

Ekstraksi Xilan dari Limbah Ampas Singkong dan Pemanfaatannya sebagai Substrat Endo-B-1,4-D-Xilanase

(Extraction Xylan of Cassava Bagasse and Utility as Substrat Endo-B-1,4-D-Xylanase)

Fita Kurnia Firdausa, Agung Budi Santoso, Wuryanti Handayani
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail: agungbsantoso@yahoo.com

Abstrak

Ampas singkong merupakan limbah hasil pembuatan tepung tapioka. Hemiselulosa merupakan komponen kimia pada ampas singkong, komponen utama hemiselulosa adalah xilan. Penelitian ini bertujuan mendapatkan xilan dari ampas singkong serta pemanfaatan xilan sebagai substrat endo-B-1,4-D-xilanase. Ampas singkong yang akan diekstraksi diukur terlebih dahulu kadar HCN, lignin, dan air. Ekstraksi xilan dari ampas singkong dengan DNS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ampas singkong yang digunakan pada penelitian ini memiliki kandungan HCN sebesar 16,10 ppm, kadar lignin sebesar 4,34% dan kadar air sebesar 7,45%. Ekstraksi xilan dengan NaOH 12% menghasilkan rendemen tertinggi yaitu 32,14% (delignifikasi) dan 52,36% (tanpa delignifikasi).

Kata Kunci: Ampas singkong, xilan, delignifikasi.

Abstract

GCassava bagasse is waste the result of the manufacture of starch. Content of cassava bagasse is hemicellulose, the main component of hemicellulose is xylan. The aim of this study to obtain xylan from cassava bagasse and utilization of xylan as a substrate endo-B-1,4-D-xilanase. Bagasse of cassava to be extracted beforehand measured content HCN, lignin, and water. Extraction of xylan from cassava bagasse do two variations of treatment that the delignification and non-delignification. In addition, the extraction of xylan to be optimized solvent concentration of NaOH is 4, 8, 12 and 16%. Xylan obtained from the extraction was analyzed qualitative by TLC method and analyzed quantitative by DNS method. The result of study showed that the cassava bagasse used in this study contains HCN, lignin, and water which accounted for 16,10 ppm; 4,34%; and 7,45%. Extraction of xylan with NaOH 12% to produce the highest yield is 32,14% (delignification) and 52,36% (non-delignification).

Keywords: cassava bagasse, xylan, delignification.

PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot Ulitissima*) merupakan bahan pangan yang banyak diproduksi di Indonesia. Singkong sangat potensial untuk diolah menjadi tepung. Pengolahan 1 ton singkong, menghasilkan ampas singkong sebanyak 0,1 ton [1]. Ditinjau dari segi komposisi kimianya, ampas singkong mengandung 1,57 g protein, 1,06 g lemak, 21,10 g serat dan 1,10 g abu [2]. Serat pada ampas yang berlignoselulosa mengandung selulosa (36,6%), hemiselulosa (21,3%), dan lignin (17,3%) [3].

Hemiselulosa pada ampas singkong adalah komponen terbesar kedua setelah selulosa. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang tersusun atas satuan-satuan gula pentosa dan heksosa. Komponen utama dari hemiselulosa adalah xilan. Selain terdapat pada ampas singkong, xilan juga ditemukan pada limbah-limbah pertanian seperti dedakong dilakukan dua variasi perlakuan yaitu dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi. Selain itu, pada ekstraksi xilan dilakukan optimasi konsentrasi pelarut NaOH yaitu 4, 8, 12, dan 16 (%). Xilan yang diperoleh dari hasil ekstraksi dianalisa secara kualitatif dengan metode KLT dan dianalisa secara kuantitatif dengan dengan m gandum, bagas tebu, dan sekam padi [4]. Xilan merupakan

polimer pentosa atau xilosa dengan ikatan B-1,4 yang jumlah monomernya berkisar antara 150-200 unit [5]. Xilan mempunyai banyak manfaat sebagai bahan baku industri, diantaranya sebagai *thickening agen* (pengental), dan bahan baku pembuatan film. Selain itu, xilan juga dimanfaatkan sebagai substrat endo-B-1,4-D-xilanase. Endo-B-1,4-D-xilanase menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa [6]. Xilooligosakarida sangat bermanfaat bagi kesehatan yaitu merangsang pertumbuhan bifidobakteri di usus manusia sehingga xilooligosakarida dipertimbangkan sebagai prebiotik [7].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan xilan optimum pada ekstraksi, serta untuk mengetahui aplikasi xilan dari ampas singkong sebagai substrat untuk endo-B-1,4-D-xilanase.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Laboratorium CDAST (*Center of Development for Advances Science and Technology*), serta Laboratorium Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ampas singkong, NaOH, HCl, etanol, xilosa, asam asetat, butanol, asam sulfat.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer, autoclave, oven, pH meter, *ependorf* dan peralatan gelas.

a. Preparasi Sampel

Singkong dikupas kulitnya dan dicuci dengan air bersih, kemudian singkong diparut. Hasil parutan dicuci berulang dengan air mengalir dan diperas sampai patinya terpisah dari ampas. Kemudian ampas dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 65⁰C. Setelah kering, ampas digiling menggunakan mesin penggiling sehingga ampas yang diperoleh berbentuk tepung. Ampas yang sudah digiling kemudian dikukus selama 30 menit. Setelah dikukus kemudian dikeringkan dihu ruang.

b. Analisa Kandungan Air, HCN dan Lignin

- Penentuan Kadar Air

Sebanyak 2 gram sampel ditempatkan pada cawan petri dan dipanaskan ke dalam oven pada suhu 105⁰C selama 4 jam. Kemudian cawan petri yang berisi sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Cawan petri dan sampel dipanaskan kembali pada suhu 105⁰C selama 1 jam. Cawan petri dan sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan tersebut dilakukan berulang-ulang hingga berat sampel konstan [8]. Presentase kadar air dihitung dengan menggunakan rumus 3.1.

$$\infty \text{ kadar air} = \frac{a-b}{b} \times 100$$

- Penentuan Kadar Asam Sianida (HCN)

Pengukuran kadar HCN dilakukan dengan cara kertas pikrat direndam ke dalam sampel yang telah ditambahkan 5 mL akuades selama 30 menit. Kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Larutan blanko yang digunakan yakni asam pikrat direndam ke akuades tanpa sampel. Kadar HCN total dihitung sebagai berikut:

$$HCN \text{ total} = 396 \times \text{absorbansi}$$

- Penentuan Kadar Lignin pada Ampas Singkong

Sebanyak 1 gram sampel ditempatkan pada beaker gelas 100 mL dan ditambahkan 15 mL asam sulfat 72% (v/v). Campuran larutan didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Larutan dituang ke dalam tabung Erlenmeyer 1L dan ditambah dengan 560 mL akuades. Larutan diautoclave selama 2 jam dan endapan yang terbentuk disaring. Selanjutnya, endapan dikeringkan pada suhu 40 °C sampai berat konstan dan ditimbang. Presentase kadar lignin dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\infty \text{ lignin} = \frac{\text{berat endapan yang terbentuk}}{\text{berat sampel awal}} \times 100$$

c. Delignifikasi dan Ekstraksi Xilan

- Delignifikasi

5 gr sampel direndam dengan larutan NaOCl 0,5% pada suhu 28⁰C selama 5 jam. Kemudian dibilas dengan akuades dan disaring. Padatan yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi xilan

- Ekstraksi Xilan

Padatan yang dihasilkan direndam dalam larutan NaOH dengan variasi konsentrasi 4, 8, 12, 16, dan 18% (b/v) selama 24 jam pada suhu 28⁰C, kemudian disaring.

Supernatan yang dihasilkan diukur pH-nya menggunakan pH meter. Kemudian supernatan dinetralkan dengan menambahkan tetes demi tetes HCl 6 N sampai pH netral (pH = 7) dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi dipisahkan dengan cara dekantasi. Kemudian supernatan ditambahkan etanol 95% dengan perbandingan 1:3 (supernatan : etanol) dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40⁰C sampai beratnya konstan. Berat xilan dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen xilan} \infty = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100 \infty$$

d. Hidrolisis Xilan dengan Enzim Endo-B-1,4-D-xilanase

Sebanyak 125 μ L enzim endoxilanase ditambahkan dengan 125 μ L substrat (0,5% b/v) xilan dari ampas singkong dalam buffer fosfat-sitrat pH 5. Kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada 40⁰C selama 5 jam. Produk hidrolisis dianalisis dengan metode DNS dan KLT.

- Analisis Total Gula Pereduksi

Produk hidrolisis yang dihasilkan pada tiap-tiap waktu inkubasi, selanjutnya ditambahkan masing-masing 600 μ L larutan DNS dan dipanaskan pada suhu 100⁰C dalam *waterbath* selama 15 menit. Setelah dipanaskan, larutan didinginkan dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm.

- Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebanyak 8 μ L (pada masing-masing waktu inkubasi) ditotolkan pada plat silika yang sudah diberi tanda nomor pada tempat penotolannya. Eluen yang digunakan adalah 1-butanol: asetat: akuades (2:1:1, v/v/v). Plat silika dimasukkan ke dalam chamber yang diisi dengan eluen. Elusi dilakukan hingga 1,5 cm di bawah tepi atas plat silika. Plat diambil dan dikeringkan selama 30 menit. Spot yang dihasilkan divisualisasikan dengan menyemprotkan larutan naftal dan H₂SO₄ dalam etanol kemudian dioven pada suhu 100⁰C selama 5 menit [9].

HASIL PENELITIAN

a. Kandungan HCN, Air, dan Lignin

Xilan yang diekstrak pada penelitian berasal dari ampas singkong. Ampas singkong yang digunakan diperoleh dari limbah pembuatan tepung tapioka yang diproses sendiri oleh peneliti dengan mengacu pada proses pembuatan tepung tapioka seperti pada industri. Namun pada penelitian ini, ampas singkong dicuci berulang-ulang dengan air bersih sampai pati benar-benar berkurang. Hal ini dilakukan karena apabila pada ampas masih terdapat pati maka hal ini akan mengganggu proses ekstraksi. Pada proses pencucian berulang-ulang, tidak hanya pati yang akan berkurang pada ampas tetapi juga kandungan asam sianida juga ikut berkurang. Hal ini karena berdasarkan sifat kelarutan asam sianida yaitu mudah larut dalam air.

Sebelum dilakukan ekstraksi, ampas singkong ditentukan kadar air, HCN, dan lignin. Kadar HCN, air, dan lignin pada ampas singkong dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan kimia ampas singkong

Komposisi	Kandungan
HCN (ppm)	16,10 ± 0,60
Air (%)	7,45 ± 0,19
Lignin (%)	4,34 ± 0,57

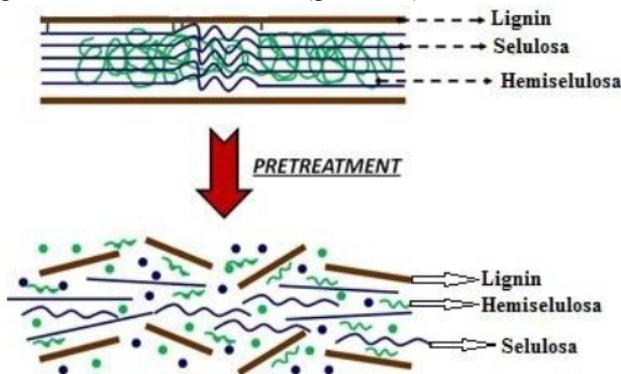
Asam sianida merupakan senyawa kimia yang bersifat toksik. Batas aman konsumsi HCN yang diperbolehkan oleh FAO adalah kurang dari 50 ppm. Hal ini yang menjadi landasan dilakukan pengukuran HCN pada ampas singkong. Apabila pada pengukuran awal kandungan HCN masih tinggi maka perlu dilakukan pengurangan kandungan HCN. Namun pada penelitian ini diperoleh kandungan HCN sebesar 16,10 ppm. Kandungan tersebut sudah berada dibawah batas aman sehingga tidak perlu dilakukan pengurangan HCN.

Kadar air adalah perbedaan antara berat bahan sebelum dan sesudah dilakukan pemanasan. Pada penelitian ini, penentuan kadar air menggunakan metode gravimetri yaitu dengan menguapkan air yang ada dalam ampas singkong dengan jalan pemanasan menggunakan oven pada suhu 105°C kemudian menimbang ampas singkong sampai berat konstan. Pada tabel 1 diperoleh kadar air sebesar 7,45%.

Kadar lignin pada ampas singkong ditentukan dengan metode Klason (lignin tidak larut asam). Metode ini didasarkan pada hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menggunakan asam sulfat 72%, kemudian dilanjutkan hidrolisis dengan asam sulfat 3% pada pemanasan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm³ selama 30 menit. Lignin yang diperoleh merupakan komponen yang tidak larut dan ditentukan secara gravimetri. Kadar lignin yang diperoleh sebesar 4,34%. Hal yang mendasari dilakukannya pengukuran kadar lignin adalah untuk mengetahui berapa konsentrasi NaOCl yang akan ditambahkan pada proses delignifikasi.

b. Rendemen Xilan

Sampel yang digunakan untuk ekstraksi xilan yaitu sampel yang sudah dikukus. Tujuan utama pengukusan adalah untuk membuka dan memecah struktur lignoselulosa agar xilan mudah diekstraksi (gambar 2).



Gambar 1. Pemecahan struktur lignoselulosa

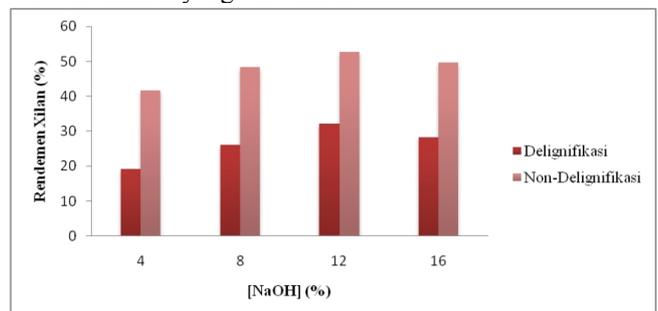
Delignifikasi merupakan penghilangan lignin dari limbah lignoselulosa untuk mempermudah enzim

menghidrolisis xilan yang diperoleh dari ekstraksi. Penelitian yang dilakukan, terdapat dua variasi perlakuan pada sampel yaitu delignifikasi dan tanpa delignifikasi. Pelarut yang digunakan pada proses delignifikasi adalah NaOCl 0,5%. NaOCl berfungsi melarutkan senyawa lignin dengan cara mendegradasi rantai panjang menjadi rantai-rantai yang kecil. Ion hipoklorit (ClO⁻) yang memiliki muatan negatif bertindak sebagai nukleofil menyerang atom karbon yang lebih elektropositif. Reaksi antara lignin dan ion hipoklorit menyebabkan lignin terfragmentasi dengan berat molekul rendah sehingga larut dalam pelarut NaOCl [10]

Ampas singkong yang sudah direndam dalam NaOCl kemudian disaring dengan kertas saring. Padatan yang diperoleh akan digunakan pada tahap selanjutnya yaitu ekstraksi xilan dengan NaOH. Padatan yang diperoleh dari proses didelignifikasi kemudian diekstraksi menggunakan pelarut NaOH pada berbagai variasi konsentrasi (4%, 8%, 12%, dan 16% (b/v)) selama 24 jam. Hemiselulosa pada ampas singkong akan larut dalam larutan NaOH sedangkan selulosa strukturnya akan rusak sehingga akan mengalami pengembangan (*swelling*) sehingga tidak akan larut dalam larutan NaOH. Namun, ada sebagian selulosa yang mungkin terlarut dalam larutan NaOH.

Larutan sampel hasil ekstraksi dengan NaOH kemudian dinetralkan dengan larutan HCl 6M sampai pH larutan netral. Saat penambahan HCl 6M terbentuk endapan yang diduga selulosa. Selulosa yang mengendap dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan ditambah etanol 95% dengan tujuan mengendapkan xilan. Endapan xilan yang terbentuk dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi. Endapan yang diperoleh dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C sampai berat konstan.

Profil xilan pada ampas singkong dengan perlakuan delignifikasi maupun non-delignifikasi memiliki *tren* yang sama pada setiap konsentrasi NaOH (Gambar 3). Konsentrasi NaOH yang digunakan semakin besar maka semakin besar pula rendemen xilan yang dihasilkan pada proses ekstraksi. Rendemen xilan naik pada konsentrasi NaOH 4% sampai 12% dan mengalami penurunan pada konsentrasi NaOH 16%. Hal ini disebabkan karena pelarut mendegradasi xilan yang menyebabkan menurunnya rendemen xilan yang dihasilkan.



Gambar 2. Rendemen xilan dari ampas singkong

Rendemen xilan tertinggi pada sampel delignifikasi yaitu 32,14% dan pada non-delignifikasi 52,36%. Sampel non-delignifikasi menghasilkan rendemen lebih tinggi daripada sampel delignifikasi. Hal ini diduga karena adanya

lignin maupun zat-zat lain (pengotor) yang ikut larut dalam larutan NaOH.

c. Produk Hidrolisis Xilan dari Ampas Singkong dengan Endo- β -1,4-D-Xilanase

Endo- β -1,4-D-xilanase merupakan enzim yang bekerja secara spesifik terhadap substrat xilan. Endo- β -1,4-D-xilanase menghidrolisis ikatan glikosida pada bagian dalam struktur menjadi xilooligosakarida dan xilosa sebagai hasil samping. Adanya xilooligosakarida (XO) sebagai produk hidrolisis menunjukkan bahwa xilan berhasil diekstraksi dari ampas singkong. Proses hidrolisis dilakukan dengan menginkubasi substrat xilan dari ampas singkong dengan endo- β -1,4-D-xilanase. Adapun konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5% (b/v) pada suhu 40°C dan pH 5. Waktu inkubasi 5 jam.



X1 ks ki D ks ki ND

Gambar 3. Kromatogram KLT produk hidrolisis

Hasil hidrolisis dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisa secara kualitatif dengan metode KLT yang bertujuan untuk melihat kemampuan enzim dalam menghidrolisis xilan dalam campuran sampel dan produk hidrolisis yang dihasilkan. Analisis didasarkan pada warna noda yang terbentuk pada titik penotolan dan juga munculnya spot baru pada kromatogram (gambar 3). Eluen yang digunakan adalah campuran dari larutan 1-butanol/H₂O/asam asetat dengan perbandingan 2:1:1 (v/v/v). Jumlah produk hidrolisis pada tiap-tiap waktu inkubasi yang ditotolkan pada plat KLT adalah sama yaitu 8 mL.

Analisis secara kuantitatif dengan menghitung total gula pereduksi menggunakan metode DNS. Total gula pereduksi merupakan jumlah keseluruhan gula pereduksi yang dihasilkan selama proses hidrolisis. Total gula pereduksi yang dihasilkan pada produk hidrolisis sebesar 1,931 mg/mL.

KESIMPULAN DAN SARAN

Terdapat 2 sampel xilan yang dihasilkan dari proses ekstraksi yaitu xilan dari ampas singkong yang telah didelignifikasi dan xilan dari ampas singkong tanpa delignifikasi. Konsentrasi NaOH 12% menghasilkan rendemen xilan paling tinggi pada sampel delignifikasi dan non-delignifikasi yaitu sebesar 32,14% dan 52,36%. Rendemen xilan pada sampel non-delignifikasi lebih tinggi

dari pada sampel delignifikasi karena lignin pada sampel ikut terekstrak.

Xilan dari ampas singkong dapat digunakan sebagai substrat enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang ditunjukkan dengan dihasilkannya produk hidrolisis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. A.A Istri Ratnadewi S.Si., M.si dan I Nyoman Adi Winata S.Si., M.Si Atas masukan dan saran dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Naufalina, R. & Condro W. 2004. "Pemanfaatan Hasil Samping Pengolahan Tepung Tapioka Untuk Pembuatan Nata *De Cassava*". *Teknologi Dan Industri Pangan*. Vol XV:153
- [2] Pandey, A., Carlos R.S., Poonam, N., Vanete, T. S., Luciana, P.S., Vandenberghe., & Radjiskumar, M.2000. "Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse". *Bioresource Technology*. 74: 82-84
- [3] Amenaghawon, N. A., Samuel, E.O., & Charity, O.O. 2014. "Application of Statistical Experimental Design for the Optimisation of Dilute Sulphuric Acid Hydrolysis of Cassava Bagasse". *Acta Polytechnica Hungarica*. 11: 242-243
- [4] Richana, N., Pia, L., & Tun T. 2004. "Karakterisasi Lignoselulosa Dari Limbah Tanaman Pangan Dan Pemanfaatannya Untuk Pertumbuhan Bakteri RXA III-5Penghasil Xilanase". *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan Vol. 23 No.3 2004*.
- [5] Richana, N., Tun T.I., M. Anwar Nur., Illah S., Khaswar S & Yandra A. 2007. "Ekstraksi Xilan Dari Tongkol Jagung". *Pascapanen*. 4: 38-37.
- [6] Jiang, Z. Q., Deng, W., Zhu, Y. P., Sheng, Y.J., & Hayashi, K. 2004. "The Recombinant Xylanase B of *Thermotoga maritima* is Highly Xylan Specific 46 and Produces exclusively Xylobiose from Xylans, a Unique Character for Industrial Applications". *J. Mol Catal B Enzym*, 27: 13-207.
- [7] Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., & Puspaningsih, N. N. T. 2007. "Produksi dan Karakterisasi, Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap". *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(2): 110-117.
- [8] Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., & Sporns, P. 2005. *Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrate*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- [9] Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., & Puspaningsih, N. N. T. 2007. "Produksi dan Karakterisasi, Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap". *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(2): 110-117.
- [10] Sjostrom, E. 1981. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*. New York: Academic Press.