosa maka perlu diketahui monomer-monomer yang terkandung di dalamnya. Di alam, hemiselulosa mempunyai bermacam-macam komponen gula sehingga perlu dilakukan hidrolisis. Produk hidrolisis tersebut merupakan bahan baku industri yang dapat diolah lebih lanjut.

Hidrolisis yang dilakukan adalah hidrolisis kimia dan hidrolisis enzim. Hidrolisis dengan enzim memiliki keunggulan jika dibandingkan dengan hidrolisis kimia. Hidrolisis enzimatis dapat mengurangi penggunaan bahan-bahan kimia sehingga dapat mengurangi adanya pencemaran lingkungan yang diakibatkan oleh penggunaan bahan-bahan kimia. Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis substrat hemiselulosa yaitu enzim *xilanase* (xilanolitik). Kelompok enzim hemiselulosa (hidrolitik), diantaranya adalah enzim *endo- β -xilanase*, *β -xilosidase*, *α -L-arabinofuranosidase* dan *asetil xilan esterase* (Beg *et al.*, 2001). Hidrolisis kimia menggunakan asam mineral yaitu asam sulfat 72% (Anis *et al.*, 2005).

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Ni Nyoman Tri Puspaningsih (2004) berhasil mengidentifikasi, memurnikan, mencirikan dan mengklon gen penyandi enzim xilanolitik dari isolat *Bacillus thermoleovorans* IT-08. Gen penyandi enzim xilanolitik tersebut dinamakan pTP510. Enzim ini mempunyai beberapa sifat yaitu : (1) mampu menghidrolisis *oat spelt-xilan*, (2) bekerja pada suhu optimum 70⁰ C, dan (3) memiliki stabilitas pH pada kisaran 5-8.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit dilakukan dengan menggunakan ekstraksi alkali. Larutan alkali yang digunakan adalah natrium hidroksida. Pereaksi NaOH yang digunakan divariasi konsentrasinya masing-masing 2M, 2,5M, 3,0M, 3,5M dan 4M. Selain itu juga dilakukan variasi waktu perendaman dengan NaOH yaitu selama 2 jam, 4 jam dan 6 jam. Selanjutnya hemiselulosa hasil ekstraksi dari

batang limbah kelapa sawit tersebut dianalisis kandungan monosakaridanya dengan hidrolisis yaitu hidrolisis enzim menggunakan kelompok enzim xilanolitik dari *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510) dan sebagai pembandingnya dilakukan hidrolisis kimia dengan menggunakan asam sulfat 72%.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dikemukakan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah dapat dilakukan isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit ?
2. Bagaimanakah kondisi optimum isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit ?
3. Bagaimanakah produk hidrolisis hemiselulosa secara kimia dan secara enzimatis ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Melakukan isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit.
2. Menentukan kondisi optimum isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit.
3. Membandingkan hasil hidrolisis hemiselulosa secara kimia dan secara enzimatis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk memperoleh hemiselulosa dari batang kelapa sawit, dimana hemiselulosa ini sangat berguna untuk bahan baku industri kimia. Monomer-monomer penyusun hemiselulosa merupakan bahan-bahan yang penting dalam industri kimia yang dapat digunakan untuk bahan baku pembuatan pelarut organik, produksi xilitol, dan produksi alkohol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis jacq*) termasuk dalam famili *Arecaceae*. Tanaman ini mempunyai kandungan serat berlignoselulosa dan merupakan sumber minyak nabati (Purwanto *et al.*, 2005). Perkebunan kelapa sawit banyak tersebar di beberapa daerah seperti Asia Tenggara khususnya Indonesia dan Malaysia, Amerika Latin dan Afrika karena daerah tersebut mempunyai iklim yang cocok untuk kelapa sawit. Indonesia dan Malaysia merupakan penghasil produk kelapa sawit terbesar yang menyuplai 89% dari kebutuhan pasaran dunia (Milieudefensie, 2005).

Produk-produk kelapa sawit mempunyai potensi yang besar untuk kebutuhan masyarakat dunia. Misalnya dari buahnya dihasilkan minyak kelapa sawit yang bergizi dan mudah diolah, dari bijinya dihasilkan tepung kelapa dan minyak kelapa. Minyak kelapa sawit yang dihasilkan dapat digunakan dalam proses pembuatan margarin, produksi detergen, sabun dan kosmetik (Milieudefensie, 2005). Dalam proses pengolahan kelapa sawit dihasilkan limbah kelapa sawit yang sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan (Purwanto *et al.*, 2005).

Selain produksi minyak kelapa sawit yang tinggi, produk sampingnya yang berupa limbah kelapa sawit juga tinggi dan sangat berpotensi untuk industri. Secara umum limbah kelapa sawit dibagi tiga macam yaitu limbah cair, padat,

dan gas. Pada umumnya, limbah cair industri kelapa sawit mengandung bahan organik yang tinggi sehingga dapat mencemari air tanah dan badan air (Wahyono *et al.*, 2005). Selain itu limbah cair yang berwarna hitam pekat dapat mengurangi kemampuan tumbuhan dalam air untuk melakukan fotosintesis sehingga kandungan oksigen dalam air turun dan menyebabkan kemampuan ikan untuk bernafas menjadi kecil (Kompas, 2004).

Sedangkan limbah padat dikelompokkan menjadi dua yaitu limbah yang berasal dari proses pengolahan berupa Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS), cangkang atau tempurung, serabut atau serat, *sludge* atau lumpur dan bungkil. TKKS dan lumpur yang tidak tertangani menyebabkan bau busuk, bersarangnya lalat dan potensial untuk menghasilkan air lindi (*leachate*). Limbah padat yang diperoleh dari pengolahan limbah cair berupa lumpur aktif yang terbawa oleh hasil pengolahan air limbah (Wahyono *et al.*, 2005).

2.2. Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan salah satu penyusun dinding sel tumbuhan selain selulosa dan lignin. Hemiselulosa terdiri dari kumpulan beberapa unit gula yang berbeda yang disebut heteropolisakarida. Pada umumnya gula penyusun hemiselulosa adalah D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glukosa, D-galaktosa, D-asam galakturonat, 4-*o*-asam metilglukuronat dan asam glukuronat (Coughlan *et al.*, 1992).

Hemiselulosa memiliki kesamaan dengan selulosa yaitu merupakan polimer dari unit-unit gula yang terikat oleh ikatan glikosidik. Tetapi hemiselulosa

berbeda dengan selulosa dilihat dari segi komponen unit gula yang membentuknya, panjangnya rantai molekul dan percabangan rantai molekul. Unit gula yang membentuk hemiselulosa dapat dibagi menjadi kelompok seperti pentosa, heksosa, asam heksuronat dan deoksiheksosa. Rantai utama hemiselulosa dapat terdiri dari satu unit (homopolimer), misalnya xilan. Tetapi dapat juga terdiri dari dua unit gula atau lebih (heteropolimer), misalnya glukomanan (Fengel, 1995). Sebagian besar hemiselulosa berbentuk amorf dengan rantai bercabang dan pendek. Derajat polimerisasinya hanya 200 sehingga lebih mudah mengalami reaksi oksidasi dan degradasi dibandingkan dengan selulosa (Sjostrom, 1995).

Ekstraksi hemiselulosa umumnya menggunakan larutan alkali dengan konsentrasi yang berbeda. Sebagian dari hemiselulosa yang larut dalam alkali dapat juga larut dalam air panas. Selain itu, hemiselulosa lebih mudah terhidrolisis oleh asam (Fengel, 1995).

Hemiselulosa merupakan suatu kesatuan yang membangun komposisi serat. Hemiselulosa mempunyai peranan yang penting karena bersifat hidrofilik sehingga dapat berfungsi sebagai perekat antar selulosa yang menunjang kekuatan fisik serat. Kehilangan hemiselulosa akan menyebabkan terjadinya lubang diantara fibril dan kurangnya ikatan antar serat.

2.3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat sangat

tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan yang diekstraksi serta jenis senyawa yang diisolasi. (Harbone, 1987).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan pelarut organik terhadap bahan kering atau segar. Proses ekstraksi tergantung dari kestabilan senyawa yang akan diisolasi. Ekstraksi dapat dilakukan pada suhu kamar dengan cara maserasi, perkolasi atau maserasi-perkolasi. Karena metabolit sekunder umumnya kurang stabil, khususnya senyawa fenolik maka dianjurkan menggunakan ekstraksi pada suhu kamar (Harbone, 1987).

Berdasarkan cara untuk mendapatkan ekstrak kasar, ada 2 macam ekstraksi, yaitu :

1. Ekstraksi berkesinambungan

Pada ekstraksi ini, pelarut yang sama dipakai berulang-ulang sampai proses selesai. Contohnya : soxhlet.

2. Ekstraksi bertahap

Pada ekstraksi ini selalu dipakai pelarut yang baru pada setiap tahapnya sampai tahap selesai. Contohnya : maserasi dan perkolasi.

Sedangkan berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dapat dibedakan menjadi 2 macam, yaitu :

1. Ekstraksi Padat-Cair

Ekstraksi ini merupakan proses yang paling banyak ditemui dalam usaha mengisolasi senyawa berkhasiat yang terkandung dalam bahan alam yang berbentuk padat.

2. Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi ini merupakan proses yang berdasarkan pada distribusi solut dalam dua macam pelarut yang tidak saling campur sehingga solut akan terbagi ke dalam dua macam pelarut tersebut sampai dicapai suatu keadaan setimbang (Harbone, 1987).

Ekstraksi alkali adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan larutan alkali. Ekstraksi alkali biasanya digunakan untuk melakukan isolasi pada kimia kayu yang merupakan komponen-komponen makromolekul utama dinding sel yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Larutan alkali yang biasa digunakan adalah natrium hidroksida, kalium hidroksida, litium hidroksida dan kalsium hidroksida. Kalium hidroksida dan natrium hidroksida mempunyai kemampuan untuk melarutkan pada konsentrasi yang berbeda dan selektif sehingga sering digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi. Hidroksida yang lebih disukai adalah kalium hidroksida karena kalium asetat yang terbentuk selama netralisasi ekstrak alkali mempunyai kelarutan yang lebih tinggi dalam alkohol yang digunakan untuk proses pengendapan dibandingkan dengan natrium asetat (Fengel, 1995).

2.4. Enzim

Enzim adalah biokatalis dalam sistem biologi. Fungsi enzim adalah meningkatkan kecepatan reaksi paling sedikit 10^6 kali. Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dengan gugusan kimiawi lainnya. Enzim akan terdenaturasi oleh panas, terpresipitasi oleh etanol atau garam-garam anorganik

berkonsentrasi tinggi seperti amonium sulfat. Selain itu enzim juga mempunyai sifat-sifat lain yaitu enzim tidak dapat melewati membran semipermeabel atau membran selektif, enzim tidak terdialisis. Protein enzim adalah molekul yang besar dengan berat molekul ± 10.000 sampai 1 juta a.m.u. (Pelczar *et al.*, 1986).

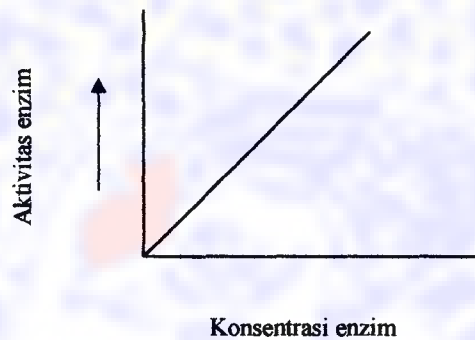
Beberapa enzim terdiri dari protein yang bergabung dengan molekul organik dengan berat molekul rendah yang dinamakan koenzim. Bagian proteinnya disebut apoenzim. Bila bergabung, kedua bagian tersebut membentuk enzim yang lengkap, disebut holoenzim. Selain itu, beberapa enzim juga mengandung vitamin sebagai bagian pelengkap. Dalam beberapa hal, bagian nonprotein enzim berupa logam, misalnya besi pada enzim katalase. Enzim membutuhkan ion logam untuk teraktivasi. Ion-ion dianggap sebagai koenzim atau kofaktor. Gabungan kofaktor dengan koenzim membuat suatu enzim menjadi aktif (Pelczar *et al.*, 1986).

Dua ciri enzim yang menonjol adalah efisiensi katalitiknya tinggi dan derajat kekhususannya yang tinggi terhadap substrat. Satu enzim tunggal akan bereaksi dengan satu substrat tunggal. Aktivitas enzim terhadap substrat terjadi pada sisi aktif enzim. Proses ini menurunkan rintangan energi aktivasi terhadap suatu reaksi kimia dan memungkinkan laju reaksi menjadi lebih cepat (Pelczar *et al.*, 1986).

Enzim bersifat tidak stabil, aktivitasnya dapat berkurang oleh berbagai kondisi fisik maupun kimiawi. Kondisi yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah

1. Pengaruh konsentrasi enzim pada laju aktivitas enzim

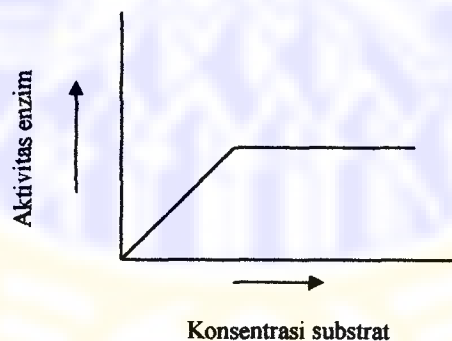
Pengaruh konsentrasi enzim pada laju aktivitas enzim, terdapat suatu hubungan yang linier antara jumlah enzim dan aktivitasnya, dimana semakin pekat konsentrasi enzim maka aktivitas enzim akan semakin tinggi (Pelczar *et al.*, 1986). Hal ini dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi enzim pada laju aktivits enzim

2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

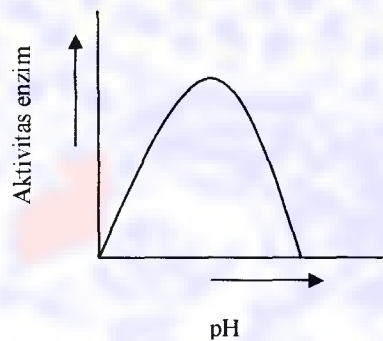
Mula-mula laju aktivitas naik dengan pesat sebanding dengan naiknya konsentrasi substrat. Kenaikan konsentrasi substrat tidak akan lagi berpengaruh pada laju aktivitas setelah melewati konsentrasi substrat optimum (Pelczar *et al.*, 1986). Hal tersebut dapat dilihat pada gambar 2



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap enzim

3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

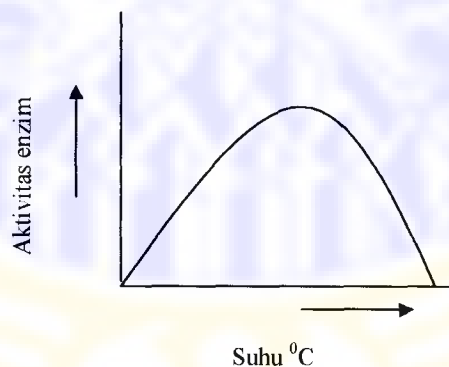
Aktivitas maksimum akan dicapai pada pH tertentu, penyimpangan pH akan mengurangi laju aktivitas enzim (Pelczar *et al.*, 1986). Hal tersebut dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

4. Pengaruh suhu terhadap laju aktivitas enzim

Laju aktivitas akan mencapai optimum pada suhu tertentu. Kenaikan suhu lebih lanjut akan mengurangi laju aktivitas enzim, yang akhirnya akan merusak enzim tersebut (Pelczar *et al.*, 1986). Hal tersebut dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap laju aktivitas enzim

2.5. Hidrolisis Hemiselulosa xilan

Hidrolisis hemiselulosa khususnya xilan merupakan reaksi degradasi hemiselulosa menjadi monomer-monomernya. Hidrolisis hemiselulosa ada dua yaitu hidrolisis secara enzimatik yang menggunakan enzim xilanase dan hidrolisis kimia menggunakan asam-asam mineral (Fengel, 1995).

2.5.1. Hidrolisis hemiselulosa xilan secara enzimatik

Hidrolisis hemiselulosa khususnya xilan dengan enzim membutuhkan enzim-enzim pendegradasi xilan. Enzim-enzim pendegradasi xilan disebut enzim xilanolitik atau enzim xilanase. Hidrolisis total xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) yang menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida, 1,4- β -D-xilosidase (1,4- β -D-xylanxylohydrolase, EC.3.2.1.37) yang memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh α -L-arabinofuranosidase, α -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Subramaniyan *et al.*, 2002).

Enzim xilanase bermanfaat untuk beberapa keperluan, antara lain untuk proses pemutihan industri pulp dan kertas, meningkatkan mutu pakan ternak, pengolahan bahan makanan, meningkatkan kemampuan dalam degradasi material tumbuhan (khususnya limbah pertanian), produksi alkohol, produksi xilitol dan meningkatkan proses ekstraksi minyak tumbuhan (Beg *et al.*, 2001, Subramaniyan *et al.*, 2002, dan Shallom *et al.*, 2002).

2.5.1.1. Enzim endo- β -xilanase

Enzim endo- β -xilanase (EC.3.2.1.8) sebagian besar dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, fungi dan beberapa diantaranya juga dihasilkan oleh tumbuhan dan hewan (Subramanian *et al.*, 2002). Enzim xilanase yang berasal dari mikroba diklasifikasikan ke dalam dua famili utama. Pembagian tersebut berdasarkan sifat fisiko-kimianya, yaitu massa molekul relatif dan titik isoelektrik (Wang (1998) dalam Coughlan *et al.*, 1992).

Famili GH10 (disebut juga Famili F) merupakan kelompok endo-xilanase dengan massa molekul relatif tinggi dengan harga pI yang rendah. Sebaliknya Famili GH11 (disebut juga Famili G) mempunyai massa molekul relatif rendah dengan harga pI yang tinggi. Perbedaan sifat katalitik dari kedua famili tersebut adalah famili 10 mampu menyerang ikatan glikosidik di sebelah titik cabang dan mengarah ke ujung non-pereduksi dengan menggunakan dua residu xilopiranosil non-substitusi antara cabang-cabang, sedangkan famili 11 menggunakan tiga residu xilopiranosil non-substitusi. Berdasarkan hal tersebut, famili 10 mempunyai beberapa aktivitas katalitik yang sesuai dengan β -xilosidase (Puspaningsih, 2004).

2.5.1.2. Enzim β -xilosidase

Enzim β -xilosidase telah ditinjau oleh Eriksson (1990), enzim ini berstruktur monomer, dimer, atau tetramer dengan berat molekul antara 26.000 sampai 360.000. Enzim ini diproduksi oleh bermacam-macam bakteri dan fungi, dan mungkin juga ditemukan di kultur cair (Coughlan *et al.*, 1992). Enzim β -xilosidase (EC. 3.2.1.37) menghidrolisis 1,4- β -D-xilooligosakarida dari ujung

non-pereduksi dan melepaskan xilosa. Enzim ini mampu pula menghidrolisis substrat aril-xilosida. Selain itu, beberapa enzim β -xilosidase juga memiliki aktivitas α -L-arabinofuranosidase (13% dari β -xilosidase), namun tidak memiliki aktivitas glikosidase yang lain, seperti β -glukosidase, β -galaktosidase atau β -N-asetilglukosaminidase (Yaw *et al.*, 2000, dan Bravman *et al.*, 2003). Berdasarkan persamaan runtunan N-terminalnya, maka enzim β -xilosidase dapat digolongkan ke dalam famili glikosida hidrolase 10, 3, 39, 43, 52 dan 54 (Henrissat *et al.*, 2003).

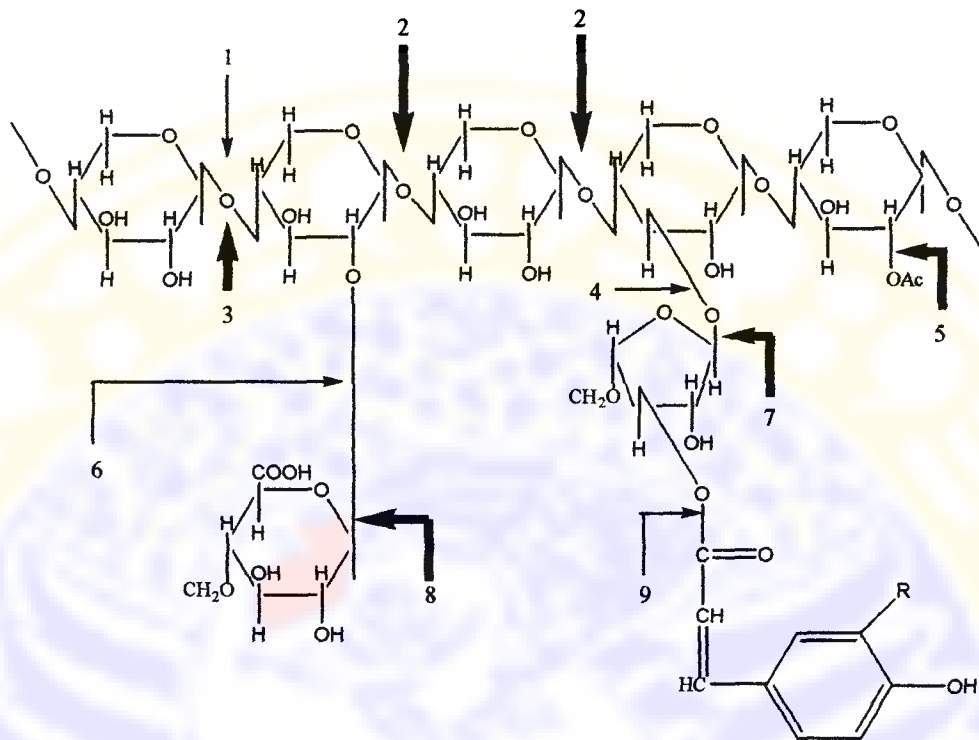
2.5.1.3. Enzim α -L-arabinofuranosidase

Kebanyakan arabinosidase dalam bentuk monomer, tetapi juga ditemukan dalam bentuk dimer, tetramer, dan oktamer. Enzim ini memiliki berat molekul antara 53.000 sampai 495.000, dengan pH optimum antara 2,5 sampai 6,9 dan pI antara 3,6 sampai 9,3. Hidrolisis oleh arabinosidase dapat terdeteksi dengan uji aktivitas menggunakan *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosida (Coughlan *et al.*, 1992).

Enzim α -L-arabinofuranosidase (EC. 3.2.1.55) menghidrolisis ujung non-pereduksi antara ikatan α -L-arabinofuranosida dengan berbagai polisakarida yang mengandung arabinofuranosa (Debeche *et al.*, 2002). Enzim ini merupakan bagian dari glikosida hidrolase yang berperan dalam proses degradasi hemiselulosa seperti arabinoxilan, arabinogalaktan, dan L-arabinan. Adanya substituen L-arabinofuranosida dalam struktur xilan dapat secara kuat menghambat aktivitas endo-xilanase dan β -xilosidase yang berakibat menghalangi degradasi total dari polimer xilan (Shallom *et al.*, 2002). Hal ini disebabkan oleh struktur L-

arabinofuranosida yang cukup besar, sehingga akan terjadi halangan ruang bagi aktivitas endo-xilanase dan xilosidase. Oleh karena itu, keberadaan enzim arabinofuranosidase sangat penting dalam degradasi total xilan (Debeche *et al.*, 2002 dan Shallom *et al.*, 2002).

Berdasarkan kesamaan runtunan N-terminalnya, maka enzim α -L-arabinofuranosidase digolongkan kedalam 4 famili glikosida hidrolase yaitu 10, 3, 43, 51, 54 dan 62 (Henrissat *et al.*, 2003). Lokasi kerja enzim xilanase pada xilan tumbuhan dapat dilihat gambar 5 di halaman berikutnya.



Gambar 5. Struktur xilan tumbuhan dan lokasi kerja enzim xilanase (Beg *et al.*, 2001)

Keterangan :

1. Ikatan glikosida pada β -1,4-D-xilopiranososa
2. β -xilosidase
3. Endo-xilanase
4. Ikatan glikosida pada α -1,3-L-arabinofuranosa
5. Asetil-xilan-esterase
6. Ikatan glikosida pada asam α -1,2,4-*o*-metil-D-glukuronat
7. α -L-arabinofuranosidase
8. α -glukuronidase
9. Ferulil dan *p*-kumaroil esterase

2.5.2. Hidrolisis hemiselulosa xilan dengan asam

Hidrolisis suatu hemiselulosa adalah reaksi degradasi hemiselulosa menjadi monomer-monomernya dalam suasana asam. Hidrolisis ini menghasilkan pemecahan ikatan glikosida. Laju hidrolisis tergantung pada parameter asam, jenis sampel, suhu dan tekanan. Pada hidrolisis ini banyak digunakan asam mineral dalam berbagai konsentrasi meliputi asam sulfat, asam klorida, asam fosfat, asam nitrat dan asam trifluoroasetat (TFA) (Fengel, 1995).

2.6 Kromatografi

Kromatografi adalah metode yang digunakan untuk memisahkan komponen dalam sampel, dimana komponen tersebut didistribusikan diantara dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak/mobil. Fasa diam berupa padatan/cair yang dilapiskan pada padatan/gel. Pada pemisahan ini senyawa-senyawa yang akan dipisahkan ditempatkan dalam sistem yang bergerak mengalir melalui suatu sistem yang diam, dan selama pengaliran fasa mobil akan terjadi pelarutan, adsorpsi dan penguapan. Pada prinsipnya semua cara pemisahan kromatografi mengalami proses yang sama yaitu adanya distribusi komponen-komponen dalam fasa diam dan fasa gerak dengan memanfaatkan perbedaan-perbedaan sifat-sifat fisik komponen yang hendak dipisahkan (Mulja, 1995). Perbedaan sifat tersebut diantaranya:

- a. Kelarutan yang berbeda terhadap suatu pelarut
- b. Sifat untuk bertaut (adsorpsi) yang berbeda satu sama lain dengan suatu serbuk bahan padat

c. Sifat dapat menguap pada temperatur yang berbeda satu sama lain

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan metode pemisahan yang dikembangkan dari asas proses pemisahan adsorpsi dan partisi ke arah yang lebih luas yaitu proses pemisahan yang berdasarkan afinitas, filtrasi gel dan ion yang berpasangan yang prosesnya tetap dilaksanakan di dalam kolom yang disertai pemakaian pelarut dengan tekanan tinggi. Dasar pemisahan KCKT adalah perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen sampel yang terjadi karena adanya perbedaan kesetimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak untuk senyawa-senyawa yang berbeda. KCKT sangat ideal untuk memisahkan molekul-molekul dari sampel organik dalam sampel biologis, bahan-bahan alam yang mudah mengalami perubahan, senyawa yang kurang stabil dan senyawa dengan berat molekul tinggi (Mulja, 1995).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik-Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dimulai pada bulan Agustus sampai bulan Desember 2005.

3.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah limbah kelapa sawit yang berupa batang. Batang kelapa sawit diperoleh dari Perkebunan Kelapa Sawit BEKRI, Lampung.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas autoklaf (OSK 6508 *Steam pressure apparatus* Ogawa Seiki Co., LTD), *laminair air flow cabinet* (Kottermann 8580), sentrifuga Beckman (tipe TJ-6), timbangan analitik (Ohaus), pH meter (Metrohm 744), oven (Mettler, Jerman), *rotary shaker*, lemari pendingin -20°C (Royal Chest Freezer BD195), pipet mikro (Eppendorf), *ultrasonikator*, *waterbath* (sansat type syk-382-M), spektrofotometri UV-VIS (Shimadzu 1700 pharma), seperangkat alat refluks, seperangkat alat destilasi fraksi, corong Buchner, pengaduk magnetik (stirer), pemanas, termometer dan alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

3.3.2. Bahan-bahan

Bakteri yang digunakan sebagai sumber enzim xilanolitik adalah *E. coli* DH5 α rekombinan (pTP510) koleksi Laboratorium Kimia Organik-Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Airlangga Surabaya. Bahan yang digunakan antara lain natrium hidroksida (NaOH), asam asetat glasial (100%), etanol 96%, tripton, *yeast extract*, natrium klorida (NaCl), natrium hipofosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ atau $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), asam sitrat, *bacto-agar*, ampisilin, isopropil- β -D-tiogalaktopiranosida (IPTG), 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosida (X-gal), *oat spelt-xylan*, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), asam sulfat 96%, barium hidroksida ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) jenuh.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan larutan NaOH

Dibuat lima macam larutan NaOH, untuk memperoleh larutan NaOH dengan konsentrasi 2M, 2,5M, 3M, 3,5M, 4M ditimbang masing-masing sebanyak 8 gram, 10 gram, 12 gram, 14 gram dan 16 gram ke dalam gelas beker 100 mL, selanjutnya dilarutkan dengan akuades sampai volume 100 mL.

3.4.2. Pembuatan larutan CH_3COOH 4N

Pada labu ukur 100 mL dimasukkan 23 mL larutan CH_3COOH 100% kemudian diencerkan sampai volume 100 mL.

3.4.3. Pembuatan larutan etanol 95%

Pada labu ukur 100 mL dimasukkan 99 mL larutan etanol 96% kemudian diencerkan sampai volume 100 mL.

3.4.4. Pembuatan larutan buffer fosfat sitrat (PC) 100 mM pH 7

Ditimbang 0,1921 gram asam sitrat ke dalam gelas beker 50 mL kemudian dilarutkan dengan akuades sampai volume 10 mL. Ditimbang 3,585 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ atau 2,6825 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas beker 100 mL kemudian dilarutkan dengan akuades sampai volume 50 mL. 6,5 mL larutan asam sitrat 0,1 M dicampurkan dengan 43,6 mL larutan natrium fosfat 0,2 M kemudian diencerkan sampai volume 100 mL.

3.4.5. Pembuatan larutan *oat spelt-xylan* 1%

Ditimbang 1 gram *oat spelt-xylan* ke dalam gelas beker kemudian dilarutkan dengan 100 mL buffer PC 100 mM pH 7.

3.4.6. Pembuatan larutan hemiselulosa 1%

Ditimbang 1 gram hemiselulosa produk isolasi ke dalam gelas beker kemudian dilarutkan dengan 100 mL buffer PC 100 mM pH 7.

3.4.7. Pembuatan larutan asam sulfat 72%

Pada labu ukur 10 mL dimasukkan 7,5 mL larutan asam sulfat 96% kemudian diencerkan sampai 10 mL.

3.4.8. Isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit

Batang kelapa sawit dipotong-potong lalu dikeringkan hingga kering. Kemudian digiling menjadi serbuk.

Serbuk batang kelapa sawit ditimbang 10 gram dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang sudah berisi 100 mL larutan NaOH, pengaduk magnetik, termometer dan pendingin balik diatur sehingga batang kelapa sawit dapat diolah. Konsentrasi larutan NaOH dan waktu pemasakan divariasikan 2M, 2,5M, 3M, 3,5M,

4M dan 2 jam, 4 jam, 6 jam. Setelah pengolahan selesai, didinginkan, kemudian disaring dengan corong Buchner. Filtratnya diasamkan dengan asam asetat 4N sampai pH 5,5-6,0 untuk mengendapkan hemiselulosa A, kemudian disentrifugasi (10000 rpm, 20 menit) untuk memisahkan endapannya. Endapan yang diperoleh dicuci dengan akuades untuk menghilangkan sisa NaOH yang ikut mengendap. Kemudian endapan tersebut di *freeze dried* untuk mendapatkan hemiselulosa A yang bebas air. Filtrat yang diperoleh dicampur dengan etanol 95% untuk mengendapkan hemiselulosa B dengan perbandingan filtrat : etanol 95% = 1 : 2 dan didiamkan selama 24 jam untuk memperbanyak endapan. Kemudian disentrifuge (10000 rpm, 20 menit) untuk memisahkan endapannya. Endapan yang diperoleh dicuci dengan etanol 96% dan di *freeze dried* untuk mendapatkan hemiselulosa B yang bebas air (Anis *et al.*, 2005).

Dari isolasi tersebut maka hemiselulosa yang didapatkan pada kondisi yang paling optimum digunakan untuk uji selanjutnya.

3.4.9. Hidrolisis hemiselulosa xilan dengan asam

Ditimbang 300 mg hemiselulosa dicampur dengan 3 mL H₂SO₄ 72% lalu campuran ditambah dengan 84 mL akuades kemudian campuran tersebut direfluks selama 2 jam. Setelah dingin campuran tersebut dinaikkan pHnya dengan larutan Ba(OH)₂ jenuh sampai pH 5-6 kemudian disentrifugasi (10000 rpm, 20 menit) untuk memisahkan endapannya. Filtrat yang didapat di *freeze dried* untuk mendapatkan serbuk yang kering (Anis *et al.*, 2005).

3.4.10. Produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* (pTP 510)

3.4.10.1. Media tumbuh

- **Pembuatan media padat**

Media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB). Media padat digunakan untuk meremajakan koloni *E. coli* DH5 α yang mengandung pTP510. Dibuat media LB padat (0,4 g *bacto-agar*, 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g *yeast extract*) dilarutkan dalam 20 mL akuades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat-hangat kuku ditambah dengan 20 μ L ampisilin (100 mg/mL), 10 μ L IPTG (1mM), dan 20 μ L X-gal (20 mg/mL), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri. Media yang telah memadat di simpan dalam lemari pendingin (Puspaningsih, 2004).

- **Pembuatan media cair**

Media cair yang digunakan adalah media LB. Dibuat media cair 20 mL, ditimbang 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 20 mL akuades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media cair steril disimpan dalam lemari pendingin (Puspaningsih, 2004).

3.4.10.2. Produksi enzim xilanase rekombinan

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan biakan bakteri pTP510 dari *E. coli* DH5 α ke dalam 20 mL media inokulum yang sebelumnya ditambahkan 20 μ L ampisilin (100 mg/mL). Biakan diinokulasi pada suhu 37⁰C dengan kecepatan 150 rpm selama \pm 18 jam. 1% biakan inokulum dimasukkan ke dalam 20 mL media produksi yang sebelumnya ditambahkan 20 μ L ampisilin (100 mg/mL). Biakan diinkubasi

dengan kondisi seperti di atas. Sel dipanen setelah ± 18 jam pertumbuhan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat dingin (PC) 100 mM pH 7 dan dilisis dengan ultrasonikator dengan frekuensi 20 Hz selama 1 menit diulang 2 kali. Enzim xilanase didapat dari supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit (Puspaningsih, 2004).

3.4.11. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan

Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat *oat spelt-xylan*. Masing-masing 100 μ L substrat *oat spelt-xylan* 1% ditambah 100 μ L enzim, diinkubasi pada suhu 70°C selama 1 jam. Hasil inkubasi ditambah dengan 600 μ L pereaksi DNS dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam penangas air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang (λ) 550 nm. Kontrol yang digunakan 100 μ L enzim, 100 μ L substrat dan 600 μ L pereaksi DNS diperlakukan sama dengan kondisi di atas tetapi tanpa diinkubasi.

Standar xilosa dibuat pada kisaran 0,1-1 mg xilosa/mL dari stok xilosa 10 mg/mL. 200 μ L masing-masing larutan standar dicampur dengan 200 μ L akuades, kemudian ditambah 600 μ L pereaksi DNS, dikocok kuat. Kemudian dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera dinginkan dalam penangas air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada λ 550 nm. Blanko digunakan dengan mengganti xilosa dengan akuades (Puspaningsih, 2004).

3.4.12. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis

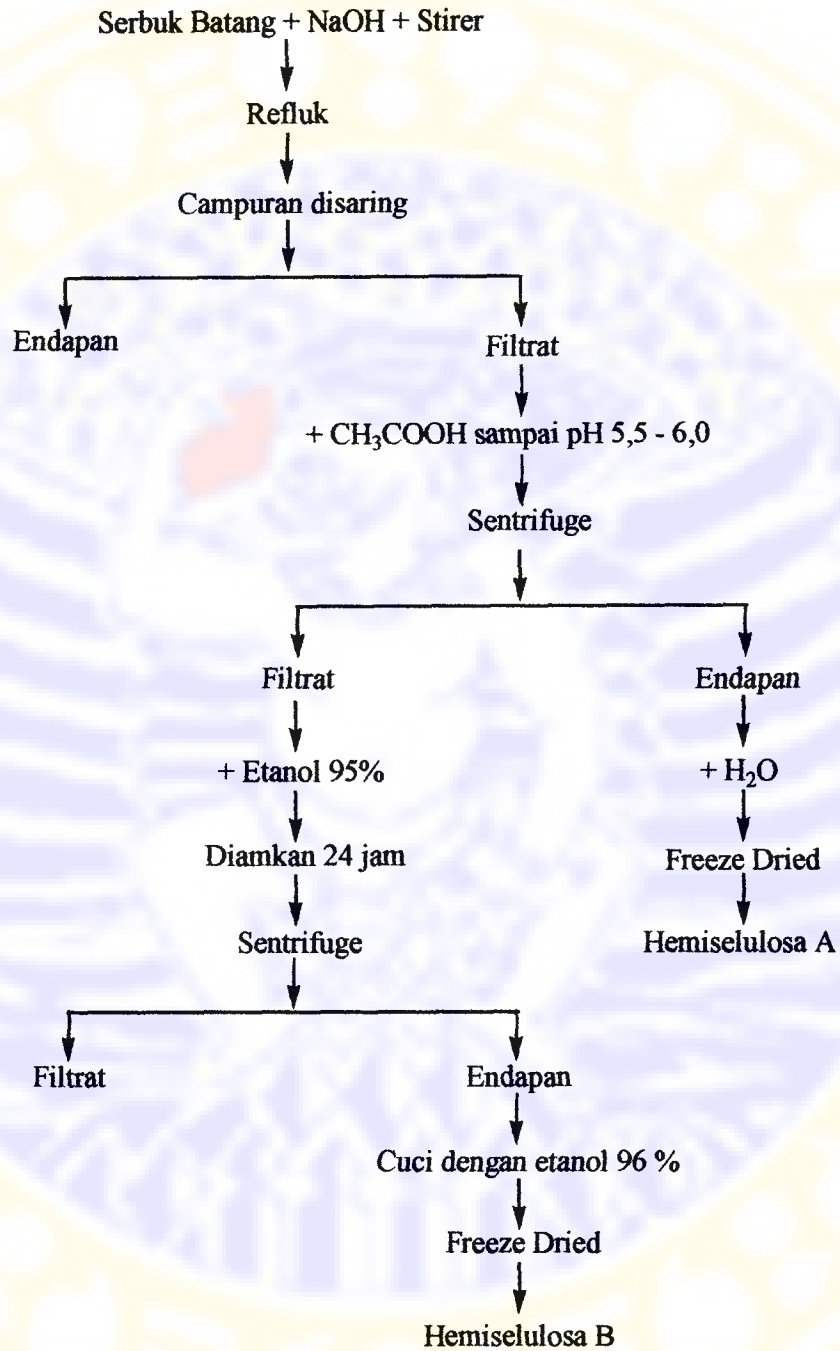
Untuk hidrolisis enzim, 100 μL sampel hemiselulosa 1% ditambah dengan 100 μL enzim xilanase, diinkubasi pada suhu 70°C selama 24 jam. Kemudian campuran tersebut disentrifugasi untuk memisahkan endapan dan filtratnya. Filtrat yang diperoleh di *freeze dried* untuk mendapatkan serbuk kering (Puspaningsih, 2004).

3.4.13. Analisis produk hidrolisis

Produk hidrolisis asam dan enzim dianalisis menggunakan KCKT. Analisis KCKT menggunakan kolom karbohidrat (mikrobondapak, waters 2487), detektor refraktori indeks, pelarut metanol 80% dalam air, kecepatan alir 1 $\mu\text{L}/\text{menit}$, konsentrasi senyawa standar 1000 ppm, volume injeksi 20 μL dan suhu kolom menggunakan suhu ruang.

3.5. Skema Kerja

3.5.1. Isolasi dan pemurnian hemiselulosa



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Hemiselulosa dari Batang Kelapa Sawit

Tahap awal isolasi hemiselulosa adalah mengolah batang kelapa sawit menjadi bentuk serbuk kelapa sawit dengan menggunakan alat giling yang mempunyai ukuran pori terkecil. Serbuk batang kelapa sawit tersebut direfluks menggunakan larutan NaOH dengan konsentrasi 2M, 2,5M, 3M, 3,5M, 4M, sedangkan waktu pemasakan divariasikan 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. Pengolahan dengan larutan NaOH bertujuan untuk memisahkan hemiselulosa dan selulosa. Selama proses refluks berlangsung, suhu pemasakan dibiarkan maksimum. Suhu maksimum dapat tercapai pada saat larutan NaOH mencapai titik didihnya. Titik didih larutan NaOH dipengaruhi oleh konsentrasi larutannya. Semakin tinggi konsentrasi NaOH maka semakin tinggi suhu yang dihasilkan.

Setelah proses refluks, campuran disaring, ke dalam filtrat ditambahkan larutan asam asetat 4N sampai pH 5,5-6,0. Penambahan asam asetat tersebut bertujuan untuk menetralkan campuran tersebut dan mengendapkan hemiselulosa (hemi A), kemudian hemiselulosa yang didapat dicuci dengan akuades untuk menghilangkan sisa larutan NaOH yang masih ada. Untuk mendapatkan hemiselulosa (hemi B) maka ke dalam sisa filtrat ditambahkan etanol 95% dan dibiarkan selama ± 24 jam untuk memperbanyak endapan hemiselulosa. Hemiselulosa yang dihasilkan dicuci dengan etanol 96% untuk menghilangkan pengotor-pengotornya.

Dari proses tersebut dihasilkan hemiselulosa A (Hemi A) dan hemiselulosa B (Hemi B). Hemi A merupakan produk hemiselulosa utama sedangkan hemi B adalah produk hemiselulosa sisa. Hemi B dihasilkan dari proses pengendapan kedua. Hemiselulosa yang dihasilkan berbentuk serbuk dengan warna coklat muda sampai hitam. Serbuk hemi A berwarna lebih muda dari serbuk hemi B.

4.2. Penentuan Kondisi Optimum Rendemen Hemiselulosa

Produk Hemiselulosa dikatakan baik apabila menghasilkan rendemen yang tinggi dengan kualitas yang baik. Pada penelitian ini, hemiselulosa lebih banyak didapatkan pada penambahan etanol 95% (Hemi B) dibandingkan pada penambahan asam asetat 4N (Hemi A). Hal ini menunjukkan tahap pengendapan pertama kurang optimal untuk menghasilkan hemiselulosa dikarenakan adanya perbedaan berat molekul hemiselulosa. Kondisi optimum rendemen hemiselulosa adalah pada konsentrasi NaOH 2M dan waktu pemasakan selama 6 jam. Data rendemen Hemiselulosa yang diperoleh pada penelitian ini ditampilkan pada Tabel 1 di halaman berikutnya.

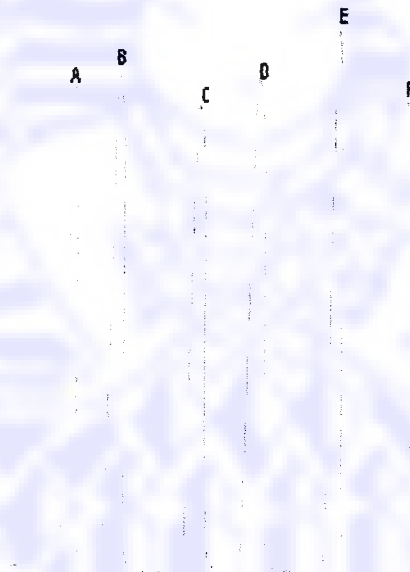
Tabel 1. Data Rendemen Hemiselulosa

Waktu (Jam)	Konsentrasi NaOH (M)	Berat serbuk (gram)	Hemiselulosa (gram)		Berat Total (gram)	Kadar rata-rata %b/b	
			A	B			
2	2	10	1,0327	2,1075	3,1402	32,13	
		10	1,1156	2,1694	3,2850		
	2,5	10	0,8568	1,2150	2,0178	20,63	
		10	0,7340	1,3735	2,1075		
	3	10	0,6109	1,4055	2,0164	21,10	
		10	0,7215	1,4820	2,2035		
	3,5	10	0,4671	0,9616	1,4278	13,60	
		10	0,4774	0,8118	1,2892		
	4	10	0,2866	1,2405	1,5271	16,01	
		10	0,5560	1,1192	1,6752		
	4	2	10	0,7321	1,8305	2,5626	26,56
			10	0,8833	1,8667	2,7500	
2,5		10	1,0654	1,3644	2,4298	22,76	
		10	0,8077	1,3139	2,1216		
3		10	0,5061	1,1082	1,6143	16,44	
		10	0,5582	1,1150	1,6732		
3,5		10	0,8076	1,4184	2,2260	17,88	
		10	0,3033	1,0464	1,3497		
4		10	0,4140	0,9858	1,3998	14,42	
		10	0,5859	0,9858	1,4844		
6		2	10	1,1388	2,2601	3,3989	33,29
			10	1,2361	2,0238	3,2599	
	2,5	10	1,4566	1,6972	3,1538	31,69	
		10	1,1414	2,0428	3,1842		
	3	10	0,6609	2,3601	3,0210	30,09	
		10	0,7246	2,2723	2,9969		
	3,5	10	0,5119	1,7841	2,2960	22,10	
		10	0,7596	1,3654	2,1250		
	4	10	0,5627	1,2491	1,8118	17,90	
		10	0,3753	1,3933	1,7686		

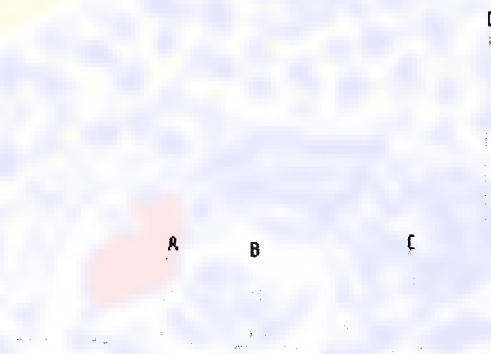
4.3. Hidrolisis Hemiselulosa

4.3.1. Hidrolisis hemiselulosa dengan asam

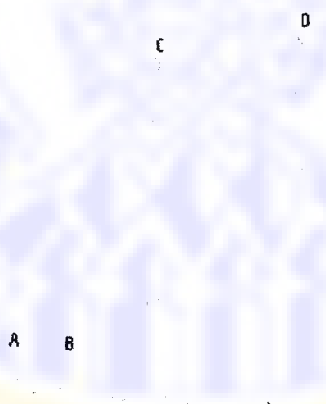
Hidrolisis asam digunakan untuk memutuskan ikatan glikosidik pada hemiselulosa agar dihasilkan monomer-monomernya. Pada hidrolisis ini digunakan asam sulfat sebagai katalis dan untuk protonasi. Sedangkan Barium Hidroksida digunakan untuk menetralkan hasil hidrolisis dan mengendapkan sulfatnya menjadi Barium Sulfat. Dari hidrolisis tersebut dihasilkan monomer-monomer sebagai berikut untuk hemi A yaitu glukosa, xilosa, arabinosa dan xilooligosakarida. Sedangkan untuk hemi B yaitu fruktosa, glukosa, xilosa dan arabinosa.



Gambar 6. Kromatogram Monosakarida Standart (A:fruktosa (RT:1,34), B:glukosa (RT:2,03), C:xilosa (RT:3,23), D:mannosa (RT:4,14), E:Arabinosa (RT:5,32), F:xilooligosakarida (RT:6,35))



Gambar 7. Kromatogram Hemi A hidrolisis kimia (A:glukosa (RT:2,06), B:xilosa (RT:3,24), C:Arabinosa (5,32),D:xilooligosakarida (RT:6,39))



Gambar 8. Kromatogram hemi B hidrolisis kimia (A:fruktosa (RT:1,30), B:glukosa (RT:2,09), C:xilosa (RT:3,30), D:Arabinosa (RT:5,37))

4.3.2. Hidrolisis Hemiselulosa Secara Enzimatis

4.3.2.1. Produksi Enzim xilanolitik

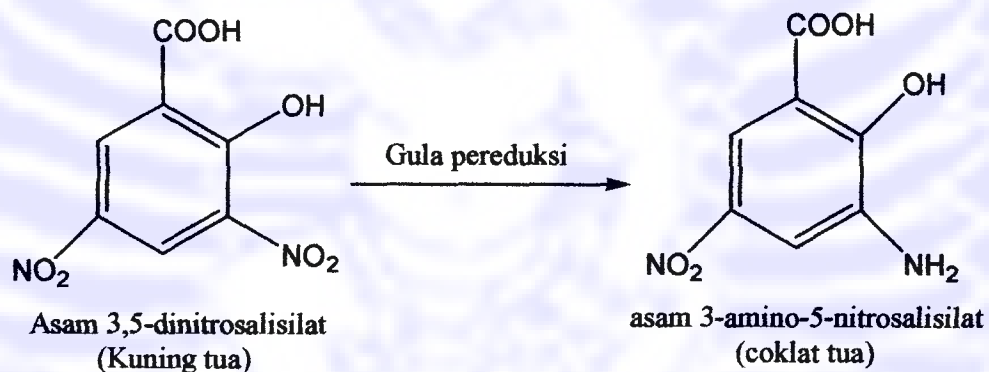
Tahap awal pada produksi enzim ini adalah peremajaan biakan dengan menumbuhkan koloni *E.coli* DH5 α yang mengandung pTP510 pada media padat, kemudian satu koloni bakteri pTP510 diinokulasi di media cair. 1% biakan inokulum tersebut dimasukkan pada media produksi. Untuk menumbuhkan bakteri pada media cair maka biakan tersebut selanjutnya digoyang pada *shaker incubator*, suhu 37°C kecepatan 150 rpm selama \pm 18 jam. Pada pembuatan media padat dan cair ditambahkan ampisilin sebagai penanda biakan *E.coli* rekombinan sehingga dimungkinkan tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri yang lain. Penambahan IPTG dan Xgal pada media padat akan menghasilkan *E.coli* DH5 α (pTP510) yang berwarna putih, sedangkan *E.coli* DH5 α rekombinan (pBKS+) berwarna biru. Perbedaan warna biakan ini disebabkan adanya manipulasi genetik yaitu terjadi inaktivasi gen *lacZ* yang terdapat pada plasmid pTP 510 karena adanya insersi gen penyandi xilanolitik. Sedangkan pada plasmid pBKS+ tidak mengalami insersi gen penyandi enzim xilanolitik sehingga gen *lacZ* tetap aktif (Brown, 1991).

Panen sel dilakukan dengan sentrifugasi. Pelet yang dihasilkan ditambahkan buffer fosfat sitrat 100 mM pH 7. Campuran tersebut dilisis dengan ultrasonikator untuk mendapatkan enzim intraseluler. Lokasi intraseluler enzim diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Kumalawati, 2005).

4.3.2.2. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan

Setelah didapatkan enzim xilanolitik rekombinan maka perlu diketahui aktivitas enzim tersebut. Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat *oat spelt-xylan*. Substrat terhidrolisis dapat diketahui dari perubahan warna dan nilai absorbansi pada λ 550 nm. Gula pereduksi yang dihasilkan adalah xilosa. Pereaksi yang digunakan untuk mengetahui adanya gula pereduksi adalah asam 3,5-dinitrosalisilat. Pereaksi ini akan mengalami reduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat sehingga terjadi perubahan warna dari kuning menjadi coklat.

Reaksinya adalah



Untuk mengetahui kadar gula pereduksi hasil hidrolisis enzimatis, maka dilakukan pengukuran absorbansi terhadap standar xilosa pada λ 550 nm. Aktivitas enzim xilanolitik yang ditentukan adalah 173,33 U/mL. Hal ini menunjukkan unit aktivitas xilanase menunjukkan 173,33 μ mol xilosa yang dihasilkan per menit untuk setiap mL enzim.

4.3.2.3. Hidrolisis hemiselulosa

Setelah diketahui enzim xilanolitik tersebut mempunyai aktivitas maka bisa dilakukan hidrolisis terhadap hemiselulosa. Hidrolisis hemiselulosa dengan enzim mempunyai sifat yang spesifik. Hidrolisis dengan enzim xilanolitik ini hanya menghasilkan monomer-monomer sebagai berikut untuk hemi A yaitu glukosa, xilosa, arabinosa dan xilooligosakarida. Sedangkan untuk hemi B yaitu glukosa, xilosa dan arabinosa. Pada hidrolisis ini seharusnya glukosa tidak dihasilkan namun pada penelitian ini dihasilkan glukosa. Hal ini disebabkan glukosa dan xilosa berbentuk cincin piran sedangkan enzim 1,4- β -xilosidase hanya memutus ikatan glikosidik pada xilooligosakarida menjadi xilosa. Karena pada hemiselulosa dihasilkan oligomer dari glukosa sehingga enzim tersebut dapat memutuskan ikatan glikosidik pada glukosa.

Hidrolisis kimia dan enzim mempunyai hasil yang relatif sama, namun hasil hidrolisis dengan menggunakan enzim mempunyai konsentrasi yang lebih besar. Selain itu hidrolisis menggunakan enzim cenderung lebih sedikit produk sampingnya dan lebih ramah terhadap lingkungan. Hasil hidrolisis hemiselulosa dapat dilihat pada Tabel 2 di halaman berikutnya.

Tabel 2. Hasil Hidrolisis Hemiselulosa

Standart	Hidrolisis Kimia (%b/b)		Hidrolisis Enzim (%b/b)	
	Hemi A	Hemi B	Hemi A	Hemi B
Fruktosa	-	2,02	-	-
Glukosa	4,72	2,43	4,18	1,49
Xilosa	5,65	3,23	4,05	21,09
Arabinosa	5,35	25,32	6,45	42,09
Xilooligosakarida	21,23	-	23,46	-

Gambar 9. Kromatogram hemi A hidrolisis enzim

(A:glukosa(RT:2,07), B:xilosa(RT:3,28), C:arabinosa(RT:5,35),

D:xilooligisakarida(RT:6,34)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

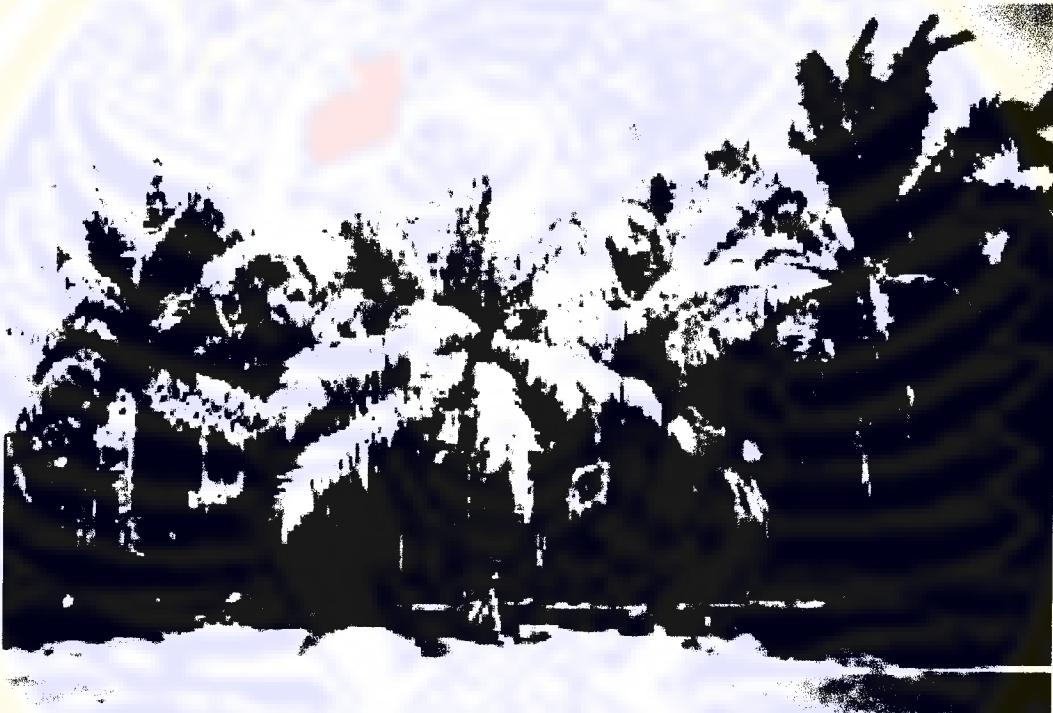
1. Isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit dapat dilakukan.
2. Kondisi optimum isolasi hemiselulosa dari batang kelapa sawit menggunakan NaOH 2M dengan waktu refluks 6 jam.
3. Produk hidrolisis hemiselulosa secara kimia adalah fruktosa, glukosa, xilosa, arabinosa dan xilooligosakarida. Sedangkan produk hidrolisis hemiselulosa secara enzimatik adalah glukosa, xilosa, arabinosa dan xilooligosakarida.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini maka perlu dilakukan isolasi hemiselulosa dari daun, tandan, dan pelepah kelapa sawit serta tongkol jagung. Selain itu perlu dilakukan optimasi hidrolisis hemiselulosa secara enzimatik.

- Milieudefensie, **Kelapa Sawit : Untung diatas rugi**,
http://www.kelapa-sawit.com/indonesia/pustaka/2005/04/08/05040801.html,
8 April 2005.
- Mulja, M.H. dan Suharman, 1995, **Analisis Instrumental**, Airlangga University Press, Surabaya.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 1986, **Dasar-dasar Mikrobiologi**, Jilid 1, UI-Press, Jakarta.
- Purwanto W., Sparringa R.A., **Pemanfaatan Tandan Kosong dan Batang Kelapa Sawit Sebagai Bahan Baku Pulp Kertas**,
http://www.kelapa-sawit.com/indonesia/j_saint_dan_teknologi/2005/02/0502050201.html, *J Saint dan Teknologi*, Vol 2 : 56-65, 2 Februari 2005.
- Puspaningsih, N.N.T., 2004, **Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08**, *Disertasi S3* Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, G., Bassov, T., Shoham, Y., 2002, **Detailed Kinetic Analysis and Identification of The Nukleophile in α -L-Arabinofuranosidase From *Geobacillus stearothermophilus* T6, a Family 51 Glycoside Hydrolase**, *J Biol Chem*, 227: 436667-43673.
- Sjostrom, E., 1995, **Kimia Kayu, Dasar-dasar dan penggunaannya** (diterjemahkan oleh Hardjono Sastrohamidjoyo), UGM Press, Yogyakarta.
- Subramaniyan, S., Prema, P., 2002, **Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology, Molecular Biology, and Application**, *Critical Rev Biotechnol*, 22: 33-64.
- W. Sri., Sahwan L Firman., Suryanto F., Waluyo A., **Pembuatan Kompos dari Tandan Kosong Kelapa Sawit**,
http://www.kelapa-sawit.com/indonesia/j_saint_dan_teknologi/2005/04/0504050401.html, *J Saint dan Teknologi*, Vol I : 375-386, 8 April 2005.
- Yaw Kuen Li., Hsian Jan Yao and I Hong Pan., 2000, **Mechanistic Study of β -Xylosidase from *Trichoderma koningii* G-39**, *J Biochem*, 127: 315-320.

Lampiran 1.



Gambar kelapa sawit

Lampiran 2.



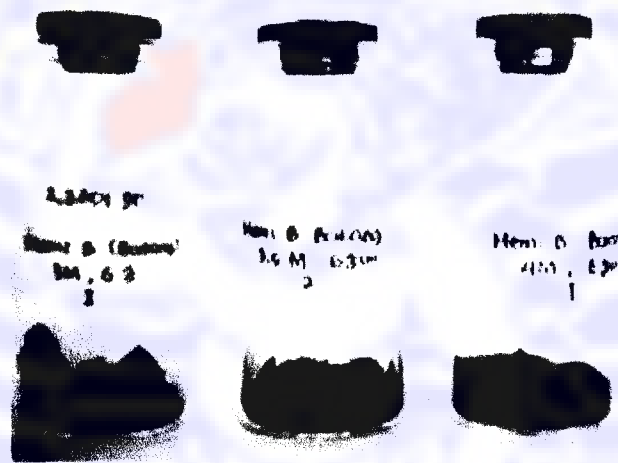
Gambar batang kelapa sawit

Lampiran 3.



Gambar hemiselulosa A

Lampiran 4.



Gambar hemiselulosa B

Lampiran 5. Pembuatan standar xilosa ($C_5H_{10}O_5$)

Stok xilosa = 10 mg/mL = 10000 μ g/mL

Standar xilosa

- Konsentrasi 10 μ g/mL

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 10 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,005 \text{ mL}$$

$$= 5 \mu\text{L}$$

5 μ L stok xilosa dicampur dengan 4995 μ L buffer PC

- Konsentrasi 20 μ g/mL

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 20 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,01 \text{ mL}$$

$$= 10 \mu\text{L}$$

10 μ L stok xilosa dicampur dengan 4990 μ L buffer PC

- Konsentrasi 40 μ g/mL

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 40 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,02 \text{ mL}$$

$$= 20 \mu\text{L}$$

20 μ L stok xilosa dicampur dengan 4980 μ L buffer PC

- Konsentrasi 50 μ g/mL

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 50 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,025 \text{ mL}$$

$$= 25 \mu\text{L}$$

25 μ L stok xilosa dicampur dengan 4975 μ L buffer PC

Lanjutan lampiran 5.

- Konsentrasi 80 $\mu\text{g/mL}$

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 80 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,04 \text{ mL}$$

$$= 40 \mu\text{L}$$

40 μL stok xilosa dicampur dengan 4960 μL buffer PC

- Konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$

$$10000 \mu\text{g/mL} \cdot x = 100 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$x = 0,05 \text{ mL}$$

$$= 50 \mu\text{L}$$

50 μL stok xilosa dicampur dengan 4950 μL buffer PC

Lampiran 6. Hasil pengukuran Absorbansi

Tabel Hasil pengukuran absorbansi *oat spelt-xylan* (pengenceran 4x)

Substrat	Absorbansi λ 550 nm	Kontrol
<i>Oat spelt-xylan</i>	0,424	0,345
	0,422	

Tabel Hasil pengukuran absorbansi standart xilosa

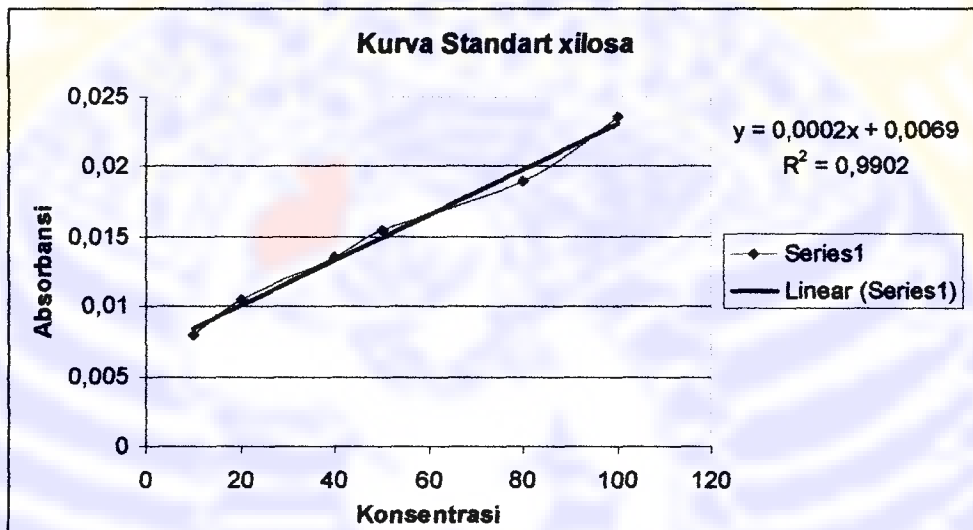
Standart xilosa (μg)	Absorbansi λ 550 nm		Rata-rata
10	0,009	0,007	0,008
20	0,010	0,011	0,0105
40	0,014	0,013	0,0135
50	0,016	0,015	0,0155
80	0,020	0,018	0,0190
100	0,024	0,023	0,0235

Lampiran 7. Perhitungan Aktivitas xilanolitik

- Berat Molekul xilosa ($C_5H_{10}O_5$) = 150
- Dari Grafik Kurva Standart didapatkan persamaan regresi yaitu :

$$y = 0,0002x + 0,0069$$

$$R^2 = 0,9902$$



- Rumus aktivitas xilanolitik = $\frac{(Ks - Kk) \times FP \times 1000}{t \times BM} \text{Unit/mL}$

Keterangan : Ks : Konsentrasi sampel

Kk : Konsentrasi kontrol

t : Waktu inkubasi

BM : Berat molekul

FP : Faktor Pengenceran

- Konsentrasi xilosa

Sampel I

$$\text{Absorbansi} = 0,424$$

Lanjutan lampiran 7.

$$y = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,424 = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,4171 = 0,0002x$$

$$x = 2085,5$$

$$\text{Konsentrasi xilosa} = 2085,5 \mu\text{g}$$

Sampel II

$$\text{Absorbansi} = 0,422$$

$$y = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,422 = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,4151 = 0,0002x$$

$$x = 2075,5$$

$$\text{Konsentrasi xilosa} = 2075,5 \mu\text{g}$$

$$\text{Rata-rata konsentrasi sampel} = 2080,5 \mu\text{g}$$

Kontrol

$$\text{Absorbansi} = 0,345$$

$$y = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,345 = 0,0002x + 0,0069$$

$$0,3381 = 0,0002x$$

$$x = 1690,5$$

$$\text{Konsentrasi xilosa} = 1690,5 \mu\text{g}$$

$$K_s - K_k = 2080,5 \mu\text{g} - 1690,5 \mu\text{g} = 390 \mu\text{g}$$

- $\text{Aktivitas xilanolitik} = \frac{390 \times 4 \times 1000}{60 \times 150} = 173,33 \text{Unit/mL}$

Lampiran 8. Kromatogram standart



Lampiran 9. Kromatogram hasil hidrolisis enzim



Hemiselulosa A

Lanjutan lampiran 9.



Hemiselulosa B

Lampiran 10. Kromatogram hasil hidrolisis kimia



Hemiselulosa A

Lanjutan lampiran 10.



Hemiselulosa B

Lampiran 11. Perhitungan persen hidrolisis

Konsentrasi standart 1000 ppm

Tabel Hasil hidrolisis hemi A

St	LA	Rt	Kimia			Enzim		
			Rt	LA	%	Rt	LA	%
Fruk	245950	1,34	-	-	-	-	-	-
Glu	314038	2,03	2,06	29637	4,72	2,07	26282	4,18
Xil	313088	3,23	3,24	35359	5,65	3,28	25365	4,05
Man	372248	4,14	-	-	-	-	-	-
Ara	296582	5,32	5,32	31728	5,35	5,35	38278	6,45
Oligo	247965	6,35	6,39	105286	21,23	6,34	116364	23,46

Tabel Hasil hidrolisis hemi B

St	LA	Rt	Kimia			Enzim		
			Rt	LA	%	Rt	LA	%
Fruk	245950	1,34	1,30	9940	2,02	-	-	-
Glu	314038	2,03	2,09	15245	2,43	2,02	9359	1,49
Xil	313088	3,23	3,30	127461	20,36	3,23	132066	21,09
Man	372248	4,14	-	-	-	-	-	-
Ara	296582	5,32	5,37	150171	25,32	5,34	249679	42,09
Oligo	247965	6,35	-	-	-	-	-	-

Lanjutan lampiran 11.

Keterangan :

Fruk : Fruktosa

Glu : Glukosa

Man : Mannosa

Xil : Xilosa

Ara : Arabinosa

Oligo : Xilooligosakarida

LA : Luas Area

Rt : Waktu Retensi

- Dari sampel hidrolisis diukur 10 μ L kemudian diencerkan sampai volume 5 mL. Sampel yang diinjeksikan ke alat 20 μ L.
- Konsentrasi sampel = $\frac{\text{Luasareasampel}}{\text{luasareastandar}} \times \text{konsentrasistandar}$
- % hidrolisis = faktor pengenceran x konsentrasi sampel
- Perhitungan persen hidrolisis hemiselulosa A

Hidrolisis Kimia

o Glukosa

$$\text{Konsentrasi glukosa} = \frac{29637}{314038} \times 1000 \text{ ppm} = 94,37 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ hidrolisis} = \frac{5 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times 94,37 \text{ ppm}$$

$$= 47185 \text{ ppm}$$

$$= 47185 \text{ mg/L}$$

Lanjutan lampiran 11.

$$= 4,7185 \text{ gr/100 mL}$$

$$= 4,72 \text{ %b/b}$$

○ Xilosa

$$\text{Konsentrasi xilosa} = \frac{35359}{313088} \times 1000 \text{ ppm} = 112,97 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ hidrolisis} = \frac{5 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times 112,97 \text{ ppm}$$

$$= 56485 \text{ ppm}$$

$$= 56485 \text{ mg/L}$$

$$= 5,65 \text{ gr/100 mL}$$

$$= 5,65 \text{ %b/b}$$

○ Arabinosa

$$\text{Konsentrasi Arabinosa} = \frac{31728}{296582} \times 1000 \text{ ppm} = 106,98 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ hidrolisis} = \frac{5 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times 106,98 \text{ ppm}$$

$$= 53489 \text{ ppm}$$

$$= 53489 \text{ mg/L}$$

$$= 5,35 \text{ gr/100 mL}$$

$$= 5,35 \text{ %b/b}$$

○ Xilooligosakarida

$$\text{Konsentrasi xilooligosakarida} = \frac{105286}{247965} \times 1000 \text{ ppm} = 424,6 \text{ ppm}$$

Lanjutan lampiran 11.

$$\begin{aligned} \% \text{ hidrolisis} &= \frac{5\text{mL}}{0,01\text{mL}} \times 424,6 \text{ ppm} \\ &= 212300 \text{ ppm} \\ &= 212300 \text{ mg/L} \\ &= 21,23 \text{ gr/100 mL} \\ &= 21,23 \% \text{ b/b} \end{aligned}$$

Hidrolisis Enzim

o Glukosa

$$\text{Konsentrasi glukosa} = \frac{26282}{314038} \times 1000 \text{ ppm} = 83,69 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ hidrolisis} &= \frac{5\text{mL}}{0,01\text{mL}} \times 83,69 \text{ ppm} \\ &= 41845 \text{ ppm} \\ &= 41845 \text{ mg/L} \\ &= 4,1845 \text{ gr/100 mL} \\ &= 4,18 \% \text{ b/b} \end{aligned}$$

o Xilosa

$$\text{Konsentrasi xilosa} = \frac{25365}{313088} \times 1000 \text{ ppm} = 81,02 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ hidrolisis} &= \frac{5\text{mL}}{0,01\text{mL}} \times 81,02 \text{ ppm} \\ &= 40507 \text{ ppm} \\ &= 40507 \text{ mg/L} \\ &= 4,05 \text{ gr/100 mL} \end{aligned}$$

Lanjutan lampiran 11.

$$= 1,49 \%b/b$$

o Xilosa

$$\text{Konsentrasi xilosa} = \frac{132066}{313088} \times 1000 \text{ ppm} = 421,82 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ hidrolisis} = \frac{5 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times 421,82 \text{ ppm}$$

$$= 210908 \text{ ppm}$$

$$= 210908 \text{ mg/L}$$

$$= 21,09 \text{ gr/100 mL}$$

$$= 21,09 \%b/b$$

o Arabinosa

$$\text{Konsentrasi arabinosa} = \frac{249679}{296582} \times 1000 \text{ ppm} = 841,85 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ hidrolisis} = \frac{5 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times 841,85 \text{ ppm}$$

$$= 420927 \text{ ppm}$$

$$= 420927 \text{ mg/L}$$

$$= 42,09 \text{ gr/100 mL}$$

$$= 42,09 \%b/b$$