



**EKSTRAKSI DAN UJI REAKTIVITAS XILAN DARI
KULIT SINGKONG SEBAGAI SUBSTRAT
ENZIM ENDO -1,4-D- XILANASE**

SKRIPSI

Oleh

Okky Santi Sandriani

NIM 111810301028

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2016



**EKSTRAKSI DAN UJI REAKTIVITAS XILAN DARI
KULIT SINGKONG SEBAGAI SUBSTRAT
ENDO- -1,4-XILANASE**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)
dan mencapai gelar sarjana sains

Oleh
Okky Santi Sandriani
NIM 111810301028

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ayahanda Suwono dan Ibunda Supami serta semua keluarga, terima kasih atas doa, kasih sayang, motivasi dan perhatian yang selalu diberikan;
2. Guru-guru di TK PKK Bulusari Pasuruan, SDN 1 Bulusari Pasuruan, SMPN 1 Gempol Pasuruan, dan SMAN 1 Pandaan Pasuruan serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, mendidik, dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

...Allah meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(terjemahan Surat *Al-Mujaadilah* ayat 58).^{*)}

Hidup bukan tuk berdiam diri, hidup ada tuk kita jalani.
Cobaan bukan tuk ditakuti, cobaan harus kita hadapi.^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Quran dan Terjemahannya*. Bandung : CV. Diponegoro

^{**)} Mojo, A. D. 2013. “Berlayar Denganku”. *Berlayar* [CD]. Jakarta : Sony Music Indonesia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Okky Santi Sandriani

NIM : 111810301028

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Ekstraksi dan Uji Reaktivitas Xilan dari Kulit Singkong sebagai Substrat Endo- β -1,4-Xilanase” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Februari 2016

Yang menyatakan,

Okky Santi Sandriani

111810301028

SKRIPSI

**EKSTRAKSI DAN UJI REAKTIVITAS XILAN DARI
KULIT SINGKONG SEBAGAI SUBSTRAT
ENDO- -1,4-XILANASE**

Oleh

Okky Santi Sandriani

NIM 111810301028

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drh. Wuriyanti Handayani M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dr.A.A. Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ekstraksi dan Uji Reaktivitas Xilan dari Kulit Singkong sebagai Substrat Endo- β -1,4-Xilanase” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua (DPU),

Sekretaris (DPA),

drh. Wuryanti Handayani, M.Si

Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si

NIP. 196008221985032002

NIP. 197012251997022001

Penguji I,

Penguji II,

Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si

Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc

NIP. 197104301998031003

NIP. 198010012003122001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Drs. Sujito, Ph.D

NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Ekstraksi dan Uji Reaktivitas Xilan dari Kulit Singkong sebagai Substrat Endo- β -1,4-Xilanase; Okky Santi Sandriani, 111810301028; 2016: 67 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) merupakan sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menempati urutan ketiga terbesar setelah padi dan jagung. Setiap bobot singkong akan menghasilkan kulit singkong sebesar 16% dari bobot tersebut. Kulit singkong samapi saat ini hanya dimanfaatkan sebagai bahan pakan ternak. Kulit singkong mengandung lignin, selulosa, protein, lemak, dan hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida terbesar kedua setelah selulosa dimana komponen utamanya adalah xilan . Xilan dapat digunakan sebagai substrat endo- β -1,4-xilanase dalam menghasilkan xilooligosakarida yang bersifat sebagai prebiotik.

Penelitian ini bertujuan mengetahui xilan dari kulit singkong dapat digunakan sebagai substrat endo- β -1,4-xilanase pengganti xilan *oat* serta untuk mengetahui waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk menghidrolisis xilan dari kulit singkong. Pada penelitian ini terdapat 4 sampel kulit singkong yang digunakan yaitu pengurangan kandungan HCN dan delignifikasi (P.HCN.D), pengurangan kandungan HCN dan tanpa delignifikasi (P.HCN.ND), tanpa pengurangan kandungan HCN dan delignifikasi (TP.HCN.D), dan tanpa pengurangan kandungan HCN dan tanpa delignifikasi (TP.HCN.ND). Xilan diekstraksi dari sampel P.HCN.D, P.HCN.ND, TP.HCN.D, dan TP.HCN.ND dengan menggunakan NaOH dengan variasi konsentrasi 2, 4, 8, 12% (b/v). Langkah pertama yaitu xilan hasil ekstraksi dipisahkan dan dimurnikan menggunakan kromatografi filtrasi gel. Langkah kedua yaitu menghidrolisis xilan dengan endo- β -1,4-xilanase. Produk hidrolisis yang dihasilkan dianalisis total gula pereduksi dengan menggunakan metode DNS dan kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT).

Kulit singkong yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kandungan kandungan HCN sebesar 235,73 ppm, kadar air sebesar 7,23%, dan kadar lignin sebesar 19,33%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen xilan tertinggi dihasilkan pada konsentrasi NaOH 8% (b/v) yaitu sebesar 7,87% (P.HCN.D), 13,07% (P.HCN.ND), 5,0% (T.P.HCN.D), 8,8% (T.P.HCN.ND). Analisa KLT menunjukkan bahwa xilan hasil ekstraksi yang telah dilewatkan kromatografi filtrasi gel telah murni dan tidak mengalami hidrolisis akibat penambahan asam dan basa saat proses ekstraksi. Analisa KCKT pada produk hidrolisis menunjukkan jenis xilooligosakarida yaitu xilopentosa (5963,99 ppm), xilotetraosa (2,59 ppm), xilotriosa (65,55), dan xilosa (7,67 ppm). Waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk menghidrolisis xilan dari kulit singkong yaitu 20 jam pada kondisi hidrolisis pH 5 dan suhu 40°C. Total gula pereduksi yang dihasilkan yaitu 2,370mg/ml (P.HCN.D), 1,959mg/ml (P.HCN.ND) 2,254mg/ml (T.P.HCN.D) , dan 1,661mg/ml (T.P.HCN.ND). Analisis RAL (Rancangan Acak Lengkap) perlakuan pengurangan HCN (P.HCN) berbeda nyata dengan perlakuan tanpa pengurangan HCN (T.P.HCN). Hal ini dikarenakan $F_{hitung}(169.965) > F_{tabel} 5\%(18,513)$ (*Lampiran G.1*) sehingga perlu adanya perlakuan pengurangan HCN. Perlakuan delignifikasi (P.HCN.D) berbeda nyata juga dengan perlakuan tanpa delignifikasi (P.HCN.ND) yang dapat dilihat dari $F_{hitung}(105.475) > F_{tabel} 5\%(18,513)$ (*Lampiran G.2*) sehingga perlu juga adanya perlakuan delignifikasi untuk menghasilkan konsentrasi total gula pereduksi yang besar.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa xilan berhasil diekstraksi dari kulit singkong dan dapat digunakan sebagai substrat endo- β -1,4-D-xilanase. Waktu optimum untuk menghidrolisis xilan dari kulit singkong yaitu 20 jam dengan kondisi hidrolisis pada pH 5 dan suhu 40°C. Hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase pada substrat xilan dari kulit singkong menghasilkan produk xilooligosakarida dengan jenis xilopentosa, xilotetraosa, xilotriosa, dan xilosa.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekstraksi dan Uji Reaktivitas Xilan dari Kulit Singkong sebagai Substrat Endo- β -1,4-Xilanase”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Drs. Sujito, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. drh. Wuryanti Handayani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama serta Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji I serta Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Novita Andarini, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. keluarga tercinta, ayahanda Suwono, Ibunda Supami, serta kedua adikku Dian Shinta dan M.Rayhan, yang setia mendukung moril dan materil, mendidik, dan memberi kasih sayang dan pengorbanan yang tidak terhingga selama ini;
7. teman-teman SOLVENT angkatan 2011 terima kasih atas semangat, bantuan, kritik, saran, pengalaman dan kenangan yang telah diberikan;

8. sahabat seperjuangan, Susilowati, Sarifatun Nahariyah, Lilik Dwi Wahyudi, Jainur Rochman, Aulia Novita Rachman, Siti Aisyatus, terima kasih atas doadukungan, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
 9. teman-teman seperjuangan *xylanase group*, Fita Kurnia, Wardhatul Baedho', Dewanti Oktavia, Melly ,dan Avida, terima kasih atas saran, kerjasama, dan bantuannya;
 10. kawan seperjuangan dalam menyelesaikan skripsi di *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST)*, terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
 11. semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu
- Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Jember, Februari 2016

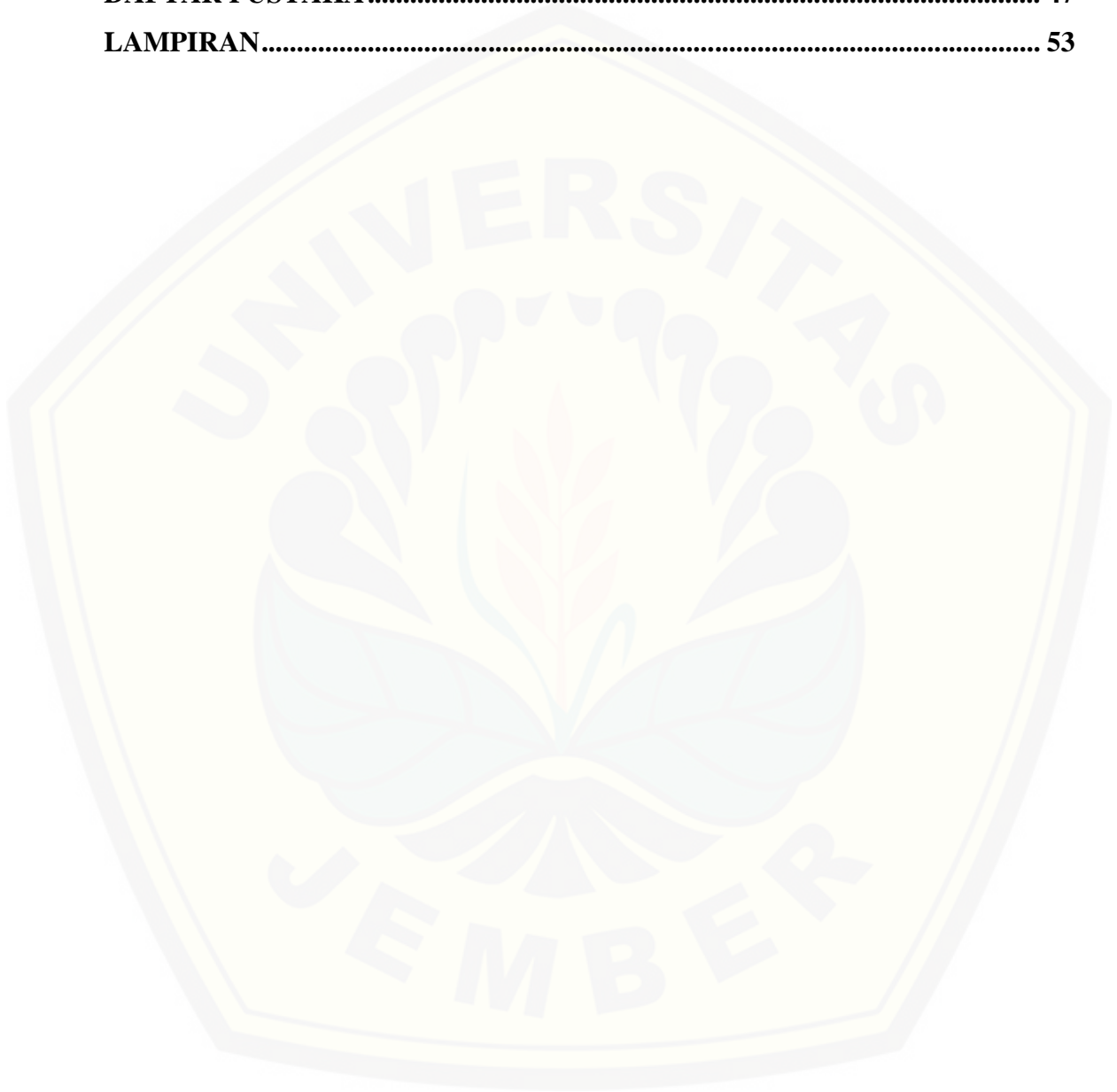
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. Tinjauan Pustaka	5
2.1 Kulit Singkong.....	5
2.2 Pengurangan Kandungan Asam Sianida (HCN)	6
2.3 Xilan	7
2.3.1 Definisi dan Struktur Xilan.....	7
2.3.2 Ekstraksi Xilan.....	9
2.4 Endo-β-1,4-D-Xilanase.....	10

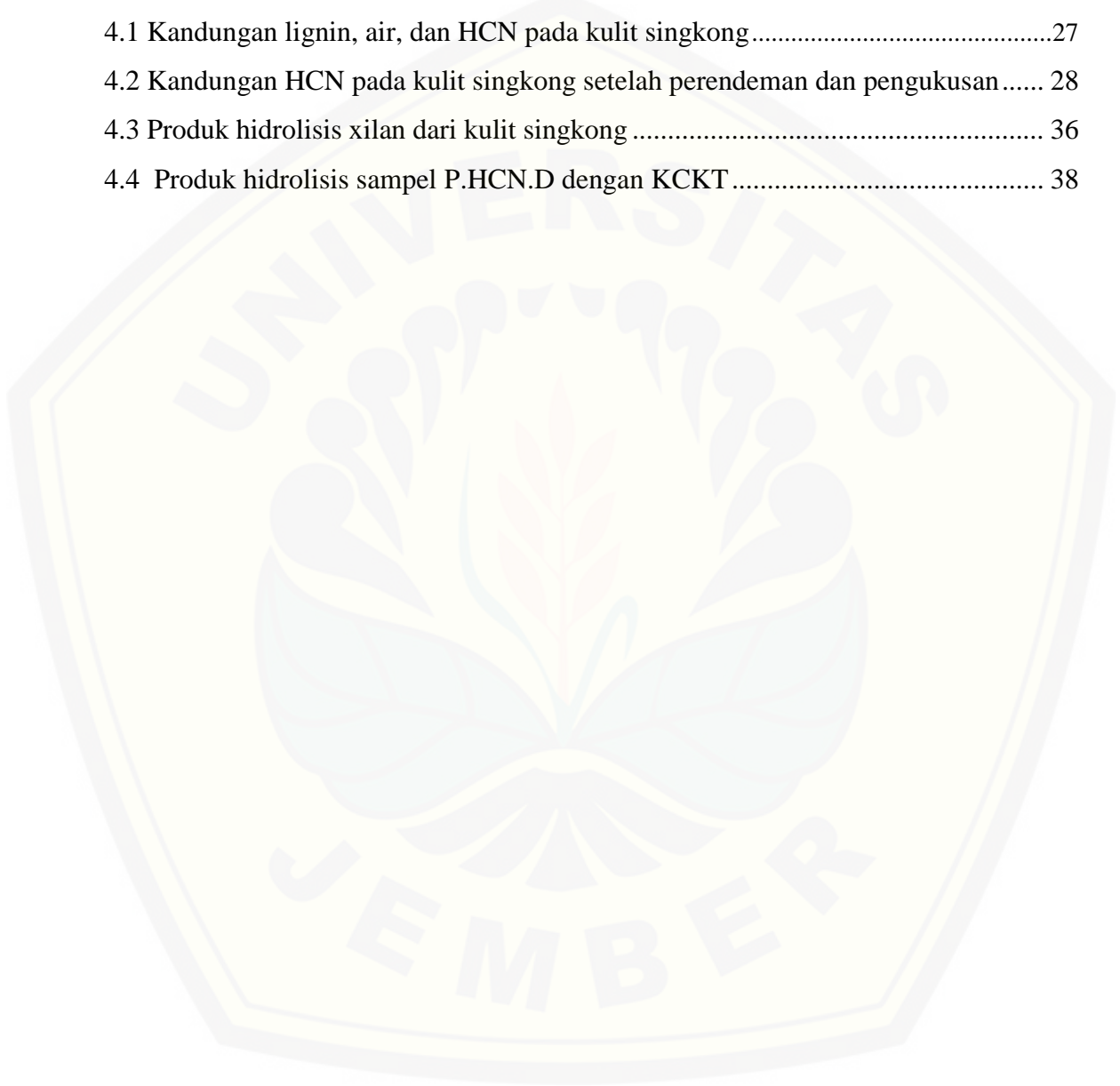
2.5 Kromatografi	12
2.5.1 Kromatografi Filtrasi Gel.....	12
2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	13
2.5.3 Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi(KCKT).....	14
2.6 Spektrofotometri UV-Vis	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.2.1 Alat Penelitian.....	18
3.2.2 Bahan Penelitian	18
3.3 Diagram Alir Penelitian	20
3.4 Prosedur Penelitian	21
3.4.1 Analisis Kandungan Lignin, Air, dan HCN pada Kulit Singkong	21
3.4.2 Pengurangan HCN pada Kulit Singkong	21
3.4.3 Delignifikasi.....	22
3.4.4 Ekstraksi Xilan dari Kulit Singkong	22
3.4.5 Uji Xilan dari Kulit Singkong	23
3.4.6 Pembuatan Kurva Standar Xilosa	24
3.4.7 Optimasi Waktu Inkubasi	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Kandungan Lignin, Air, dan HCN pada Kulit Singkong	26
4.2 Rendemen Xilan	27
4.3 Kromatogram Xilan Menggunakan Kromatografi Filtrasi Gel & Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	33
4.4 Produk Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong dengan Endo- -1,4- Xilanase	36
4.5 Waktu Inkubasi Optimum Endo- -1,4-Xilanase	38
BAB 5. PENUTUP	45

5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	53



DAFTAR TABEL

2.1 Kandungan kimia dari kulit singkong	6
4.1 Kandungan lignin, air, dan HCN pada kulit singkong.....	27
4.2 Kandungan HCN pada kulit singkong setelah perendaman dan pengukusan.....	28
4.3 Produk hidrolisis xilan dari kulit singkong	36
4.4 Produk hidrolisis sampel P.HCN.D dengan KCKT	38



DAFTAR GAMBAR

2.1 Struktur xilan dari kayu lunak dan kayu keras.....	8
2.2 Struktur xilan dan sisinya yang diserang oleh enzim xilanolitik	11
2.3 Proses elusi pada kromatografi filtrasi gel	13
2.4 Level energi elektronik dan keadaan transisi	16
3.1 Diagram alir penelitian.....	20
4.1 Kulit singkong sebelum dan sesudah proses delignifikasi	30
4.2 Rendemen xilan dari kulit singkong	31
4.3 Pemecahan struktur lignoselulosa	32
4.4 Xilan hasil ekstraksi dari kulit singkong	33
4.5 Kolom kromatografi filtrasi gel	34
4.6 Kromatogram fraksi – fraksi pada KLT	35
4.7 Kromatogram KCKT P.HCN.D.....	37
4.8 Kurva kandungan total gula pereduksi dalam berbagai variasi waktu inkubasi ..	39
4.9 Hasil KLT produk hidrolisis variasi waktu inkubasi	41

DAFTAR LAMPIRAN

A. Pembuatan Larutan dan Reagen.....	53
A.1 Pembuatan Larutan NaOH 2,4,8, dan 12%	53
A.2 Pembuatan Larutan HCl 6M.....	53
A.3 Pembuatan Larutan H ₂ SO ₄ 72%	53
A.4 Pembuatan Reagen DNS	53
B. Kandungan Lignin, Air, dan HCN pada Kulit Singkong	54
B.1 Kandungan Lignin, Air, dan HCN.....	54
B.2 Pengurangan Kandungan HCN dengan Perendaman	55
B.3 Pengurangan Kandungan HCN dengan Pengukusan Selama 25 Menit Setelah Dilakukan Perendemanan.....	55
C. Rendemen Xilan dari Kulit Singkong	56
D. Kurva Standar Xilosa pada 550nm	57
E. Produk Hidrolisis Inkubasi dari Kulit Singkong	58
F. Variasi Waktu Inkubasi Endo- -1,4-Xilanase	59
G. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dari Total Gula Pereduksi.....	60
G.1 RAL antara P.HCN dan T.P.HCN.....	60
G.2 RAL antara P.HCN.D dan P.HCN.ND.....	61
H. Kromatogram KCKT.....	62
H.1 Standar Xilosa	62
H.2 Standar Xilobiosa	63
H.3 Standar Xilooligosakarida	64
H.4 Hasil Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong	65
I. Perhitungan Kadar Hasil Hidrolisis	67
I.1 Standar Xilooligosakarida.....	67
I.2 Kadar Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong	67

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) merupakan sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menempati urutan ketiga terbesar setelah padi dan jagung (Prabawati, 2011). Singkong merupakan tanaman perdu yang berasal dari benua Amerika, tepatnya dari negara Brasil. Tanaman ini masuk ke Indonesia pada tahun 1852 (Purwono, 2009). Produktivitas singkong di Indonesia sebesar 22.677.866 ton, sedangkan di Jawa Timur produktivitas singkong mencapai 5 juta ton (Badan Pusat Statistika, 2012).

Daging singkong segar mempunyai komposisi kimiawi terdiri dari kadar air sekitar 60%, pati 35%, serat kasar 2,5%, kadar protein 1%, kadar lemak 0,5% dan kadar abu 1% (Prabawati, 2011). Serat singkong mengandung selulosa 59,9%, hemiselulosa 20% dan lignin 10,7% (Akaracharanya & Kerdlaew, 2011). 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 4,63%, serat kasar 15,20%, hemiselulosa 2,48%, lemak kasar 1,29%, kalsium 0,63, dan fosfor 0,22% (Adriani *et al.*, 2012 ; Hersoelistyorini *et al.*, 2010).

Hemiselulosa merupakan polisakarida terbanyak kedua di alam setelah selulosa. Komponen utama hemiselulosa adalah xilan (Da Silva *et al.*, 2007). Xilan sebagian besar ditemukan di kayu tanaman biji tertutup sekitar 15 – 30% sedangkan pada kayu tanaman biji terbuka sekitar 7 – 10% (Collin *et al.*, 2005). 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 -xilosidase (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 endo- -1,4-D-xilanase (EC 3.2.1.8, -1,4-D-xilanase) dikenal sebagai xilanase, endo 1,4- -D-xilan hidrolase, endoxilanase, -1,4-D-xilanase, dan -xilanase (Collins *et al.*, 2005; Purich & Allinson, 2000). Enzim ini dapat menghidrolisis ikatan glikosida dengan posisi -1→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 memodifikasi metode dari Yoshida *et al.*, (1994) yaitu dengan mevariasikan konsentrasi NaOCl pada proses delignifikasi. Richana *et al.* (2007) mengekstraksi xilan dari limbah pertanian yaitu limbah tongkol jagung dengan rendemen xilan tertinggi diperoleh dari hasil delignifikasi dengan konsentrasi NaOCl sebesar 0,5%. 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 .

Xilan dimanfaatkan di bidang industri sebagai campuran bahan pembuatan nilon dan resin. Hidrolisis xilan menghasilkan furfural yang dapat digunakan sebagai bahan pelarut industri minyak bumi dan pelarut reaktif untuk resin fenol. Xilan juga dapat diproses menjadi gula xilitol melalui proses hidrolisis xilan menjadi xilosa, kemudian dehidrogenasi menjadi xilitol. Xilitol mempunyai kelebihan dibanding gula pasir sebagai pemanis rendah kalori, mempunyai indeks glikemik rendah, dan dalam metabolisme tidak memerlukan insulin sehingga tidak meningkatkan gula darah (Richana *et al.*, 2007).

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi xilan dari kulit singkong. Xilan yang dihasilkan, diuji reaktivitasnya terhadap enzim endo- α -1,4-xilanase. Penelitian ini juga akan mengetahui waktu inkubasi optimum yang dibutuhkan oleh endo- α -1,4-xilanase untuk menghidrolisis substrat xilan dari kulit singkong.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat diambil beberapa yang dapat dijadikan sebagai rumusan masalah yakni :

1. Bagaimana pengaruh berbagai perlakuan kulit singkong terhadap profil rendemen xilan?
2. Bagaimana reaktivitas substrat xilan dari kulit singkong dengan berbagai perlakuan terhadap enzim endo- α -1,4-D-xilanase?
3. Berapa waktu optimum yang dibutuhkan enzim endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghidrolisis substrat xilan dari kulit singkong dengan berbagai perlakuan?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain :

1. Perlakuan terhadap kulit singkong yaitu pengurangan dan tanpa pengurangan kandungan HCN serta pengurangan dan tanpa pengurangan kandungan lignin.
2. Enzim yang digunakan adalah isolat enzim endo- α -1,4-D-xilanase yang berasal dari mikroorganisme dalam abdominal rayap.
3. Enzim yang digunakan memiliki aktivitas sebesar 0,481 U/ml.
4. Kondisi optimum enzim saat hidrolisis yaitu suhu 40 C dan pH 5.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui rendemen xilan pada kulit singkong.
2. Mengetahui waktu optimum dari xilanase saat menghidrolisis xilan

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk:

1. Memberikan informasi bahwa xilan dapat diekstraksi dari kulit singkong dengan perlakuan pengurangan kandungan HCN dan lignin.
2. Memberikan pengetahuan tentang manfaat kulit singkong sebagai sumber substrat untuk enzim endoxilanase .



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit Singkong

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, tanaman ini masuk ke Indonesia pada tahun 1852 (Purwono, 2009). Produktivitas singkong di Indonesia sebesar 22.677.866 ton, sedangkan di Jawa Timur produktivitas singkong mencapai 5 juta ton (Badan Pusat Statistika, 2012).

Potensi kulit singkong di Indonesia sangat melimpah, seiring dengan eksistensi negara ini sebagai salah satu penghasil singkong terbesar di dunia. Setiap kilogram singkong biasanya dapat menghasilkan 15 – 20% kulit singkong (Hidayat, 2009), sehingga apabila dihitung kulit singkong di Jawa Timur pada tahun 2012 mencapai 800.000 ton. Kulit singkong selama ini belum dimanfaatkan secara optimal. Kulit singkong termasuk salah satu bahan baku pakan ternak yang mempunyai energi (TDN) tinggi dan masih mengandung bahan – bahan organik seperti karbohidrat, protein, lemak dan mineral (Juliarti & Iis, 2013).

Peternak memberikan kulit singkong ke hewan ternak hanya sebatas pada pengetahuan mereka. Di Sukabumi, peternak memberikan kulit singkong secara langsung ke ternak. Di Bogor, peternak memberikan kulit singkong dalam bentuk cacahan. Kulit singkong dapat diolah melalui beberapa perlakuan sebelum diberikan ke hewan ternak, sehingga dapat meningkatkan nilai nutrisinya dan juga mengurangi kadar sianida yang membahayakan (Hanifah *et al.*, 2010). Senyawa glikosida sianogenik apabila terjadi proses oksidasi oleh enzim linamarase maka dihasilkan glukosa dan asam sianida (HCN) yang ditandai dengan bercak berwarna biru. Kadar HCN lebih dari 50 ppm akan menjadi racun apabila dikonsumsi (Prabawati, 2011).

Menurut hasil penelitian dari Adriani *et al.*, (2012) kandungan kimia dari kulit singkong sebagai berikut :

Tabel 2.1 Kandungan kimia dari kulit singkong

Air (%)	8,31
Abu (%)	6,75
Protein kasar (%)	4,63
Serat kasar (%)	13,04
Lemak kasar (%)	1,99
EB (kkal)	3510
Lignin (%)	7,88
Selulosa (%)	6,06
Hemiselulosa (%)	2,48
Asam sianida (ppm)	256,142
Glukosa (%)	7,3602
Pati (%)	30,8721

(Sumber : Adriani *et al.*, 2012).

2.2 Pengurangan Kandungan Asam Sianida (HCN)

Asam sianida dikenal sebagai racun yang mematikan. Kandungan sianogenik pada singkong antara <10 mg/kg sampai >500 mg/kg (Getachew *et al.*, 2011). Singkong dibagi menjadi tiga jenis berdasarkan kandungan sianidanya. Tiga jenis singkong yaitu singkong manis (HCN = 50 mg/kg), singkong (HCN = 50 – 100 mg/kg), dan singkong pahit (> 100 mg/kg) (Marlina, 2000). Menurut Bardbury (1999), kandungan HCN yang aman berdasarkan WHO untuk tepung singkong yakni 10mg/kg dan untuk singkong segar < 32 ppm.

Beberapa cara untuk mengurangi kandungan HCN pada singkong yaitu pengupasan, pemotongan, pamarutan, perendaman, penjemuran, perebusan, dan fermentasi. Semua metode tersebut mengurangi kandungan HCN dengan jumlah yang berbeda – beda. Berikut adalah metode – metode untuk mengurangi kandungan HCN menurut Tewe (1984) :

1. Pengupasan merupakan metode yang efektif untuk mengurangi kandungan HCN. Hal ini dikarenakan kandungan HCN pada kulit sangat tinggi daripada *pulp*. Pada sebuah penelitian menunjukkan pada jenis singkong pahit kandungan HCN pada kulit sebesar 650 ppm dan pada *pulp* sebesar 310 ppm. Pada jenis singkong manis kandungan HCN pada kulit 200 ppm dan pada *pulp* 38 ppm. Pengupasan dapat mengurangi kandungan HCN 50% pada singkong.
2. Proses perendaman dapat menghilangkan 20% sianida bebas pada *chips* singkong setelah 4 jam. Ikatan sianida mulai berkurang setelah dimulainya fermentasi. Pengurangan sianida yang signifikan jika direndam dengan air dan diganti secara rutin selama 3 – 5 hari.
3. Perebusan atau pengukusan dapat menghilangkan 90% sianida bebas dengan waktu 15 menit. Ikatan sianida dapat dihilangkan 55% dengan cara merebus atau mengukus setelah 25 menit. Perebusan dapat merusak enzim linamarase pada suhu 72⁰C.
4. Penjemuran atau pengeringan adalah proses penguapan menggunakan sinar matahari langsung dan menggunakan oven. Pengurangan kandungan sianida yang paling tinggi dengan menggunakan oven yaitu mengeringkan dengan suhu 60⁰C selama 48 jam. Pengurangan kandungan sianida dengan sinar matahari langsung dapat dilakukan dengan menjemur selama 1 – 3 hari selama musim kemarau, sedangkan saat musim hujan dapat dilakukan selama 8 hari.

2.3 Xilan

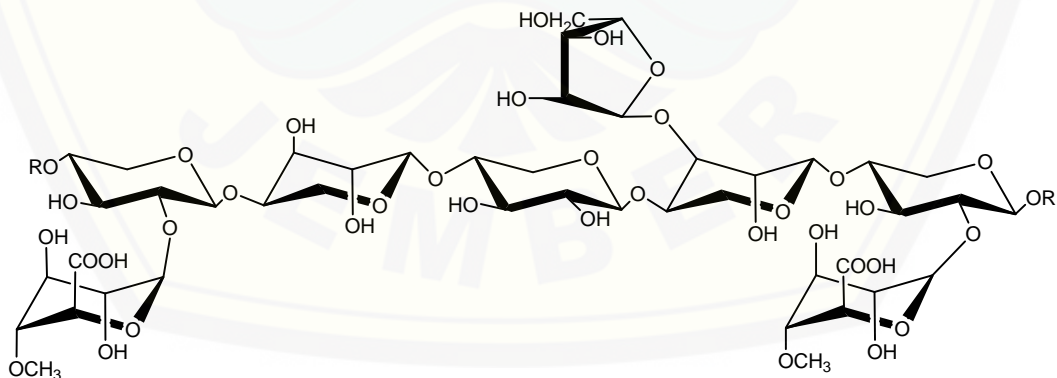
2.3.1 Definisi dan Struktur Xilan

Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang bercabang dengan Derajat Polimerisasi (DP) lebih rendah daripada selulosa, kira – kira 150 – 200 molekul (Penner, 2006). Hemiselulosa terdiri dari dua sampai tujuh residu gula yang berbeda, seperti D-xilosa, D-mannosa, D-galaktosa, D-glukosa, L-arabinosa, asam 4-O-metilglukuronat, asam D-galakturonat, dan asam glukuronat (Anggraini, 2003; Ortega & Octavio, 2006). Komposisi dan struktur hemiselulosa

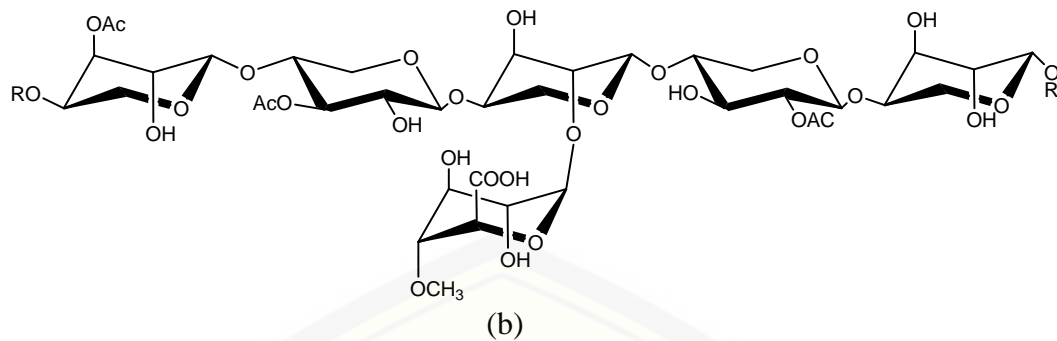
dalam kayu lunak berbeda dengan hemiselulosa dalam kayu keras. Secara umum hemiselulosa dapat dibagi menjadi tiga subgroup yaitu xilan, mannan, dan galaktan (Putri, 2008).

Xilan adalah polisakarida terbesar di sel tumbuhan dan terbanyak kedua di alam. Xilan terikat pada selulosa, pektin, lignin, dan polisakarida lainnya membentuk dinding sel tanaman (Kulkarni *et al.*, 1999 ; Anggraini, 2003). Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa (Collin *et al.*, 2005). Rantai hemiselulosa dapat terdiri atas dua atau lebih jenis monomer penyusun (heteropolimer) seperti 4-O-metilglukoronoxilosa dan dapat pula terdiri atas satu jenis monomer seperti xilan yang merupakan polimer xilosa (Richana *et al.*, 2004). Secara umum xilan terdiri dari rantai utama xilosa yang terikat pada β -1 \rightarrow 4 dan terdapat substituen arabinofuranosil, asam 4-O-metilglukoronat, atau asetil melalui proses esterifikasi (Haan dan Zyl, 2003).

Keberadaan xilan dalam jaringan kayu dikotil dan monokotil sekitar 25-35%, serta lebih dari 50% terdapat di beberapa jaringan dari rumput-rumputan (Moure *et al.*, 2006). Xilan terdapat hampir di semua tanaman, khususnya limbah tanaman pangan seperti tongkol jagung, bagas tebu, jerami padi, dedak gandum, dan biji kapas. Bahan – bahan tersebut mengandung xilan antara 16 – 40% (Jaggle, 1975; Richana *et al.*, 2004).



(a)



Gambar 2.1 Struktur xilan dari kayu lunak dan kayu keras . (a) struktur dasar arabino-4-O-metilglukuronoxilan. (b) struktur dasar O-asetil-4-O-metilglukuronoxilan (Vazquez *et al.*, 2000).

2.3.2 Ekstraksi Xilan

Ekstraksi merupakan suatu metode penarikan satu atau lebih senyawa metabolit sekunder dari jaringan bahan alam hayati dengan menggunakan pelarut tertentu (Sudjadi, 1988). Ekstraksi juga merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut tertentu (Maulida & Zulkarnaen, 2010). Prinsip dasar ekstraksi adalah distribusi komponen dalam dua fase yang saling tidak bercampur tersebut. Ekstraksi berlangsung dengan memanfaatkan adanya interaksi antara pelarut dengan bahan alam dan konstituen metabolit sekunder berpindah dari jaringan ke dalam pelarut (Harborne, 1987).

Xilan diperoleh dengan cara mengekstraksi dari bahan berlignoselulosa. Beberapa pelarut dapat digunakan untuk mengekstraksi xilan, diantaranya adalah natrium hidroksida (NaOH), ammonium hidroksida (NH₄OH), dan kalium hidroksida (KOH). Menurut Richana *et al.*, (2004), xilan dapat larut dalam larutan alkali (NaOH atau KOH sebesar 2 – 15%) dan dalam air. Pemilihan pelarut didasarkan pada beberapa hal, yaitu berdasarkan sifat dan jumlah pelarut. Sifat pelarut yang dipilih adalah pelarut yang selektif (Games *et al.*, 2002). Menurut Hespell (1998), diantara ketiga pelarut tersebut yang paling baik adalah NaOH karena menghasilkan xilan yang relatif bersih dari pengotor.

Ekstraksi xilan dari tongkol jagung telah dilakukan oleh Anggraini (2003). Tahap awal pada proses ekstraksi xilan yaitu delignifikasi. Delignifikasi adalah proses penghilangan lignin. Proses delignifikasi dilakukan menggunakan pelarut

natrium hipoklorot (NaOCl) karena ion – ion hipoklorit mampu memecah ikatan karbon dalam struktur lignin. Lignin merupakan bahan organik bukan karbohidrat yang berbentuk *amorf* dan tersusun atas unit – unit fenilpropana. Delignifikasi yang ideal adalah penghilangan total lignin tanpa merusak komponen polisakarida dari selulosa dan hemiselulosa. Dua metode untuk delignifikasi yakni klorinasi (termasuk ekstraksi bergantian dengan larutan alkohol panas organik) dan delignifikasi dengan larutan natrium klorit yang diasamkan (Anggraini, 2003).

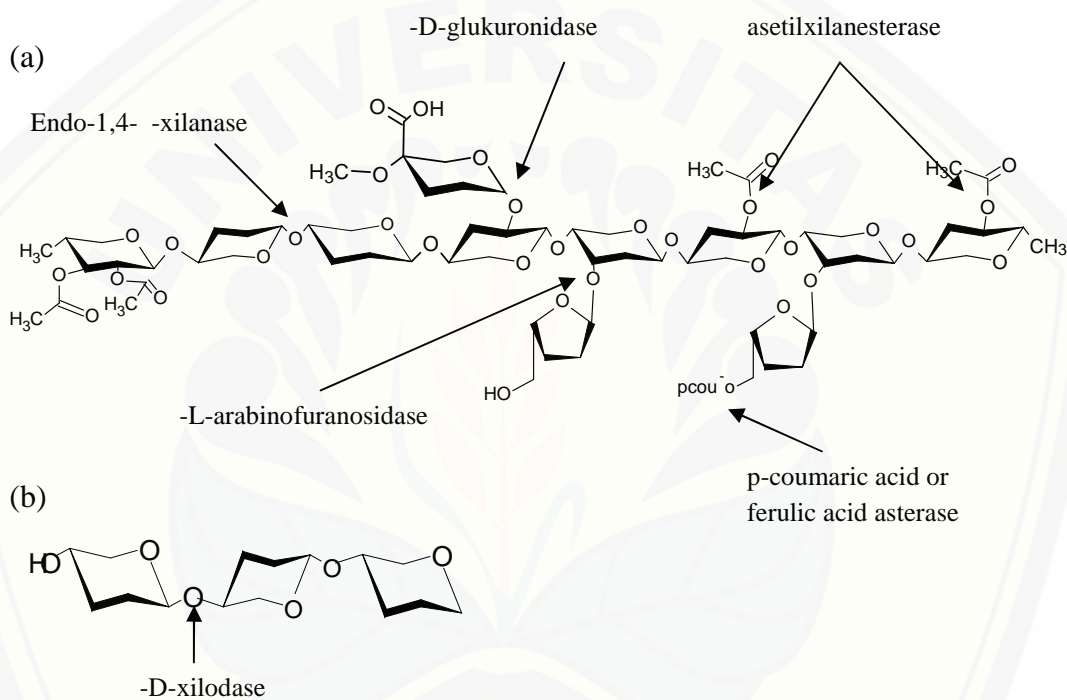
Xilan dimanfaatkan dalam bidang industri sebagai :

1. Gula xilitol. Xilan menjadi xilosa melalui proses hidrolisis, kemudian dehidrogenasi menjadi xilitol. Xilitol mempunyai kelebihan dibanding gula pasir (sukrosa), sebagai pemanis rendah kalori, indeks glikemik jauh lebih rendah sehingga tidak meningkatkan kadar gula darah dan dimetabolisme tanpa membutuhkan insulin. Karena itu, xilitol sangat baik untuk penderita diabetes (Richana *et al.*, 2004). Saat ini xilitol banyak digunakan untuk pasta gigi karena dapat menguatkan gusi (Richana *et al.*, 2004).
2. Furfural yang dapat digunakan sebagai bahan pelarut industri minyak bumi, pelarut reaktif untuk resin fenol, disinfektan, dan sebagai bahan awal untuk memproduksi berbagai bahan kimia dan polimer lainnya (Mansilla *et al.*, 1998; Richana *et al.*, 2004).
3. Substrat enzim xilanase yang bermanfaat dalam industri pangan maupun pangan. Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase dapat dimanfaatkan untuk campuran pakan ternak, penjernihan sirup, pembuatan gula xilosa, dan bahan proses pemutih kertas (Richana *et al.*, 2004).

2.4 Endo- β -1,4-D-Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilan (polimer dari xilosa) dan xilooligosakarida. Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000 – 30.000 Dalton, aktif pada suhu 55⁰C dengan pH 9. Pada suhu 60⁰C dan pH normal, xilanase lebih stabil. Xilanase dapat diklasifikasikan

berdasarkan substrat yang dihidrolisis yaitu α -xilodase, eksoxilanas, dan endoxilanas. α -xilodase merupakan xilanas yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksosilanas merupakan xilanas yang mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan oligosakarida rantai pendek. Endoxilanas merupakan enzim yang dapat memutus ikatan 1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur (Richana, 2002).



Gambar 2.2 (a) Struktur xilan dan sisinya yang diserang oleh enzim xilanolitik. (b) Hidrolisis xilooligosakarida oleh α -xilodase. (Collin *et al.*, 2005).

α -endoxilanas (1,4- β -D-xilanxilanohidrolase, EC. 3.2.1.8) termasuk klasifikasi enzim xilanolitik. Pada umumnya enzim ini dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri dan jamur, namun beberapa dapat dihasilkan dari tumbuhan dan hewan (Ratnadewi *et al.*, 2007). Beberapa jenis bakteri dan jamur diketahui mampu menghasilkan xilanas ekstraseluler yang dapat menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilosa. Selain itu beberapa mikroorganisme yang terdapat pada ruminansia diketahui berpotensi sebagai penghasil xilanas karena hewan ruminansia tersebut mengkonsumsi hemiselulosa dalam jumlah besar. Genus

Bacillus diketahui sebagai penhasil xilanase yang aktif pada suhu 50⁰C – 60⁰C dengan pH 7 – 9 (Septiningrum *et al.*, 2008).

Xilanase berpotensi untuk dikembangkan pada berbagai proses industri seperti makanan, pakan ternak, kertas, bubur kayu, tekstil, dan proses bioremediasi (Collins *et al.*, 2005). Penggunaan xilanase pada industri *pulp* dan kertas bertujuan meningkatkan derajat putih *pulp*, sehingga *pulp* tersebut sesuai untuk dibuat kertas dengan jenis tertentu. Proses pemutihan *pulp* juga membuatnya stabil sehingga tidak menguning atau kehilangan kekuatan dan derajat putih selama penyimpanan. Xilanase digunakan untuk meningkatkan ekstrak lignin dan melepaskan kromofor *pulp* dalam tahap awal pemutihan *pulp*. Penggunaan enzim ini diharapkan dapat mereduksi penggunaan bahan kimia klor yang digunakan pada berbagai tahapan dalam proses pemutihan sehingga menjadi lebih ramah lingkungan (Septiningrum *et al.*, 2008).

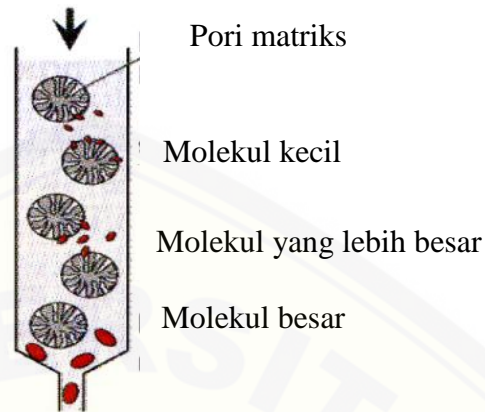
2.5 Kromatografi

2.5.1 Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel digunakan untuk memisahkan molekul – molekul yang larut dalam air berdasarkan perbedaan ukuran atau berat molekul yang melewati kolom dengan media gel (Skoog *et al.*, 2004). Gel atau matriks terbentuk dari polimer melalui ikatan silang untuk membentuk jaringan tiga dimensi. Contohnya adalah gel *sephadex* yang terbentuk melalui ikatan silang dextran dengan epiklorohidrin. Matriks yang digunakan pada kromatografi gel bermacam – macam jenis dan penggunaannya yang sesuai dengan ukuran molekul yang akan dipisahkan. Matriks berfungsi sebagai fase diam memiliki pori yang seragam sehingga pelarut dan analit dapat berdifusi.

Pemisahan terjadi jika pori sesuai dengan ukuran molekul yang melewati gel. Molekul secara efektif akan terjebak di dalam pori dan terpisah dari aliran pelarut. Molekul dengan ukuran yang besar tidak dapat melewati pori gel sehingga akan terelusi paling awal bersamaan dengan fase gerak. Molekul yang lebih kecil akan memasuki pori dan terjebak pada waktu yang lebih lama tergantung pada ukuran dan bentuk dari molekul. Molekul yang jauh lebih kecil

dari ukuran pori akan memasuki pori dan terelusi dengan waktu yang paling lama (Manz *et al.*, 2004).



Gambar 2.3 Proses elusi pada kromatografi filtrasi gel (Manz *et al.*, 2004).

2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen – komponennya. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen – komponennya akan dipisahkan antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal, sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Haqiqi, 2008).

Pelaksanaan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumida yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastic yang keras. Jel silika (atau alumina) merupakan fase diam. Fase diam untuk KLT seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendar *flour* dalam sinar ultraviolet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai (Haqiqi, 2008). Harga R_f (*Retardation Factor*) yang didefinisikan sebagai rasio jarak noda terhadap titik awal dibagi jarak eluen terhadap titik awal. Secara matematis dapat ditulis:

$$R_f = \frac{l}{h}$$

dengan l = jarak noda dari titik awal ke titik akhir setelah proses pengembangan dan h = jarak eluen dari titik awal ke batas akhir eluen. Harga R_f berkisar antara 0-0,999. Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapis tipis sehingga mempengaruhi harga R_f antara lain struktur kimia senyawa yang dipisahkan, sifat penyerap, tebal dan kerapatan lapisan penyerap, pelarut (fasa gerak), derajat kejenuhan, teknik pemisahan, jumlah cuplikan, dan suhu (Hardjono Sastrohamidjojo, 1991).

Faktor-faktor yang mempengaruhi harga R_f (Hardjono Sastromidjoyo, 1991) adalah :

- a. Struktur senyawa yang sedang dipisahkan.
- b. Sifat adsorben, jenis adsorben, dan derajat aktivitasnya.
- c. Tebal dan kerataan lapisan adsorben.
- d. Pelarut fasa gerak (dan tingkat kemurniannya).
- e. Derajat kejenuhan dan uap dalam bejana pengembangan yang digunakan.
- f. Teknik percobaan.
- g. Jumlah cuplikan yang digunakan. Penetesan jumlah cuplikan yang berlebihan memberikan tendensi penyebaran noda - noda dengan kemungkinan terbentuknya ekor.
- h. Suhu, untuk mencegah perubahan-perubahan dalam komposisi pelarut yang disebabkan oleh penguapan-penguapan atau perubahan-perubahan fasa.

2.5.3 Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode kromatografi cair yang menggunakan fasa diam yang ditempatkan dalam suatu kolom tertutup dan juga fasa geraknya berupa pelarut yang dialirkan dengan cepat ke dalam kolom dengan bantuan pompa / tekanan (Anshori, 2007). KCKT adalah jenis kromatografi yang menggunakan cairan sebagai fase gerak dan fase diam yang dipadatkan di dalam kolom sehingga dibutuhkan tekanan tinggi agar zat cair dapat melewati kolom (Skoog *et al.*, 2004).

Prinsip kerja dari KCKT adalah adanya perbedaan interaksi antara analit dengan fase diam dan fase gerak. Analit yang kurang kuat berinteraksi dengan

fasa diam akan keluar lebih dulu dari kolom, sedangkan analit yang berinteraksi kuat dengan fasa diam maka akan keluar lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor dan informasi ditampilkan dalam bentuk kromatogram (Hendayana, 2010). Kemampuan proses kromatografi untuk memisahkan dua komponen dalam sampel disebut resolusi. Semakin besar nilai resolusi yang dihasilkan menunjukkan senyawa – senyawa dalam sampel dapat dipisahkan dengan baik (Holme Peck, 1998).

Indeks refraktif biasanya digunakan sebagai detektor pada KCKT karena sifatnya yang universal dan cukup sensitif. Alternatif detektor lainnya adalah spektrofotometer UV yang juga cukup sensitif. Detektor UV dapat diatur pada panjang gelombang tertentu yang sensitif terhadap sampel, atau aliran eluen dapat dipisah sehingga dapat mengalirkan hanya bagian yang diinginkan untuk di deteksi (Miller, 1959).

Menurut Putra (2004), banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya, yakni :

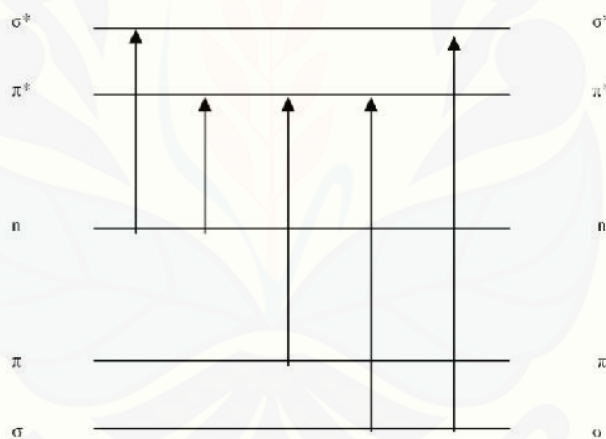
1. Mampu memisahkan molekul – molekul dari suatu campuran
2. Mudah melaksanakannya
3. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
4. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi/ kerusakan bahan yang dianalisis
5. Resulasi yang baik
6. Dapat digunakan bermacam – macam detektor
7. Kolom dapat digunakan kembali
8. Mudah melakukan *sample recovery*

2.6 Spektrofometri UV – Vis

Spektrofometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monomakromatis oleh larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detector *fototube* (Day & Underwood, 1998). Spektrofotometri UV- Vis adalah salah satu teknik analisa spektroskopik yang memakai sumber radiasi

elektromagnetik sinar tampak dengan menggunakan instrumen spektrofometer (Mulja & Suharman, 1995).

Spektrofometer UV – Vis adalah sejenis peralatan yang digunakan untuk mengukur serapan molekul organik atau anorganik yang diberikan sumber cahaya dengan rentang panjang gelombang di daerah UV – Vis (180 – 770 nm) (Siswoyo & Asnawati, 2007). Spektrofometri UV – Vis didasarkan pada kemampuan molekul untuk menyerap cahaya ultraviolet dan *visible* (Pavie *et al.*, 2001). Proses absorbs cahaya UV – Vis berkaitan dengan promosi elektron dari satu orbital molekul dengan tingkat energi elektronik tertentu ke orbital molekul lain dengan energi elektronik yang lebih tinggi. Transisi elektronik tersebut biasanya adalah $\sigma \rightarrow \sigma^*$, σ^* atau $n \rightarrow \sigma^*$ (bersesuaian dengan energi cahaya UV), dan $\pi \rightarrow \pi^*$ atau $n \rightarrow \pi^*$ (bersesuaian dengan energi cahaya Vis) (Siswoyo & Asnawati, 2007).



Gambar 2.4 Level energi elektronik dan keadaan transisi (Pavia *et al.*, 2001).

Panjang gelombang cahaya UV atau cahaya tampak bergantung pada mudahnya promosi elektron. Molekul – molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi electron, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya pada daerah tampak (senyawa berwarna) mempunyai electron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV

yang lebih pendek (Fessenden, 1999). Menurut Siswoyo & Asnawati (2007), komponen spektrofometer yang paling sederhana yakni:

1. Sumber cahaya
2. Monokromator, yang berfungsi sebagai penyeleksi cahaya dengan panjang gelombang (energi) tertentu.
3. Kompartemen sampel
4. Detektor dan pengukur intensitas cahaya.



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Mei sampai Desember dan tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Laboratorium Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian, serta Laboratorium CDAST (*Centre of Development for Advance Science and Technology*) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian digolongkan menjadi peralatan gelas, peralatan bukan gelas, dan instrumen.

Peralatan gelas meliputi gelas beaker, labu ukur, gelas ukur, erlenmeyer berbagai volume, pipet volum, pipet mohr, pipet tetes, kolom dengan diameter 3 mm, cawan petri, tabung sentrifuse, dan tabung reaksi.

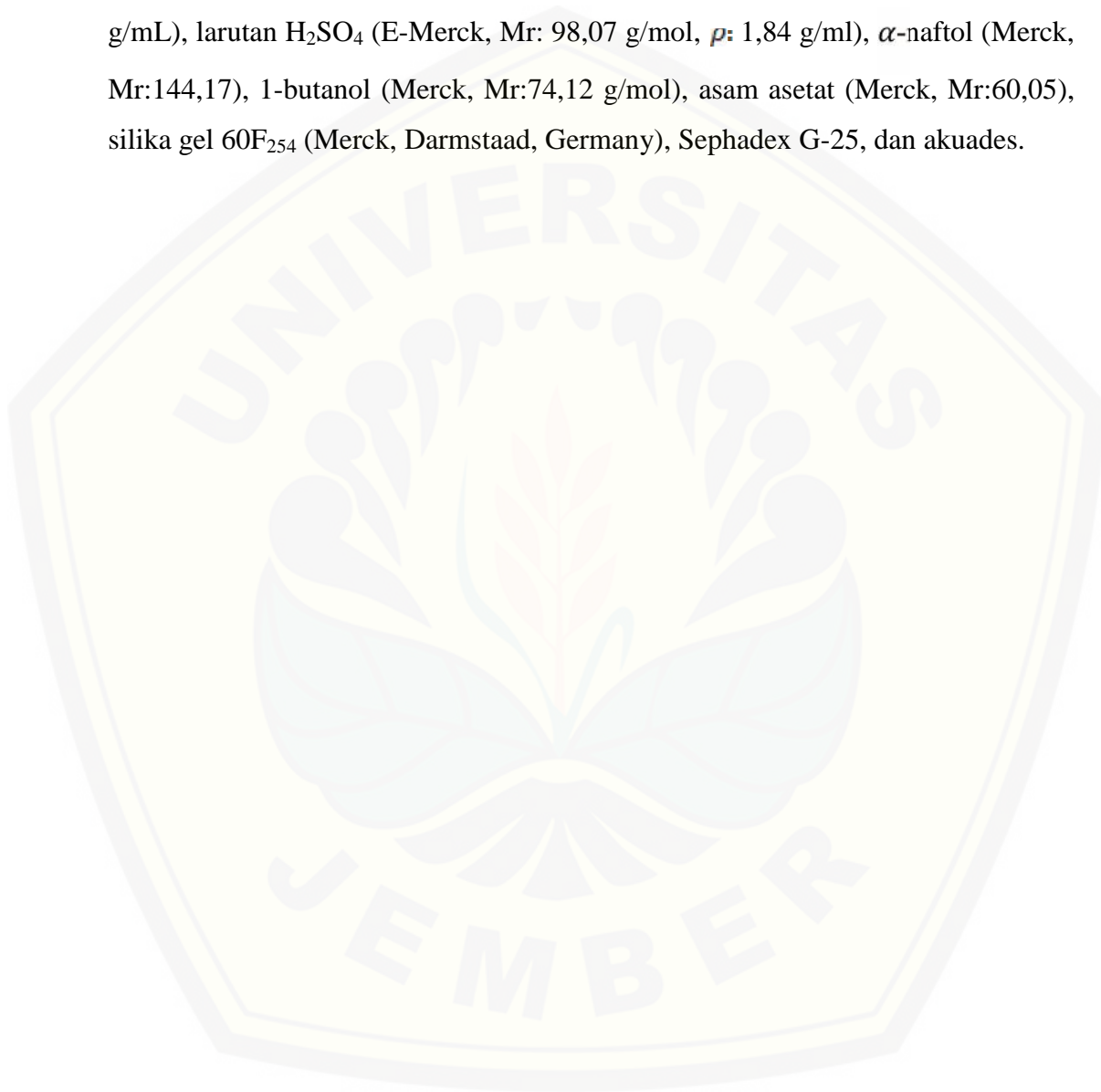
Peralatan bukan gelas antara lain alu, mortar, spatula logam, tisu, kertas saring, aluminium foil, timer, ball pipet, lemari asam (JAVVA FH180), pipet mikro, bak alat, *water bath* (Stuart SBS40), botol semprot, kertas label, dan rak tabung reaksi.

Instrumen meliputi neraca analitik (ES 225SM-DR), *stirrer magnet, hot plate* (Stuart UC-152), kulkas (Sharp), *autoclave* (TOMY ES-315), pH meter (Navih F-15), *sentrifuse* (HITACHI CF15RXII), statip, spektrofotometer UV-Vis dengan kuvet (HITACHI U-2900), oven (Froilabo), Vortex (Vortex Genie 2).

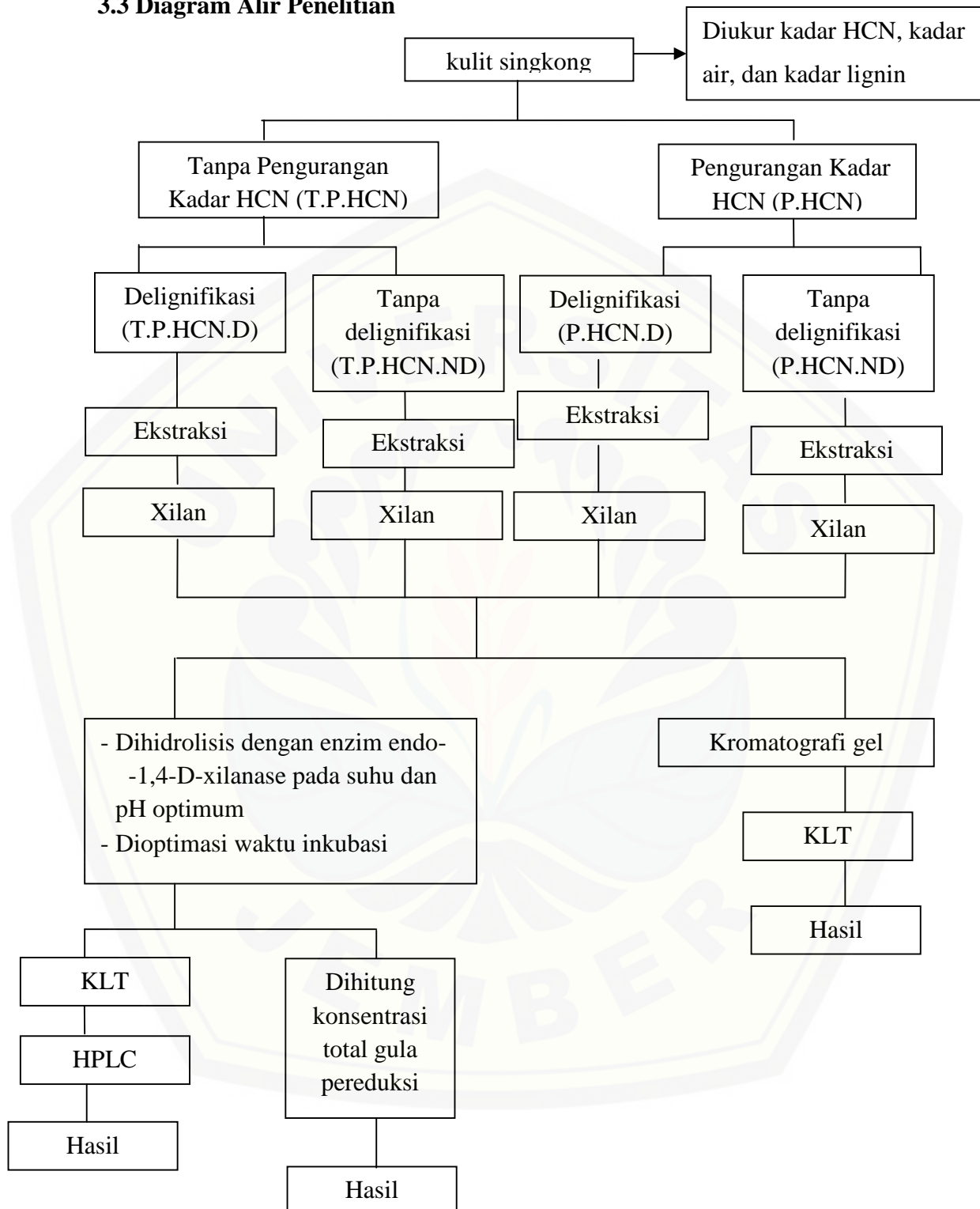
3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit singkong, xilosa, Na_2HPO_4 (E-Merck, Mr: 141,96 g/mol, ρ :1,70 g/mL), asam sitrat $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (E-Merck, Mr: 210,14 g/mol, ρ :1,50 g/mL), NaOH (E-Merck, Mr:

39,99 g/mol, ρ :2,10 g/mL), KnaTartrat $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (E-Merck, Mr: 282,1 g/mol, ρ :0,63 g/mL), asam 3,5-dinitrosalisilat (E-Merck), C_6H_5OH (E-Merck, Mr: 94,11 g/mol, ρ :1,07 g/mL), Na_2SO_3 (E-Merck, Mr: 126,04 g/mol, ρ :1,56 g/mL), NaOCl (E-Merck), HCl (E-Merck), etanol (E-Merck, Mr: 46,07 g/mol, ρ :0,789 g/mL), larutan H_2SO_4 (E-Merck, Mr: 98,07 g/mol, ρ : 1,84 g/ml), α -naftol (Merck, Mr:144,17), 1-butanol (Merck, Mr:74,12 g/mol), asam asetat (Merck, Mr:60,05), silika gel 60F₂₅₄ (Merck, Darmstaad, Germany), Sephadex G-25, dan akuades.



3.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Analisis Kandungan Lignin, Air, dan HCN

a. Kadar Air

Sampel sebanyak 3 gram yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam cawan porselin yang diketahui berat konstan. Kemudian, dioven selama 2 jam pada suhu 105°C. Sampel didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Sampel dipanaskan kembali dalam oven selama 30 menit, dinginkan kembali dalam desikator dan ditimbang.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{b - c}{a} \times 100\% \quad (3.1)$$

Keterangan : a = berat sampel

b = berat sampel + cawan porselin sebelum dioven

c = berat sampel + cawan porselin setelah dioven

b. Kandungan Lignin (Datta, 1981)

Sebanyak 1 gram kulit singkong dimasukkan pada 100 mL erlenmeyer dan ditambahkan 15 mL asam sulfat 72%. Campuran larutan distirer selama 2 jam pada suhu kamar. Larutan ditambahkan 560 mL akuades dan direfluks selama 4 jam dan endapan yang terbentuk disaring. Selanjutnya, endapan dioven sampai kering. Presentase kadar lignin dihitung dengan menggunakan persamaan 3.2.

$$\text{Kadar lignin} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.4.2 Pengurangan Asam Sianida (HCN) pada Kulit Singkong (Nebiyu & Getachew, 2011 ; Purwanti, 2005 ;Tewe, 1984)

Kulit singkong yang sudah dipotong kecil – kecil, dibersihkan dengan air. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah pengurangan HCN. Kulit singkong direndam dengan air selama 3 -5 hari. Setelah perendaman, kulit singkong dikukus selama 25 menit. Kemudian kulit singkong dikeringkan dengan oven. 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 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 :

$$\text{HCN total (ppm)} = 396 \times \text{absorbansi} \quad (3.3)$$

3.4.3 Delignifikasi (Anggraini, 2003 ; Richana *et al.*, 2007)

Kulit singkong yang telah digiling dengan larutan NaOCl 0,5% pada suhu 28⁰C selama 5 jam. Kemudian dibilas dengan akuades dan disaring. Padatan yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi xilan pada subbab 3.4.4.

3.4.4 Ekstraksi Xilan dari Kulit Singkong (Anggraini, 2003 ; Richana *et al.*, 2007)

Pada proses ekstraksi terdapat empat sampel yaitu sampel yang telah dikurangi kandungan HCN dengan melalui perlakuan delignifikasi dan tanpa delignifikasi, serta sampel yang tanpa dikurangi kandungan HCN dengan melalui perlakuan delignifikasi dan tanpa delignifikasi

Padatan yang dihasilkan direndam dalam larutan NaOH dengan variasi konsentrasi yaitu 2%, 4%, 8%, dan 12% selama 24 jam pada suhu 28⁰C. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan yang dihasilkan diukur pH-nya. Kemudian supernatan dinetralkan dengan menambahkan tetes demi tetes HCl 6 N. Sampel yang sudah netral disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi dipisahkan dengan cara menambahkan etanol 95% dengan perbandingan 1:3 (supernatant : etanol) dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dioven sampai berat konstan. Berat xilan dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen xilan (\%)} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% \quad (3.4)$$

3.4.5 Uji Xilan dari Kulit Singkong

a. Uji Kualitatif Xilan dengan Kromatografi Filtrasi Gel dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Ratnadewi *et al.*, 2007)

Xilan hasil ekstraksi diuji menggunakan kromatografi filtrasi gel. Xilan dilarutkan dengan akuades. Fase diam yang digunakan adalah Sephadex G25. Sampel sebanyak 1000 μl dialirkan ke dalam kolom dan buffer dielusikan secukupnya (@ 200 μl) ke dalam kolom kromatografi gel. Eluen yang keluar dari kolom ditampung pada tabung *ependorf* setiap 200 μl hingga dihasilkan beberapa fraksi.

Fraksi yang dihasilkan diuji dengan KLT untuk menguji adanya xilan. Sebanyak 6 μl (pada masing-masing fraksi) 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 naftol dan H_2SO_4 dalam etanol kemudian dioven pada suhu 100°C selama 5 menit (Ratnadewi *et al.*, 2007).

b. Uji Kuantitatif dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Larutan Standar Xilan (Richana *et al.*, 2007)

Larutan standar xilan sebanyak 20 μl pada konsentrasi 100 ppm diinjeksikan ke dalam kromatografi dan dielusi menggunakan air dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Instrumen yang digunakan yaitu KCKT dengan jenis kolom C_{18} sebagai fase diam, fase gerak : air, volume injeksi sebanyak 20 μl , detektor refraktif indeks dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit.

c. Uji Kuantitatif dengan KCKT Xilan dari Kulit Singkong (Richana *et al.*, 2007)

Larutan sampel sebanyak 20 μl diinjeksikan ke dalam kromatografi dan dielusi menggunakan air dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Instrumen yang digunakan yaitu KCKT dengan jenis kolom C_{18} sebagai fase diam, fase gerak : air, volume injeksi sebanyak 20 μl , detektor refraktif indeks dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Analisis kualitatif xilan dilakukan dengan membandingkan waktu

retensi xilan oleh kulit singkong yang dihasilkan dengan laruta baku xilan. Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan puncak kromatogram xilan uji dan luas puncak kromatogram larutan baku xilan terhadap konsentrasi larutan baku :

$$\text{Kadar sampel} = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times \text{kadar standar} \quad (3.5)$$

3.4.6 Pembuatan Kurva Standar Xilosa

Larutan standar xilosa disiapkan dengan konsentrasi yang berbeda (0,25-1,25 mg/ml dengan selisih 0,05 mg/ml). Sebanyak 250 μL dari masing-masing konsentrasi dicampurkan dengan 750 μL reagen Miller dalam tabung reaksi. Campuran ini dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm dan dibuat grafik antara sumbu x (konsentrasi xilosa) dan sumbu y (nilai absorbansi).

3.4.7 Optimasi Waktu Inkubasi

Enzim endoxilanase sebanyak 125 μL ditambahkan pada 125 μL substrat xilan dari kulit singkong dalam buffer fosfat – sitrat. Kemudian diinkubasi pada 40⁰C selama 5 jam, 10 jam, 16 jam, 20 jam, 24 jam, dan 30 jam. Selanjutnya ditambahkan DNS sebanyak 750 μL . Campuran dipanaskan pada suhu 100⁰C dalam *waterbath* selama 20 menit dan didinginkan dengan air es selama 20 menit. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 550 nm. Hasil konsentrasi total gula pereduksi paling maksimum digunakan untuk penentuan lama inkubasi enzim endoxilanase.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Profil rendemen xilan pada kulit dengan berbagai perlakuan memiliki tren yang sama pada setiap konsentrasi NaOH. Pada konsentrasi NaOH 2% sampai 12% rendemen tertinggi dimiliki oleh P.HCN.ND yang kemudian diikuti T.P.HCN.ND, P.HCN.D, dan yang terakhir T. P.HCN.D. T.P.HCN.ND dan P.HCN.ND memiliki rendemen yang lebih besar daripada T.P.HCN.D dan P.HCN.D dan P.HCN.ND lebih besar daripada T.P.HCN.ND. Rendemen tertinggi xilan dari kulit singkong diperoleh pada konsentrasi NaOH 8% sebesar 7,87 % (P.HCN.D), 13,07% (P.HCN.ND), 5,0% (T.P.HCN.D), 8,8% (T.P.HCN.ND). Hasil delignifikasi juga mempengaruhi warna pada xilan, xilan tanpa delignifikasi memiliki warna coklat yang lebih gelap dibandingkan xilan dengan delignifikasi.
2. Xilan dari kulit singkong reaktif terhadap enzim endo- β -1,4-xilanase yang dapat ditunjukkan dengan total gula reduksi sebesar P.HCN.D (8,4mg/ml \pm 0,04), P.HCN.ND (5,46mg/ml \pm 0,06), T.P.HCN.D (6,9mg/ml \pm 0,05), dan T.P.HCN.ND (4,5mg/ml \pm 0,05). Analisis KCKT dapat mengetahui jenis XO yang dihasilkan yaitu X5 (5963,99 ppm), X4 ((2,59 ppm), X3 (65,55 ppm), dan X1 (7,67 ppm).
3. Analisis RAL menunjukkan perlakuan pengurangan HCN dan delignifikasi berbeda nyata dengan perlakuan tanpa pengurangan HCN dan lignin.
4. Waktu inkubasi optimum ketika enzim endo- β -1,4-xilanase menghidrolisis xilan yakni 20 jam dengan konsentrasi total gula reduksi tiap sampel sebesar P.HCN.D (2,370mg/ml \pm 0,014), P.HCN.ND (1,959mg/ml \pm 0,016), T.P.HCN.D (2,254mg/ml \pm 0,005), dan T.P.HCN.ND (1,661mg/ml \pm 0,007).

5.2 Saran

1. Ekstraksi xilan harus melalui proses delignifikasi terlebih dahulu untuk memaksimalkan proses hidrolisis dengan enzim.
2. Xilan hasil ekstraksi belum diketahui jenis xilannya sehingga perlu adanya analisis penentuan jenis xilan.



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. Bogor : IPB FTP.
- AOAC. 1984. *Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist Vol. IIA*. AOAC Int. Washington.
- Asboe – Hansen, G., & Nelly, B. 1973. New Method for Quantitative Determination of Uronic Acid. *Analytical Biochemistry* 54, 484 – 480.
- Asegbola, A.A., & O. Asaolu. 1986. *Preparation of Cassava Peels For Use in Small Ruminant Production in Western Nigeria*. Nigeria : Department of Animal Science University of Ife.
- Akaracharanya, A., & Kerdlaew, N. 2011. *Optimization Condition for Explosion Pretreatment of Lignocellulosic Cassava Root Fiber*. Bangkok : Departement of Microbiology, Faculty of Science.
- Badan Pusat Statistika. 2012. *Luas Produktivitas Tanaman Ubi Kayu di Seluruh Provinsi Tahun 2012*. Badan Statistika.
- Bradbury, H., & M. Rezaul, H. 1999. Simple Method for Determination of Thiocyanate in Urine. *Clinical Chemistry* 45 : 9 1459 – 1464.
- Collins, T., Charles, G., & Georges, F. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 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*.
- Datta, R. 1981. Acidogenic Fermentation of Lignocelluloses – Acid Yield and Conversion of Components. *Biotechnology and Bioengineering* 23 (9): 2167 2170.
- Day, R. A., & Underwood, A. L. 2002. Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam. Jakarta: Erlangga.
- Fengel D, Wegener G. 1995. *Kayu; Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi*. Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. 1999. *Kimia Organik Jilid 1, Edisi Ketiga*. Jakarta : Erlangga.
- Food Standards Australia New Zealand. 2004. Cyanogenic Glycosides in Cassava and Bamboo Shoots. *A Human Health Risk Assessment Technical Report Series No. 28*.
- Gamse, T. 2002. *Liquid - liquid Extraction and Solid - Liquid Extraction*. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering. Graz University of Technology. hal.2-24.
- Hanifah, V., D. Yulistiani., & S.A.A. Asmarasari. 2010. Optimalisasi Pemanfaatan Limbah Kulit Singkong Menjadi Pakan Ternak Dalam Rangka Memberdayakan Pelaku Usaha Eye – Eye. *Seminar Nasional Teknologi dan Veteriner*.
- Haan, R. D. & Van Zyl, W. H. V. 2003. Enhanced Xylan Degradation and Utilisation by *Pichia stipitis* Overproducing Fungal Xylanolytic Enzymes. *Journal of Enzyme and Microbial Technology*, 33 (5): 620–628.
- Haqiqi, S. H. 2008. *Kromatografi Lapis Tipis*.
- Harborne, J. B., 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: ITB.
- Hendayana, S. 2010. *Kimia Pemisahan: Metode Kromatografi Modern dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hersoelistyorini, W., Sumanto, D., & Najih, L. 2010. Pengaruh Lama Simpan Pada Suhu Ruang Terhadap Kadar Protein Dodol Tape Kulit Ubi Kayu. *Jurnal Pangan dan Gizi Vol. 01 No 01*.
- Hespell, B. 1998. Extraction and Characterization of Hemicellulose from The Corn Fiber Produced by Corn Wet-Milling Processes. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 46: 2615-2619.
- Holme, D. J., & Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Third Edition. Singapore: Singapore Publisher Ltd.
- Hidayat, C. 2009. *Peluang Penggunaan Kulit Singkong Sebagai Pakan Unggas*. Bogor : Balai Penelitian Ternak.
- 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 and Produces exclusively Xylobiose from Xylans, a Unique Character for Industrial Applications. *J. Mol Catal B Enzym*, 27: 13-207.

- Jaeggli, W. 1975. Integrated Production of Furfural and Acetic Acid from Fibrous Residue in a Continuous Process. *Escher Wyss News*, 2: 1-15.
- Juliarti, E., & Iis, A. 2013. Optimasi Penambahan Nutrien Terhadap Kadar Protein Pada Fermentasi Pada Kulit Umbi Ubi Kayu Menggunakan *Response Surface Methods (RSM)*. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri* Vol. 2, No. 2, Halaman 25 – 32.
- Kulkarni, N., A. Shendye., & M. Rao. 1999. Molecular and Biotechnology Aspects of Xylanases. *FEMS Microbial Rev.* 23: 411 – 456.
- Kumar, P., Barret M. Diane., Delwiche J. Michael., & Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind.Eng.Chem.Res.*
- Listianingrum., Neni, D., & Abdul, H. 2013. *Kajian Pemanfaatan Kulit Singkong (Manihot utilisima) Dalam Sintesa Plastik Biodegradable Polylactic Acid (PLA) Dengan Variasi Plasticizer*. Purwokerto : Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Mansilla, H.D., J. Baeza., S. Uruzua., G. Malurana., J. Villasenor., & N. Duran. 1998. Acid - Catalyzed Hydrolysis of Rice Bull : Evaluation of Furfural Production. *I. Bioresurce Technol.* 66 : 189 – 193.
- Manz, A., Pamme, N., & Iossifidis, D. 2004. *Bioanalytical Chemistry*. Singapore: Imperial Cilage Press.
- Marlina, N. 2000. *Analisis Sianida Dalam Singkong Dengan Metode Lian dan Hamir yang Dimodifikasi*. Bogor : Balai Penelitian Ternak.
- Maulida, D., & Zulkarnaen, N. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan menggunakan Solven Campuran, n-Heksana, Aseton, dan Etanol. Skripsi. Universitas Diponegoro.
- Miller, G.R. 1959. Use of Dinitrosalicylic Reagen for Determination of Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Moura, Barata, Carvalheiro, Girio, Dias, & Esteves. 2006. In Vitro Fermentation of Xylooligosaccharides from Corn Cobs Autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Strains. *International Journal Food Science and Technology*, 40: 963-972.
- Mulja, M., & Suharman. 1995. *Analisis Instrumen*. Surabaya: Universitas Airlangga.

- Nartey, F. 1978. *Manihot esculenta* (Cassava) : Cyanogenic Ultrastructure and Seed Germination. In *Abstracts on Cassava*, Vol. 4, Series 083C – 4. C.I.A.T. Publication, Columbia.
- 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.
- Ngasifudin & Sukarsono. 2006. *Penentuan Efisiensi Pemisahan Sianida pada Pengolahan umbi Gadung (Dioscorea hispida)*.
- Pavia, L., Lampman, G., & George, S. 2001. *Introduction to Spectroscopy: a Guide for Students or Organic Chemistry*. Philadelphia : Harcourt College.
- Prabawati, S. 2011. *Inovasi Pengolahan Singkong Meningkatkan Pendapatan dan Diversifikasi Pangan*. Bogor : Sinar Tani.
- Penner, H.M. 2006. Structural Component Composition of Pacific Northwest Grass – Derived Biomass : A Survey. In *Abstract of Thesis of Duangdao Masrungson*.
- Purich, D. L., & Allinson, R. D. 2000. *Handbook of Biochemical Kinetics*. San Diego: Academic Press.
- Purwanti, S. 2005. *Pengaruh Perlakuan Terhadap Kadar Sianida (HCN) Kulit Ubi Kayu Sebagai Pakan Alternatif*. Makassar : Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- Purwono. 2009. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Unggul*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Putra, E. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*. Sumatera Utara : FIPA UNSU.
- Putri, N. 2008. *Produksi Xilitol dari Hidrolisat Tongkol Jagung oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reductase (XR)*. Skripsi. Depok : UI FMIPA.
- Ortega, V., & Octavio, L. 2006. Xylanase. *Research Singpost* 37/661 (2).
- Ratnadewi, A. A. I., Puspaningsih, N.N.T, & Naqib, M. 2007. The Utilization of Molisch Reagens as Spraying Agent for Thin Layer Chromatograms of Charbohidrate. *Proceeding of the International Conference and Workshop on Basic and Applied Science “Improving Link of Basic and Applied Science”*, Surabaya (UNAIR-RUG-KNAW-UTM), August 6-8, 2007, 4 pp.

- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., & Puspaningsih, N. N. T. 2007. Produksi dan Karakterisasi, Enzim α -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Ruyap. *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., Pia, L., & Tun Tedja,. 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*.
- Richana, N., Irawadi, T. T., Nur, M. A., Sailah, I., Syamsu, K., & Arkenan, Y. 2007. Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung. *J. Pascapanen*, 4(1): 38-43.
- Septiningrum, K., & Maelita, R. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Xilanase Dari Bacilluscirculans*. *BS, Vol.44* : 31 – 40.
- Siswoyo & Asnawati. 2007. *Analisis Spektrometri*. Jember : Universitas Jember.
- Sjostrom, E. 1981. *Wood Chemsitry Fundamentals and Applications*. New York: Academic Press.
- Sjostrom, E. 1995. *Wood Chemistry*. Jilid II. Diterjemahkan oleh Hardjono S. UGM Press, Yogyakarta.
- Skoog, West, Holler, & Crouch. 2004. *Fundamental of Analytical Chemistry*. Eighth Edition. Canada: Cengage Learning.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Kanisius: Yokyakarta.
- Sukosrono., & Ngasifudin. 2006. Penentuan Efisiensi Pemisahan Sianida Pada Pengolahan Umbi Gadung (*Dioscorea hispida*). *Seminar Nasional II SDM Teknologi Nuklir Yogyakarta* , ISSN 1978- 0176.
- 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*.

Vasquez, Allonso, Dominguez., & Parajo. 2000. Xylooligosaccharides: Manufacture and Application. *Journal Food Science and Technology*, 11: 387-393.

Yoshida, S., Satoh, T., Shimokawa, S., Oku, T., Ito, T., & Kusakabe, I. 1994. Substrate Specificity of *Strepyomyces* β -Xylanase toward Glucoxytan. *Biosci. Biotech. Biochem*, 58(6): 1041-1044.



LAMPIRAN

Lampiran A. Pembuatan Larutan dan Reagent

A.1 Pembuatan Larutan NaOH 2, 4, 8, dan 12% (b/v)

Sebanyak 2, 4, 8, dan 12 gram padatan NaOH dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur dan kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas.

A.2 Pembuatan Larutan HCl 6 M

Larutan induk HCl 12 M sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

A.3 Pembuatan Larutan H₂SO₄ 72% (v/v)

Larutan induk H₂SO₄ 98% sebanyak 73,5 mL H₂SO₄ 98% dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

A.4 Pembuatan Reagen DNS

Reagen DNS dibuat dengan cara mencampurkan bahan – bahan berikut ini:

- a. 60 ml H₂O
- b. 1 gram NaOH
- c. 18,2 gram K/Na-Tartat
- d. 1 gram DNS
- e. 0,05 gram Na-Sulfit
- f. 0,2 gram fenol
- g. Ditambah akuades hingga 100 ml

Semua bahan tersebut ditambahkan secara urut hingga benar-benar homogen.

Lampiran B. Kandungan Lignin, Air, dan HCN pada Kulit Singkong

$$\text{Kadar lignin} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Air} = \frac{b - c}{a} \times 100\%$$

Keterangan : a = berat sampel

b = berat sampel + cawan porselin sebelum dioven

c = berat sampel + cawan porselen setelah dioven

$$\text{Kadar HCN} = 396 \times \text{absorbansi (ppm)}$$

B.1 Kandungan Lignin, Air, dan HCN

Kandungan	Kadar				Standar Deviasi
	Ulangan	Ulangan	Ulangan	Rata-	
	1	2	3	rata	
Lignin (%)	20	20	18	19,33	1,15
Air (%)	6,67	7,3	8,0	7,23	0,67
HCN (ppm)	234,2	235,8	237,2	235,73	1,50

B.2 Pengurangan Kandungan HCN dengan Perendaman

Hari ke-	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata - rata	SD
1	170,22	171,44	172,33	171,89	0,91
2	131,47	132,55	130,9	131,73	0,69
3	96,23	95,22	97,01	96,12	0,73
4	87,52	86,55	88,73	87,64	0,89
5	71,68	70,99	72,31	71,65	0,54

B.3 Pengurangan Kandungan HCN dengan Pengukusan Selama 25 Menit Setelah Dilakukan Perendaman

Hari ke-	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata -rata	SD
1	138,2	137,22	139,01	138,14	0,73
2	123,95	125,01	121,9	123,62	1,29
3	67,71	65,85	67,01	66,87	0,77
4	41,97	42,23	40,55	41,58	0,74
5	23,44	23,66	22,33	23,14	0,58

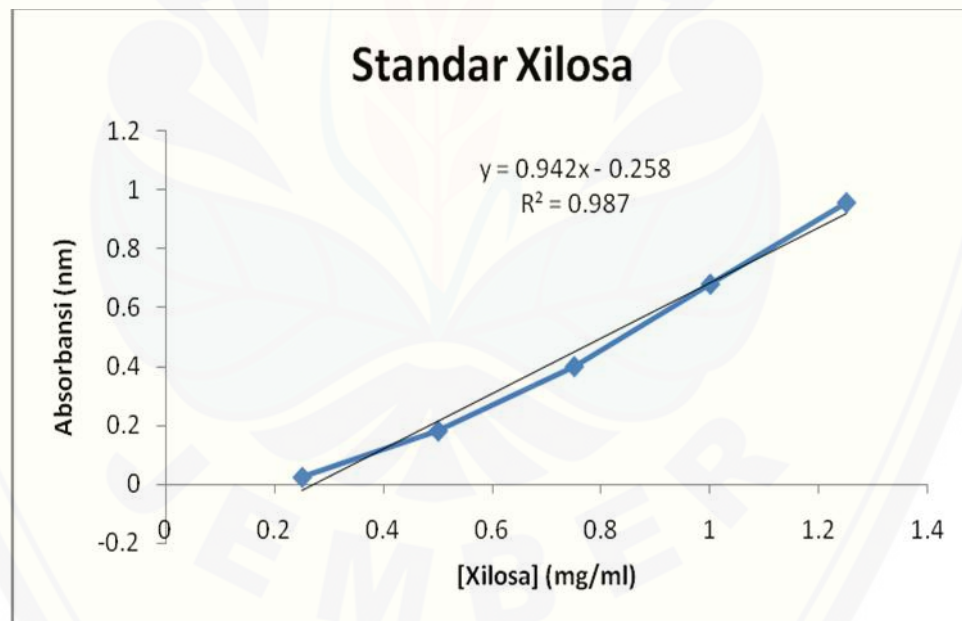
Lampiran C. Rendemen Xilan dari Kulit Singkong

$$\text{Rendemen xilan} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

Sampel		Rendemen Xilan (%)				Standar Deviasi
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata	
NaOH 2%	P.HCN D	4,2	4,4	4,0	4,2	0,2
	P.HCN.ND	7,4	7,6	7,6	7,53	0,12
	T.P.HCN D	3,4	3,6	3,6	3,53	0,12
	T.P.HCN.ND	7,2	7,4	7,6	7,4	0,2
NaOH 4%	P.HCN D	7,0	7,2	7,2	7,13	0,12
	P.HCN.ND	12,0	12,2	12,2	12,13	0,12
	T.P.HCN D	4	4,2	4,4	4,2	0,2
	T.P.HCN.ND	7,6	7,6	7,8	7,67	0,12
NaOH 8%	P.HCN D	7,8	7,8	8,0	7,87	0,12
	P.HCN.ND	13,0	13,0	13,2	13,07	0,12
	T.P.HCN D	4,8	5	5,2	5	0,2
	T.P.HCN.ND	8,6	8,8	9	8,8	0,2
NaOH 12%	P.HCN D	5,4	5,4	5,6	5,47	0,12
	P.HCN.ND	8,0	8,0	9,0	8,33	0,12
	T.P.HCN D	3,4	3,6	3,8	3,6	0,2
	T.P.HCN.ND	6,6	6,8	7	6,8	0,2

Lampiran D. Kurva Standar Xilosa pada 550 nm

Konsentrasi xilosa (mg/ml)	Absorbansi (nm)
0,25	0,024
0,5	0,182
0,75	0,4
1	0,679
1,25	0,957



Lampiran E. Produk Hidrolisis Inkubasi Xilan dari Kulit Singkong selama 16 Jam

Sampel	Absorbansi (nm)	Total Gula Pereduksi (mg/ml)		Standar Deviasi
		Sampel	Rata-rata	
P.HCN.D	0,591	2,102	2,098	0,006
	0,601	2,094		
P.HCN.ND	0,560	1,375	1,364	0,016
	0,553	1,353		
T.P.HCN.D	0,496	1,738	1,729	0,013
	0,490	1,719		
T.P.HCN.ND	0,453	1,130	1,121	0,013
	0,447	1,111		

Lampiran F. Variasi Waktu Inkubasi Endo- β -1,4-xilanase

Waktu (Jam)	Sampel	Total Gula Pereduksi (mg/mL)				Rata-rata	Standar Deviasi
		Abs 1	Abs 2	Ulangan 1	Ulangan 2		
5	P.HCN.D	0,760	0,752	1,595	1,578	1,587	0,012
	P.HCN.ND	0,365	0,372	0,861	0,883	0,872	0,016
	T.P.HCN.D	0,653	0,650	1,395	1,389	1,392	0,004
	T.P.HCN.ND	0,334	0,335	0,703	0,707	0,705	0,003
10	P.HCN.D	0,503	0,509	1,815	1,835	1,825	0,014
	P.HCN.ND	0,729	0,733	0,983	0,991	0,987	0,006
	T.P.HCN.D	0,360	0,354	1,471	1,452	1,462	0,013
	T.P.HCN.ND	0,424	0,419	0,921	0,905	0,913	0,011
20	P.HCN.D	0,650	0,645	2,380	2,360	2,370	0,014
	P.HCN.ND	0,698	0,705	1,948	1,970	1,959	0,016
	T.P.HCN.D	0,575	0,577	2,250	2,257	2,254	0,005
	T.P.HCN.ND	0,563	0,566	1,656	1,666	1,661	0,007
24	P.HCN.D	0,500	0,496	1,933	1,907	1,920	0,018
	P.HCN.ND	0,515	0,509	1,344	1,325	1,335	0,013
	T.P.HCN.D	0,443	0,451	1,757	1,783	1,770	0,018
	T.P.HCN.ND	0,496	0,501	1,267	1,283	1,275	0,011
30	P.HCN.D	0,653	0,660	1,454	1,469	1,462	0,011
	P.HCN.ND	0,689	0,691	1,170	1,174	1,172	0,002
	T.P.HCN.D	0,605	0,614	1,346	1,365	1,356	0,013
	T.P.HCN.ND	0,615	0,621	1,038	1,051	1,045	0,009

Lampiran G. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dari Total Gula Pereduksi**G.1 RAL antara P.HCN dan T.P.HCN**

Perlakuan	Ulangan		Total
	1	2	
P.HCN	2,380	2,360	4,740
T.P.HCN	2,250	2,257	4,510

P	2
U	2
FK	2.31175
JKT	19.08
JKP	19.0786
JKE	0.00022

Tabel Anova

SK	db	JK	KT	F Hitung	F tabel 5%	F tabel 1%	Keterangan
Perlakuan	1	19,1	19,1	169.965	18,513	98,503	**
<i>Error</i>	2	0,00022	0,00011				
Total	3	19,08					

G.2 RAL antara P.HCN.D dan P.HCN.ND

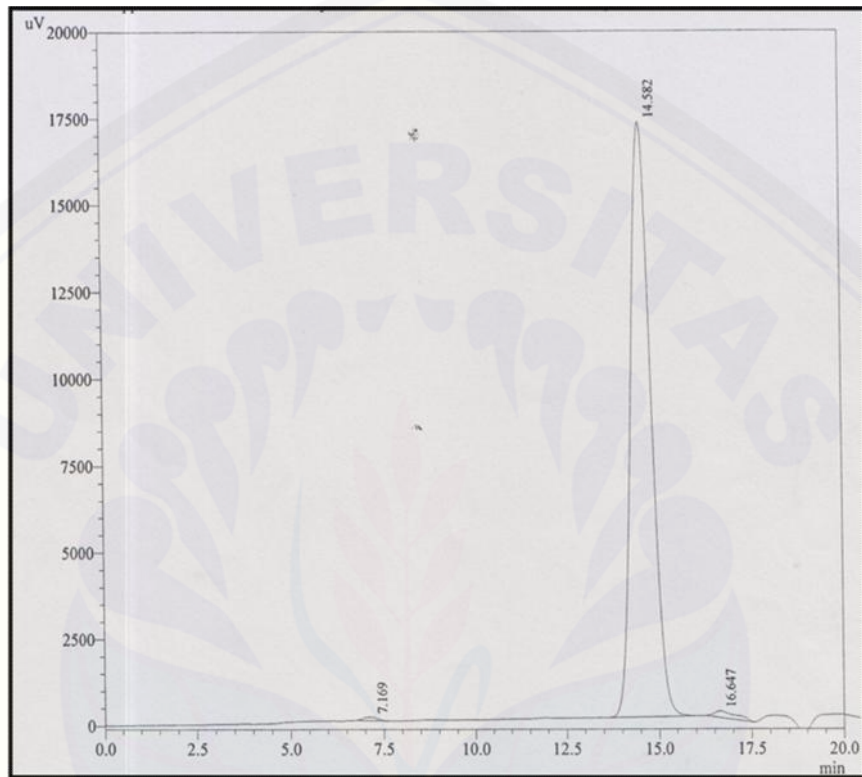
Perlakuan	Ulangan		Total
	1	2	
P.HCN.D	2,380	2,360	4,740
P.HCN.ND	1,948	1,970	3,920

P	2
U	2
FK	2,0285
JKT	14,45
JKP	14,4501
JKE	0,00027

Tabel Anova

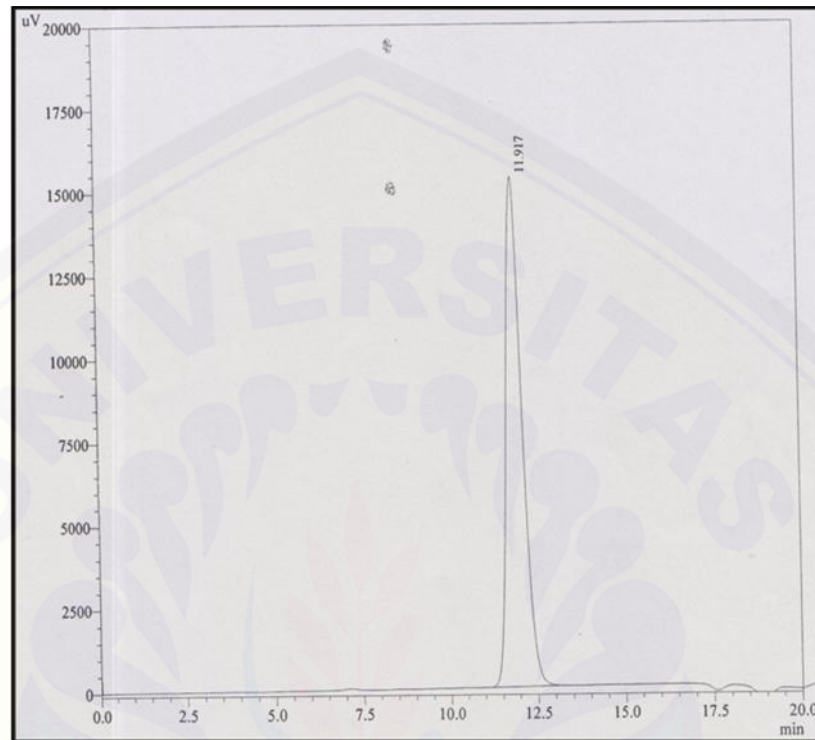
SK	db	JK	KT	F Hitung	F tabel 5%	F tabel 1%	Keterangan
Perlakuan	1	14,45	14,5	105.475	18,513	98,503	**
<i>Error</i>	2	0,00027	0,00013				
Total	3	14,45					

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Lampiran H. Kromatogram KCKT**H.1 Standar Xilosa**

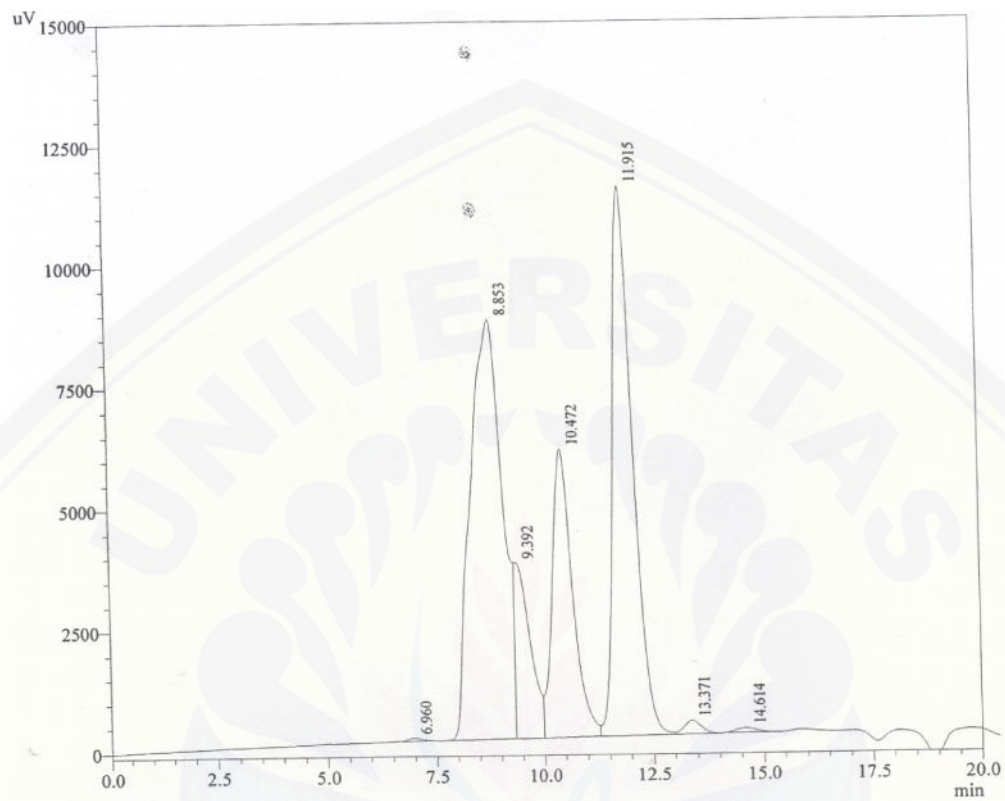
Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak	Tinggi Puncak
1	7,169	2496	99
2	14,582	644536	17130
3	16,647	7852	180
Total		654884	17409

H.2 Standar Xilobiosa

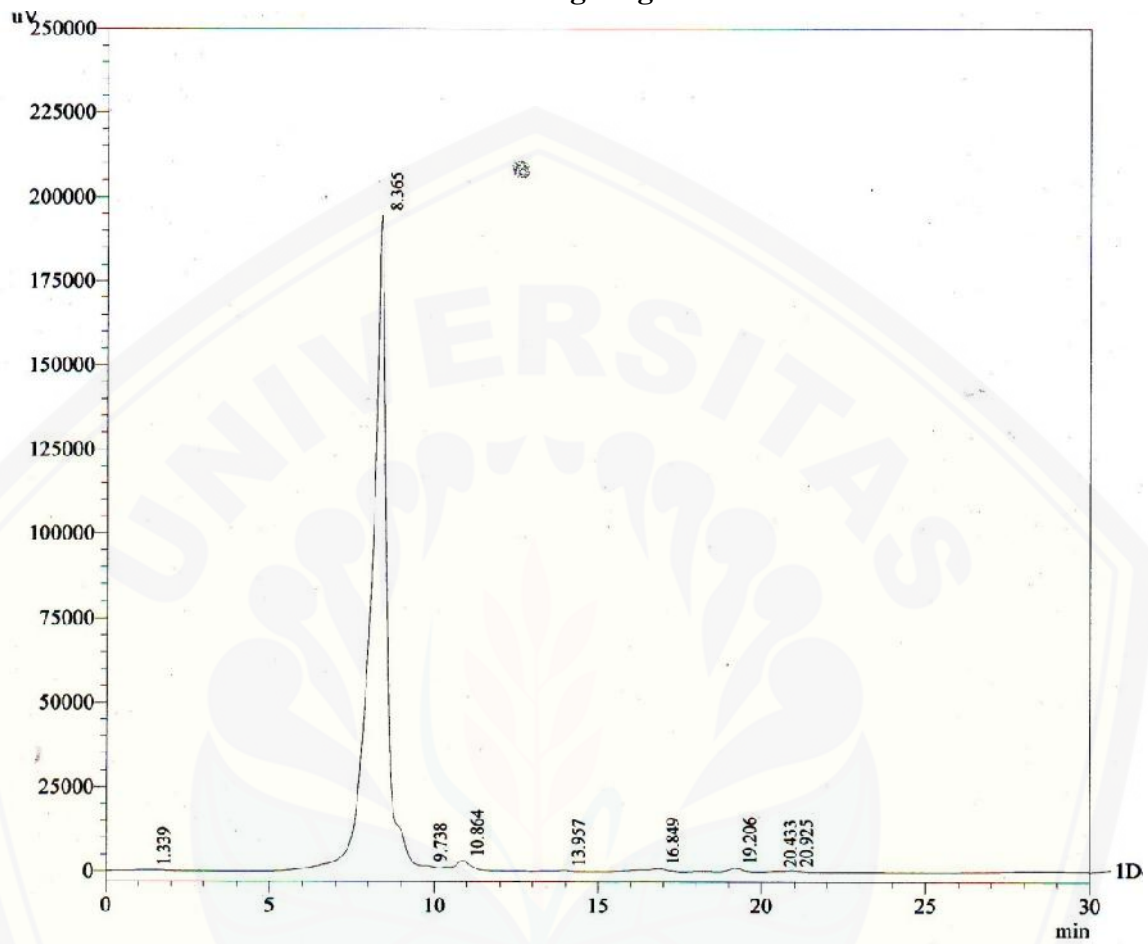


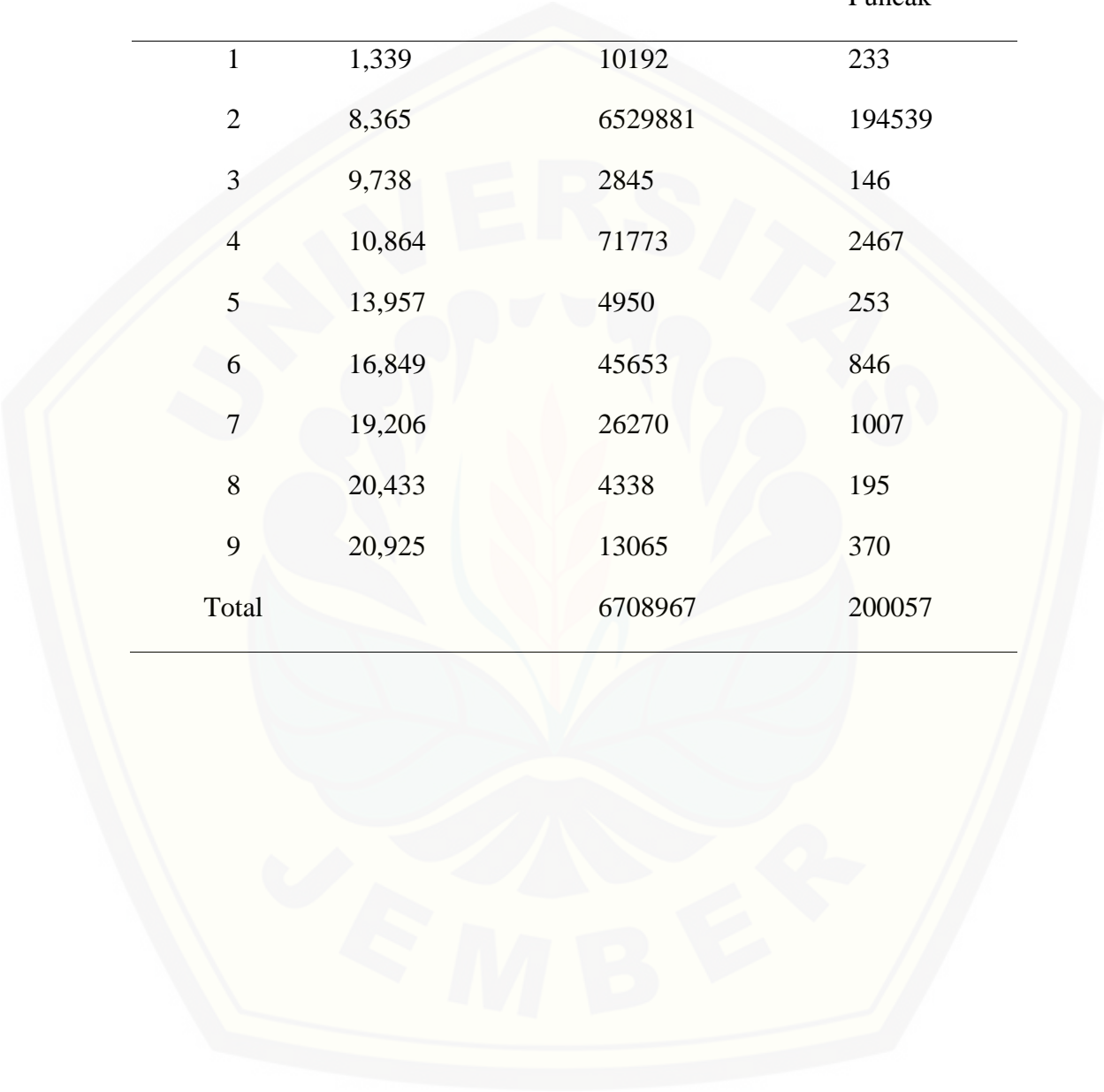
Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak	Tinggi Puncak
1	11,917	484622	15277
Total		484622	15277

H.3 Standar Xilooligosakrida



Puncak	Waktu retensi	Luas puncak	Tinggi puncak
1	6.960	1198	60
2	8.853	439519	8630
3	9.392	88987	3625
4	10.472	194921	5930
5	11.915	360389	11303
6	13.371	7130	273
7	14.614	2744	90
Total		1094888	29909

H.4 Hasil Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong



Puncak	Waktu Retensi	Luas puncak	Tinggi Puncak
1	1,339	10192	233
2	8,365	6529881	194539
3	9,738	2845	146
4	10,864	71773	2467
5	13,957	4950	253
6	16,849	45653	846
7	19,206	26270	1007
8	20,433	4338	195
9	20,925	13065	370
Total		6708967	200057

Lampiran I. Perhitungan Kadar Hasil Hidrolisis**I.1 Standar Xilooligosakarida**

Jenis standar XO	Waktu retensi standar (min)	Luas puncak standar	Kadar standar (ppm)
X5	8,853	439519	401,43
X4	9,392	88987	81,27
X3	10,472	194921	178,03
X2	11,917	484622	1000
X1	14,582	644536	1000

I.2 Kadar Hasil Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong

$$\text{Kadar sampel (ppm)} = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times \text{kadar standar (ppm)}$$

Jenis Standar	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak	Kandungan (ppm)
X5	8,365	6529881	5963,99
X4	9,738	2845	2,59
X3	10,864	71773	65,55
X1	13,957	4950	7,67