

# Isolasi Xilan dari Kulit Singkong dan Uji Reaktivitasnya Terhadap Enzim Endo – $\beta$ - 1,4 Xilanase

Okky Santi. S, A. A. Istri Ratnadewi\*, Wuryanti Handayani, Agung B. Santoso

Jurusan Kimia; Fakultas MIPA; Universitas Jember

\*Email: [dewi\\_pjw2003@yahoo.com](mailto:dewi_pjw2003@yahoo.com)

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengisolasi xilan dari kulit singkong dan menguji aktivitas enzim endo –  $\beta$ - 1,4 xilanase terhadap xilan dari kulit singkong. Perlakuan pertama, kulit singkong dikurangi terlebih dahulu kandungan HCN dengan cara perendaman, pengukusan, dan penjemuran. Hasil penelitian menunjukkan kandungan kulit singkong berkurang menjadi 23,36 ppm. Kemudian sampel yang telah dihaluskan, dilakukan variasi perlakuan yakni delignifikasi dan tanpa delignifikasi menggunakan larutan NaOCl 0,5%. Kemudian diekstraksi dengan variasi larutan NaOH yaitu 4%, 8%, dan 12%. Rendemen xilan dengan delignifikasi secara berturut – turut sebesar 9,8%, 11,5% dan 4,3%. Rendemen xilan tanpa delignifikasi secara berturut – turut sebesar 19,6%, 16,6%, dan 3,5%. Kemudian dihidrolisis dengan enzim endo –  $\beta$ - 1,4 xilanase. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 40°C dan diinkubasi selama 16 jam. Hasil hidrolisis ditentukan konsentrasi gula reduksi total. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi gula reduksi total pada xilan dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi secara berturut – turut sebesar 0,277mg/ml dan 0,485 mg/ml, sehingga xilan kulit singkong berpotensi sebagai substrat enzim endo –  $\beta$ - 1,4.

**Kata Kunci** : delignifikasi, ekstraksi, kulit singkong, xilan, xilanase

## PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) merupakan salah satu sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menduduki urutan ketiga terbesar setelah padi dan jagung (Prabawati, 2011). Singkong merupakan tanaman perdu yang berasal dari benua Amerika, tepatnya dari negara Brasil. Produktivitas singkong di Indonesia sebesar 22.677.866 ton, sedangkan di Jawa Timur produktivitas singkong mencapai 5 juta ton (Badan Pusat Statistika, 2012). Setiap bobot singkong akan menghasilkan kulit singkong sebesar 16% dari bobot tersebut (Hidayat, 2009), sehingga apabila dihitung kulit singkong di Jawa Timur pada tahun 2012 mencapai 800.000 ton. *Total Digestible Nutrient* (TDN) dan *nutrient* dalam kulit singkong yaitu TDN 74,73%, protein 8,11%, serat kasar 15,20%, hemiselulosa 2,48%, lemak kasar 1,29%, kalsium 0,63, dan fosfor 0,22% (Adriani *et al.*, 2012).

Hemiselulosa merupakan polisakarida terbanyak kedua di alam setelah selulosa. Komponen utama hemiselulosa adalah xilan (Da Silva *et al.*, 2007). Xilan merupakan hemiselulosa yang merupakan polimer dari pentose dengan ikatan  $\beta$ -1,4 yang jumlah monomernya berkisar 150- 200 unit (Sunna & Antranikian, 1997; Richana *et al.*, 2007). Komponen xilan juga ditemukan pada limbah–limbah pertanian seperti dedak gandum (12,3%), bagas tebu (9,6%) dan sekam padi (12,1%) (Richana *et al.*, 2004). Xilan merupakan substrat dari enzim xilanase (Collins *et al.*, 2005). Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa yakni xilan. Jenis – jenis xilanase yaitu endoxilanase, eksoxilanase, dan  $\beta$ -xilidase (Richana, 2002). Xilanase ditemukan

di tanaman, bakteri, dan jamur dengan berat molekul berkisar 16 – 40 kDa. Xilanase dihasilkan dari jamur *Aspergillus* dan *Trichoderma*, sedangkan dari bakteri yaitu bakteri *Bacillus* dan *Clostridium* (Trismillah & Waltam, 2009). Enzim ini dapat menghidrolisis ikatan glikosida dengan posisi  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 secara acak pada rantai utama xilan untuk menghasilkan xilooligosakarida (Richana *et al.*, 2002). Xilanase selama memproduksi xilo-oligosakarida juga memproduksi xilosa sebagai produk samping (Jiang *et al.*, 2004).

Ekstraksi xilan telah dilakukan oleh Richana *et al.*, (2007) dengan modifikasi metode dari Yoshida *et al.*, (1994). Richana berhasil mengekstraksi xilan dari limbah pertanian yaitu limbah tongkol jagung. Xilan yang didapat diuji dengan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kadar xilan yang diperoleh sebesar 12,95%. Ekstraksi xilan dari tongkol jagung juga dilakukan oleh Anggraeni (2003). Anggraeni (2003) melakukan variasi metode ekstraksi yakni menggunakan metode ekstraksi netralisasi dan asidifikasi. Xilan yang memiliki kemurnian lebih tinggi dihasilkan dari metode ekstraksi asidifikasi dengan menggunakan uji kualitatif  $ZnCl_2$  dan  $I_2$ . Tujuan penelitian ini adalah mengekstraksi xilan dari kulit singkong dan mengetahui reaktivitasnya terhadap enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Kulit singkong, xilosa (Japan), NaOH (E – Merck), Etanol (E-Merck), HCl (E- Merck), Asam sitrat (E-Merck),  $Na_2HPO_4$  (E- Merck),  $KNaTartrat$  (E- Merck), Asam 3,5-dinitrosalisilat (E-Merck), Fenol (E – Merck),

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (E- Merck), Asam pikrat (E – Merck), Natrium Karbonat (E- Merck).

### **Pengurangan Asam Sianida (HCN) pada Kulit Singkong**

Pengurangan asam sianida pada kulit singkong mengikuti metode yang dilakukan oleh Nebiyu & Getachew (2011); Purwanti (2005) dan Tewe, (1984). Kulit singkong yang sudah dipotong kecil – kecil, dibersihkan dengan air. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah pengurangan kandungan HCN. Kulit singkong direndam dengan air selama 3 -5 hari. Setelah perendaman, kulit singkong dimasukkan ke dalam air yang mendidih selama 25 menit. Kemudian kulit singkong dikeringkan dengan oven sampai berat konstan. Kulit singkong yang sudah kering, ditentukan kadar HCN (Nebiyu & Getachew, 2011 ; Purwanti, 2005 ;Tewe, 1984).

Pengukuran kadar HCN dilakukan dengan cara kertas pikrat direndam ke dalam 500 mg sampel yang telah ditambahkan 1 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 HCN total (ppm) = 396 x absorbansi (Nebiyu & Getachew, 2011).

### **Delignifikasi dan Ekstraksi Xilan dari Kulit Singkong**

Delignifikasi dan Ekstraksi Xilan dari Kulit Singkong mengikuti metode yang dilaporkan oleh Anggraini, (2003); Richana *et al.*, (2007); Samanta *et al.*, (2013). Pada penelitian ini, melakukan dua variasi yakni ekstraksi xilan dengan delignifikasi (penghilangan lignin) dan tanpa delignifikasi. Langkah yang pertama, kulit singkong dihaluskan. Bubuk kulit singkong direndam dengan larutan NaOCl 0,5% pada suhu 28<sup>o</sup>C selama 5 jam. Kemudian dibilas dengan akuades dan disaring. Padatan dikeringkan di oven dengan suhu 50<sup>o</sup>C sampai berat konstan.

Sampel yang telah didelignifikasi dan tanpa didelignifikasi direndam dalam larutan NaOH 4%, 8%, dan 12% selama 24 jam pada suhu 28<sup>o</sup>C dan kemudian disentrifus. Supernatant yang dihasilkan diukur pH-nya. Kemudian supernatant dinetralkan dengan menambahkan tetes demi tetes HCl 6 N dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi dipisahkan dengan cara dekantasi. Kemudian supernatant ditambahkan etanol 95% dengan perbandingan 1:3 (supernatant : etanol) dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 65<sup>o</sup>C.

$$\% EX = (W_a \times 100) / W_t$$

Di mana:

EX : Ekstrak Xilan

W<sub>a</sub> : berat kering xilan yang diekstraksi (g)

W<sub>t</sub> : berat sampel (g)

### **Penentuan Total Gula Pereduksi**

Substrat (xilan) sebanyak 0,1 gram dilarutkan ke dalam 10 mL buffer fosfat sitrat pH 5. Larutan substrat 1% (b/v) diambil sebanyak 125 µl ditambahkan enzim endo-β-1,4-xilanase sebanyak 125 µl. Campuran enzim dan substrat diinkubasi selama 16 jam pada suhu 40<sup>o</sup>C. Selanjutnya campuran enzim dan substrat ditambahkan larutan DNS sebanyak 750 µl. Kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C dalam *water bath* selama 15 menit dan didinginkan dalam es selama 20 menit. Warna yang timbul diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Absorbansi yang dihasilkan dimasukkan ke dalam persamaan regresi kurva standar xilosa untuk mengetahui total gula reduksinya (Miller, 1959; Ratnadewi *et al.*, 2007):.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Pengurangan Kandungan Sianida (HCN)**

Pada penelitian ini, langkah pertama yang dilakukan sebelum ekstraksi adalah mengurangi kandungan asam sianida (HCN). Pengurangan kandungan sianida dilakukan dengan cara perendaman dengan air (3 - 5 hari), perebusan dan pengeringan. Pemotongan kulit singkong menjadi ukuran yang lebih kecil juga mempercepat proses penguapan dan mempercepat pengurangan kandungan sianida pada kulit singkong.

Proses perendaman, dapat menghilangkan 20% sianida bebas setelah 4 jam, meskipun ikatan sianida belum berarti berkurang. Perebusan dapat menghilangkan 90% sianida bebas dengan merusak enzim linamarase pada suhu 72<sup>o</sup>C. Pada hari ke -3 kandungan HCN mengalami penurunan yang signifikan yakni 96,23 ppm dan 67,71 ppm. Pada hari ke -5, kandungan HCN menjadi 23,6 ppm. Menurut FAO, singkong dengan kandungan HCN 50 ppm masih aman dikonsumsi manusia.

### **Delignifikasi dan Ekstraksi Xilan**

Pada penelitian ini dilakukan dua variasi yaitu ekstraksi xilan dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi. Delignifikasi adalah proses penghilangan lignin dimana terjadi pemecahan ikatan kovalen antara lignin dengan karbohidrat melalui pelarutan lignin (Anggraeni, 2003). Proses delignifikasi menggunakan pelarut NaOCl 0,5%. Pelarut NaOCl 0,5% menunjukkan rendemen tertinggi dan hanya sebagian kecil hemiselulosa yang terlarut (Richana *et al.*,2007). Setelah didelignifikasi selama 5 jam, rendaman dicuci dengan air dan dipisahkan. Padatan dioven pada suhu 50<sup>o</sup>C sampai berat konstan.

Ekstraksi xilan dilakukan menggunakan larutan NaOH 4%, 8%, dan 12%. Sampel dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi direndam dalam larutan NaOH 4%, 8%, dan 12% selama 24 jam. Hemiselulosa larut dalam larutan alkali, sedangkan selulosa mengendap dalam kondisi alkali. Supernatant dinetralkan dengan menambahkan HCl, kemudian disentrifus. Supernatant yang dihasilkan ditambahkan etanol 95%

dengan perbandingan 1:3. Penambahan etanol bertujuan untuk mengendapkan xilan.

Terdapat dua variasi yaitu variasi pada delignifikasi dan variasi konsentrasi NaOH. Berdasarkan tabel di atas pada sampel dengan delignifikasi randemen terbesar pada konsentrasi NaOH 8% yakni 11,6%. Pada sampel tanpa delignifikasi randemen terbesar pada konsentrasi NaOH 4% yaitu 19,6%. Hal ini disebabkan sampel tanpa delignifikasi masih mengandung lignin yang ikut terekstrak sehingga nilai randemennya besar.

### Penentuan Total Gula Reduksi

Setelah diperoleh ekstrak xilan, dilakukan analisis xilan dengan menentankan total gula reduksi. Enzim endo- $\beta$ -1,4-xilanase ditambahkan substrat xilan yang didapat diinkubasi selama 16 jam pada suhu 40°C (optimum). Total gula reduksi merupakan keseluruhan produk gula reduksi yang dihasilkan dalam proses hidrolisis. Gula reduksi merupakan senyawaan gula yang memiliki gugus aldehid sebagai gugus pereduksi. Semakin banyak gula reduksi yang dihasilkan maka aktivitas enzim semakin besar. Sampel yang telah dihidrolisis ditambahkan DNS.

**Tabel 1.** Kandungan sianida (HCN) pada kulit singkong

Lama Penyimpanan (hari)	Perendaman (ppm)	Perebusan (ppm)
1	171,46	138,2
2	131,47	123,95
3	96,23	67,71
4	87,52	41,97
5	71,68	23,6

**Tabel 2.** Randemen Xilan dengan variasi konsentrasi NaOH

Konsentrasi NaOH (%)	Dengan Delignifikasi (%)	Tanpa Delignifikasi (%)
4	9,8	19,6
8	11,5	16,6
12	4,3	3,5
14	4	3,3

Gula reduksi (misal xilosa) yang terbentuk akan bereaksi dengan DNS yang berwarna kuning dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (ANS) yang berwarna coklat. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi gula reduksi total pada xilan dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi secara berturut – turut sebesar 0,277mg/ml dan 0,485 mg/ml.

### KESIMPULAN

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah sampel dengan delignifikasi randemen terbesar pada konsentrasi NaOH 8% yakni 11,6%. Pada sampel tanpa delignifikasi randemen terbesar pada konsentrasi NaOH 4% yaitu 19,6%. Konsentrasi gula reduksi total pada xilan dengan delignifikasi dan tanpa delignifikasi secara berturut – turut sebesar 0,277mg/ml dan 0,485 mg/ml. Sehingga xilan dari kedua sampel dapat digunakan sebagai substrat enzim endo- $\beta$ -1,4-xilanase.

### DAFTAR PUSTAKA

Adriani, Y., Sukaya, S., Ratu, S., & Abun, A. 2012. The Quality of Fermented Cassava Tuber Skin as

Herbivorous Fish Feed. *Lucrari Stiintifice – Seria Zootehnie*, Vol.57.

Anggraini, F. 2003. “Kajian Ekstraksi dan Hidrolisis Xilan dari Tongkol Jagung (*Zea mays L.*)”. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanase. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 29(1): 3-23.

Da Silva, A. E., Marcelino, H.R., Gomes, M.C.S., Oliveira, E.E., Nagashima, T., & Egito, E.S.T. 2007. Xylan, A Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use. *Products and Application Of Biopolymers*.

Hidayat, C. 2009. *Peluang Penggunaan Kulit Singkong Sebagai Pakan Unggas*. Bogor : Balai Penelitian Ternak.

Nebiyu, A., & Esubalew G. 2011. Soaking and Drying of Cassava Roots Reduced Cyanogenic Potential of Three Cassava Varieties at Jimma, Southwest Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences* 7(4): 439 – 443.

Prabawati, S. 2011. *Inovasi Pengolahan Singkong Meningkatkan Pendapatan dan Diversifikasi Pangan*. Bogor : Sinar Tani.

- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., & Puspaningsih, N. N. T. 2007. Produksi dan Karakterisasi, Enzim  $\beta$ -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap. *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(2): 110-117.
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio*, 5(1): 29-36.
- Richana, N., Irawadi, T. T., Nur, M. A., Sailah, I., Syamsu, K., & Arkenan, Y. 2007. Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung. *Jurnal Pascapanen*, 4(1): 38-43.
- Samanta, A. K., Jayanta N., Kolte A. K., Senani, S., Sridhar, M., Mishra, S., Prasad, C. S., & Suresh K. P. 2013. Application of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) Stalks as Raw Material for Xylooligosaccharides Production. *Applied Biochemical Biotechnology*, 169: 2392-2404.
- Sunna, A dan G. Antranikian. 1997. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1): 39-67.
- Tewe, O. 1984. Detoxification of Cassava Products and Effects of Residual Toxins on Consuming Animals. *Roots, Tubers, Plantians and Bananas in Animal Feeding*.
- Trismilah., & Waltam, R. D. 2009. Produksi Xilanase Menggunakan Media Limbah Pertanian dan Perkebunan. *J. Tek. Ling Vol. 10 No.2 Hal. 137 – 144*.
- Yoshida, S., Satoh, T., Shimokawa, S., Oku, T., Ito, T., & Kusakabe, I. 1994. Substrate Specificity of *Strepyomyces  $\beta$ -Xylanase* toward Glucoxylan. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 58(6): 1041-1044.