

SKRIPSI

**ISOLASI KHAMIR POTENSIAL DARI TANAH PERKEBUNAN TEBU
DAN LIMBAH BLOTONG PABRIK GULA DALAM FERMENTASI
XILOSA MENJADI XILITOL**

Disusun dan diajukan oleh

PARAMITA SUDIRMAN

H041171012



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI KHAMIR POTENSIAL DARI TANAH PERKEBUNAN TEBU DAN LIMBAH BLOTONG PABRIK GULA DALAM FERMENTASI XILOSA MENJADI XILITOL

Disusun dan diajukan oleh

**PARAMITA SUDIRMAN
H041171012**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin pada tanggal 3 Mei 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

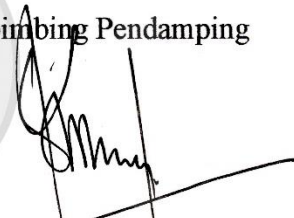
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



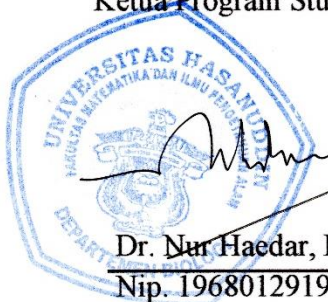
Dr. Nur Haedar, M.Si
Nip. 196801291997022001

Pembimbing Pendamping



Drs. As'adi Abdullah, M.Si
Nip. 196203031989031007

Ketua Program Studi Biologi,



Dr. Nur Haedar, M.Si
Nip. 196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : PARAMITA SUDIRMAN
NIM : H041171012
Program Studi : BIOLOGI
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul: **“Isolasi Khamir Potensial Dari Tanah Perkebunan Tebu Dan Limbah Blotong Pabrik Gula Dalam Fermentasi Xilosa Menjadi Xilitol”** adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemungkinan hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 3 Mei 2021

Yang menyatakan,



Paramita Sudirman

KATA PENGANTAR



Alhamdulillahirabbil'aalamin, segala puji dan syukur tak henti-hentinya kita panjatkan kepada Allah *Subhaanahu wa Ta'ala*, yang telah memberikan segala rahmat dan nikmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Isolasi Khamir Potensial dari Tanah Perkebunan Tebu dan Limbah Blotong Pabrik Gula dalam Fermentasi Xilosa menjadi Xilitol”. Tak lupa pula shalawat serta salam senantiasa kita kirimkan kepada baginda Rasulullah Muhammad *Shallallahu 'alaihi wa sallam*, seorang manusia yang sempurna akhlak dan budi pekertinya, seorang yang paling mulia dan telah menjadi tauladan terbaik bagi seluruh umat manusia, serta kepada keluarga beliau, Sahabat, Tabi'in dan Athba'ut Tabi'in hingga qadar-qadar Allah berlaku kepada diri-diri mereka.

Penulis menyadari tulisan ini masih jauh dari kata sempurna, akan tetapi penulis telah berusaha sebaik mungkin untuk menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat kelulusan program Sarjana S1 Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Penulis mengucapkan banyak cinta dan terima kasih sebesar-besarnya kepada orang tua penulis Bapak Sudirman Abidin dan Ibu Nursiah karena atas do'a dan dukungannya lah telah menjadi dorongan terbesar sehingga penulis bisa sampai di tahap ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kakak tercinta Irma Sulistiawati Sudirman, A.Md. Far., telah mendukung dan memotivasi penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini. Semoga pencapaian ini bisa menjadi hadiah terindah dan menjadi salah satu bentuk persembahan terbaik yang bisa diberikan penulis kepada keluarga tercinta.

Kepada Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku pembimbing utama dan Bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan dorongannya dengan kritik dan saran yang membangun, serta terus memberi motivasi kepada penulis untuk melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk membimbing penulis hingga skripsi ini bisa selesai. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina P., M.A., selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Dr. Eng. Amiruddin, M.Sc., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi,
3. Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si., selaku Wakil Dekan III Bidang Kemahasiswaan dan Alumni yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus.
4. Dr. Nur Haedar, M.Si., selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin karena telah memberi ilmu, dukungan, saran dan motivasi kepada penulis.
5. Drs. Muhtadin Asnady S., M.Si. selaku Dosen Penasihat Akademik (PA) sekaligus dosen penguji dan Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku dosen penguji
6. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah memberikan ilmunya dengan tulus dan ikhlas kepada penulis selama perkuliahan. Serta seluruh staff pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis dalam mengurus administrasi.

7. Kakak-kakak di Laboratorium Mikrobiologi. Fuad Gani, S.Si., Heriadi S.Si, M.P., Muh. Syahdan, S.Si., Riuh Wardani, S.Si., karena telah banyak membantu melancarkan kegiatan penelitian dan memberi saran kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.
8. Teman-teman peneliti xilitol yang tercinta, Ayu Mitha Lestari dan Veni Apriliani yang telah menemani, mendukung dan memotivasi penulis untuk segera menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
9. Sahabat Drama Kampus: Nurindah Rezky, Nurul Afia Abd. Majid, Eka Tri Ana dan Dian Ramadhani, karena telah menjadi motivator terbaik untuk segera sampai ke tahap ini. Terima kasih atas dukungan dan sarannya selama ini.
10. Sahabat sekaligus keluarga Istiqomah Squad: Nur Eka Sukma, Desi Andriani Fais, Eka Fitriani, Asmira, Kharismayanti Kahar, Risda, Ainun Rahmi Tito, dan Nur Sakinah, karena telah menjadi sahabat yang senantiasa mendoakan, menasihati, memotivasi dan mendukung penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
11. Sahabat Andi Mauliana, S. Stat. dan keluarga, karena telah memberikan dukungan dan yang terpenting karena telah banyak membantu dan menemani penulis mengambil sampel penelitian.
12. Keluarga di Kompleks Pabrik Gula Bone, Arasoe: Om Jamal, Tante Pia, Kakak Halim, Kakak Nini, Tante Yuli, Mama Asdir, Tante Ati, Puang Enna, terima kasih karena telah membantu peneliti selama proses pengambilan sampel penelitian dan mengurus segala administrasi pengambilan sampel.
13. Teman-teman Biologi 2017 karena telah memberi dukungan terkhusus saudara Saraswati, Masykur, Rofli Nur Irsya, S.Si., dan Donny Suherman, S.Si., karena telah banyak membantu selama proses penelitian.

14. Keluarga besar Pu Saleng dan Pu Jibe, atas do'a dan dukungannya.
15. Keluarga besar Mushalla Istiqamah BEM FMIPA Unhas Periode 2018/2019 & 2019/2020 karena telah memberikan doa dan semangat kepada penulis.
16. Murabiyyah Kakak Tri Nelsi Handayani karena telah menjadi kakak sekaligus guru yang senantiasa memotivasi dan menasihati penulis, serta teman-teman Tarbiyah Ummu Aiman 13: Tenri Fachriani, Alya Hilda Saifuddin, Nurhaedah, Musdalifah, Nur Aqila Ismail, Fitri, Uswah Mufidah, Nurmila, Rifqiyanti Ismi, Dwi Nur Apri Andini dan Julia Indah.
17. Keluarga besar Syahidah UKM LDK MPM UNHAS Periode 2019
18. Keluarga besar FSUA Periode 2020
19. Keluarga besar HIMBIO FMIPA UNHAS
20. Keluarga besar BEM FMIPA UNHAS

Semoga bantuan dan dukungan dari segala pihak dapat bernilai pahala disisi Allah *Subhaanahu wa ta'ala*. Penulis sangat berharap semoga penelitian dan tulisan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, 3 Mei 2021



Penulis

ABSTRAK

Xilitol merupakan gula pentosa yang memiliki banyak manfaat. Produksi xilitol secara bioteknologi lebih menjanjikan karena dalam produksinya hanya memanfaatkan khamir fermentatif xilosa. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir yang diisolasi dari tanah perkebunan tebu dan limbah blotong Pabrik Gula dan mengetahui kemampuannya dalam memfermentasi xilosa menjadi xilitol. Sampel tanah dan blotong diambil pada kedalaman 1-10 cm. Isolasi khamir dilakukan dengan menumbuhkan pada media YMA yang telah ditambahkan kloramfenikol 0.1% dan kemudian dimurnikan sebanyak dua kali ulangan, selanjutnya dilanjutkan dengan pengamatan morfologi koloni dan sel. Sebanyak 8 isolat khamir dari tanah dan 6 isolat dari blotong diskriminasi pada media YPX *Agar* dan Xilosa *Broth* dengan konsentrasi xilosa 3% untuk melihat kemampuannya tumbuh pada media xilosa. Isolat T₄ dan B₄ dipilih untuk uji fermentasi karena memiliki pertumbuhan terbaik pada xilosa *broth* yang ditunjukkan dengan nilai OD tertinggi. Selama proses fermentasi dengan komposisi xilosa 5% dilakukan perhitungan total khamir dan pengukuran pH setiap jam ke- 0, 24, 48 dan 72. Hasil fermentasi selama 72 jam selanjutnya diukur kadar xilosa yang digunakan dan xilitol yang terbentuk menggunakan HPLC/UPLC. Hasil penelitian ini menunjukkan dari 14 isolat khamir yang diisolasi hanya 6 khamir dari tanah dan 1 khamir dari blotong yang memiliki kemampuan mengonsumsi xilosa. Berdasarkan pengukuran kadar xilitol yang terbentuk diperoleh hasil pada isolat T₄ dan B₄ yaitu 2 g/100mL dan 2.47 g/100 mL dengan *yield* xilitol T₄ dan B₄ yaitu 0.66 g/g dan 0.64 g/g sehingga kedua isolat yang diisolasi dari tanah dan blotong memiliki kemampuan menghasilkan xilitol.

Kata Kunci: Khamir, Tanah Perkebunan, Limbah Blotong, Xilosa, Xilitol

ABSTRACT

Xylitol is a pentose sugar that has many benefits. Biotechnology production of xylitol is more promising because in its production it only uses the fermentative xylose yeast. This study aims to obtain yeast isolates were isolated from sugarcane plantation soil and sugar press mud (SPM) waste and determine its ability to ferment xylose to xylitol. Soil and SPM samples were taken at a depth of 1-10 cm. Isolation of yeast was carried out by growing on a YMA medium that had been added with 0.1% chloramphenicol and then purified two times, followed by observation of colony and cell morphology. A total of 8 yeast isolates from soil and 6 isolates from SPM were screened on YPX Agar and Xylose Broth medium with 3% xylose concentration to see their ability to grow on xylose medium. Isolates T₄ and B₄ were selected for the fermentation test because they had the best growth in xylose broth, which was indicated by the highest Optical Density value. During the fermentation process with a composition of 5% xylose, the total yeast was calculated, and pH measurement every 0, 24, 48, and 72 hours. The fermentation results for 72 hours were then measured for the levels of xylose used and xylitol formed using HPLC/UPLC. The results of this study showed that out of 14 yeasts were isolated only 6 yeasts from the soil and 1 yeast from SPM could consume xylose. Based on the measurement of the xylitol content formed, the results obtained in T₄ and B₄ isolates were 2 g/100mL and 2.47 g/100 mL with T₄ and B₄ xylitol yields of 0.66 g/g and 0.64 g/g so that the two yeasts were isolated from soil and SPM could produce xylitol.

Keywords: Yeast, Plantation Soil, Sugar Press Mud (SPM), Xylose, Xylitol

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	3
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Tanah Perkebunan Tebu.....	5
II.2 Blotong (<i>Sugar Press Mud</i>).....	5
II.3 Khamir.....	7
II.3.1 Khamir Tanah.....	7
II. 4 Xilosa	9
II. 5 Xilitol	10

II.6 Produksi Xilitol Secara Kimiawi.....	12
II.7 Produksi Xilitol Secara Bioteknologi.....	14
II.7.1 Metabolisme Khamir Fermentatif Xilosa.....	14
II.7.2 Faktor Yang Mempengaruhi Produksi Xilitol.....	15
BAB III METODE PENELITIAN	19
III.1 Alat dan Bahan.....	19
III.1.1 Alat.....	19
III.1.2 Bahan	19
III.2 Prosedur Kerja	19
III.2.1 Tahap Persiapan	19
III.2.1.1 Sterilisasi Alat.....	19
III.2.1.2 Pembuatan Media	20
III.2.1.3. Pengambilan Sampel.....	21
III.2.2 Isolasi Khamir dari Tanah.....	21
III.2.3 Pemurnian	21
III.2.4 Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel Khamir	22
III.2.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni Khamir	22
III.2.4.1 Pengamatan Morfologi Sel Khamir	22
III.2.5 Skrining Khamir Fermentatif Xilosa	22
III.2.6 Uji Fermentasi Xilosa Menjadi Xilitol.....	23
III.2.6.1 Pembuatan Prakultur Isolat Khamir.....	23
III.2.6.2 Persiapan Inokulum	23
III.2.6.3 Fermentasi Xilosa	23
III.2.7 Pengukuran Hasil Fermentasi	24

III.2.7.1 Perhitungan Total Khamir	24
III.2.7.2 Pengukuran pH	24
III.2.7.3 Pengukuran Kadar Xilosa dan Xilitol Akhir.....	24
III.2.8 Analis Data.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
IV.1 Isolasi Khamir dari Tanah dan Blotong.....	26
IV.1.2 Isolasi Khamir dari Tanah.....	26
IV.1.1 Isolasi Khamir dari Limbah Blotong	27
IV.2 Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel	28
IV.3 Skrining Khamir Fermentatif Xilosa	32
IV.4 Uji Fermentasi Xilosa menjadi Xilitol.....	34
IV.4.1 Perhitungan Total Khamir	35
IV.4.2 Pengukuran pH	36
IV.5 Analisis Hasil Fermentasi	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	40
V.1 Kesimpulan	40
V.2 Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen Limbah Blotong	6
2. Sifat Fisik Xilitol.....	11
3. Morfologi Koloni dan Sel Isolat dari Tanah	28
4. Morfologi Koloni dan Sel Isolat dari Blotong	30
5. Pertumbuhan Khamir pada Media YPXA	32
6. Analisis Hasil Fermentasi	37
7. Hasil Perhitungan Total Khamir Fermentasi	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Skema Penyebaran Khamir Tanah.....	8
2. Struktur Kimia Xilosa	9
3. Struktur Kimia Xilitol	11
4. Skema Produksi Xilitol secara Kimiawi dari Bahan Lignoselulosa	13
5. Jalur Metabolisme Xilosa	15
6. Hasil Isolasi dari Tanah.....	26
7. Hasil Isolasi dari Blotong.....	27
8. Morfologi Koloni Khamir dari Tanah.....	29
9. Morfologi Sel Khamir dari Tanah.....	30
10. Morfologi Koloni Khamir dari Blotong.....	31
11. Morofologi Sel Khamir dari Blotong.....	31
12. Pertumbuhan Khamir pada YPXA setelah Inkubasi 48 jam.....	33
13. Grafik Pengukuran Nilai OD pada Media Skrining Xilosa <i>Broth</i>	34
14. Grafik Pertumbuhan Total Khamir Fermentasi	35
15. Grafik Perubahan pH Kultur Fermentasi	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Isolasi Khamir Potensial dari Tanah Perkebunan Tebu dan Limbah Blotong dalam memfermentasi xilosa	49
2. Skema Kerja Isolasi dan Pengamatan Morfologi Khamir	50
3. Skema Kerja Skrining Khamir Pengonsumsi Xilosa	51
4. Skema Kerja Uji Fermentasi Xilosa Menjadi Xilitol.....	52
5. Pengukuran Kadar Xilosa Mnegggunakan HPLC	53
6. Pengukuran Kadar Xilitol Menggunakan UPLC ELSD	54
7. Hasil Perhitungan.....	56
8. Foto Prosedur Penelitian	57
9. Gambar Hasil Skrining Media YPXA	59
10. Gambar Hasil Skrining Media Xilosa <i>Broth</i>	60
11. Gambar Kultur Fermentasi.....	61

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Xilitol merupakan gula alkohol berkarbon lima yang memiliki tingkat rasa manis mirip dengan sukrosa, akan tetapi dengan kalori yang lebih rendah yaitu 2.4 Cal/g sedangkan sukrosa 4 Cal/g. Xilitol memiliki banyak manfaat seperti sebagai gula alternatif untuk penderita diabetes karena tidak melibatkan insulin pada proses metabolisme di dalam tubuh. Selain itu xilitol juga dapat mencegah otitis, osteoporosis, proses inflamasi dan mencegah karies serta meningkatkan kesehatan mulut karena xilitol dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang menyebabkan plak pada gigi (Sasaki *et al.*, 2010; Kusumaningsari dan Handajani, 2011; Pal *et al.*, 2013). Sehingga saat ini produksi xilitol telah banyak dikembangkan dan memiliki daya tarik yang tinggi.

Produksi xilitol dilakukan dengan hidrogenasi katalitik dari larutan D-xilosa murni di bawah suhu dan tekanan tinggi. Proses ini memerlukan biaya yang sangat tinggi dan boros energi. Salah satu strategi produksi xilitol dengan biaya lebih murah dan lebih efektif yaitu secara bioteknologi dengan memanfaatkan mikroorganisme. Diantara mikroorganisme pengguna xilosa yang diketahui, khamir merupakan produsen xilitol terbaik dan telah dipelajari secara ekstensif dibandingkan mikroorganisme lain (Guo *et al.*, 2006; Dasgupta *et al.*, 2017). Khamir memiliki kemampuan mengkonversi xilosa menjadi xilitol karena memiliki enzim *Xylose Reductase* (XR). Beberapa jenis khamir seperti *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida magnolia*, *Debaryomyces hansenii*, dan *Pichia assignitis* diketahui memiliki kemampuan memproduksi xilitol (Kumar *et al.*, 2015).

Salah satu habitat khamir yang telah banyak diketahui yaitu tanah. Keberadaan khamir pada tanah sangat melimpah terutama pada tanah perkebunan tebu. Tanah perkebunan tebu merupakan habitat yang cocok untuk pertumbuhan khamir karena kaya akan bahan organik yang berasal dari penguraian serasah tanaman tebu yang juga merupakan sumber nutrisi bagi mikroorganisme (Botha, 2011).

Di sisi lain, keberadaan limbah buangan pabrik gula di sekitar lahan perkebunan tebu dan di lingkungan masyarakat masih banyak ditemui. Limbah pabrik gula dapat berupa buangan padat, cair maupun gas. Limbah padat berupa blotong, abu tungku, abu terbang, dan ampas tebu (*bagasse*). Limbah tersebut dapat menyebabkan pencemaran lingkungan apabila tidak dikelola dengan benar (Dharma dkk. 2017; Fangohoy dan Wandansari, 2017). Limbah blotong merupakan salah satu limbah yang masih belum dimanfaatkan dengan baik ternyata masih mengandung elemen nutrisi seperti Na, K, Ca, fosfor dan kandungan gula sekitar 5-15% serta masih mengandung bahan organik yang tinggi yaitu sekitar 50%. Kandungan bahan organik tersebut juga dapat meningkatkan aktivitas mikroorganisme (Baig *et al.*, 2002; Gupta *et al.* 2011; Juradi dkk., 2020)

Keberadaan bahan-bahan organik pada tanah dan blotong dapat menjadi sumber nutrisi bagi khamir. Beberapa penelitian melaporkan keberadaan khamir pada tanah dan blotong. Pada tanah banyak ditemukan khamir yang berkaitan dengan penyuburan tanah seperti genus *Candida*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Brettanomyces*, dan *Debaryomyces*. Namun pada umumnya khamir sering ditemukan di tanah yaitu dari genus *Candida*. Karakteristik yang umum terjadi di antara spesies khamir tanah adalah khamir yang memiliki kemampuan memanfaatkan D-xilosa (Botha, 2011; Jumiayati dkk., 2012; Kanti dan Latupapua,

2018). Sedangkan pada blotong ditemukan khamir jenis *Candida tropicalis* (de Oliveira *et al.*, 2016). Beberapa jenis khamir tersebut telah diketahui merupakan jenis khamir dapat mengkonsumsi xilosa (Rose dan Harrison, 2012). Selain itu eksplorasi khamir dari tanah dan blotong untuk memproduksi xilitol masih jarang dilakukan dan perlu dikembangkan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini untuk mendapatkan khamir dari tanah perkebunan tebu dan limbah blotong yang memiliki potensi untuk memfermentasi xilosa menjadi xilitol.

I.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. mendapatkan isolat khamir fermentatif xilosa dari tanah perkebunan tebu dan limbah blotong Pabrik Gula.
2. mengetahui kemampuan khamir hasil isolasi dari tanah perkebunan tebu dan limbah blotong Pabrik Gula dalam melakukan aktivitas fermentasi xilosa menjadi xilitol.

I.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi kepada masyarakat keberadaan dan kemampuan khamir hasil isolasi dari tanah perkebunan tebu dan limbah blotong Pabrik Gula dalam melakukan aktivitas fermentasi xilosa menjadi xilitol.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 – Januari 2021 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar dan pengujian kadar xilitol

menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)/ *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor, Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tanah Perkebunan Tebu

Tanaman tebu merupakan tanaman penghasil bahan baku gula yang tumbuh di daerah beriklim tropis. Tebu dapat tumbuh pada ketinggian 0-1400 mdpl dan berbagai jenis tanah seperti grumosol, aluvial, latosol, dan regosol (Rahma et al., 2020). Struktur tanah yang baik untuk perkebunan tebu yaitu tanah yang gembur sehingga mempermudah proses aerasi dan perakaran tebu akan berkembang dengan baik. Tekstur tanah yang ideal bagi pertumbuhan tanaman tebu yaitu perbandingan berupa lempung, debu dan liat serta tekstur tanah yang ringan sampai yang berat dengan porositas 30%. pH tanah perkebunan yang baik untuk pertumbuhan tebu yaitu pH 6 - 7.5 (PPP, 2012)

Dalam budidaya pertanian kandungan bahan organik pada tanah mempunyai peranan penting karena dapat memelihara kesuburan fisika, kimia maupun biologi tanah (Dumipto dkk., 2019). Pemanfaatan limbah proses produksi gula tinggi dapat menjadi alternatif menyuburkan tanah pertanian. Beberapa jenis limbah pabrik gula seperti blotong, abu ketel, molase, limbah cair. Tanah perkebunan tebu memanfaatkan limbah pabrik gula seperti blotong, *bagasse* dan abu sebagai pupuk organik (Bramsista dkk., 2015).

II.2 Blotong (*Sugar Press Mud*)

Blotong merupakan limbah industri gula yang dihasilkan dari proses penyaringan sari tebu. Blotong dihasilkan selama pemurnian gula dengan proses karbonasi atau sulfitasi. Kedua proses tersebut memisahkan jus tebu di atas dan

blotong di bawah. Secara umum, ketika 100 ton tebu dihancurkan, sekitar 3 ton blotong dihasilkan sebagai produk sampingan. Limbah industri tebu dianggap sebagai limbah buangan yang menyebabkan masalah penyimpanan dan pencemaran di sekitar pabrik gula pada akumulasinya. Jumlah blotong tergantung pada proses karbonasi dan sulfitasi; masing-masing adalah 7-9 dan 3-5% dari total berat tebu. Blotong mengandung sejumlah besar zat besi, mangan, kalsium, magnesium, silikon, dan fosfor, dan meningkatkan kesesuaian blotong sebagai sumber nutrisi (Dotaniya *et al.*, 2016).

Tabel 1. Komponen Limbah Blotong (Diaz, 2016)

No.	Nutrien	Jumlah/100g blotong (%)
1	Senyawa Organik	50
2	Kalsium	11
3	Fosfat	2-3
4	Potasium	1-2
5	Nitrogen	1
6	Sulfur	0.3
7	Besi	0.05

Beberapa penelitian telah menunjukkan beberapa pemanfaatan limbah blotong. Blotong dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan biogas (Kurniasari dkk., 2019), sebagai campuran dalam pembuatan media pertumbuhan jamur tiram (Purwaningsih, 2014), bahan baku pembuatan karbon (Pujiono dan Mulyati, 2017), dan paling banyak dikembangkan yaitu sebagai bahan baku pembuatan kompos (Meunchang *et al.*, 2005) karena mampu meningkatkan porositas tanah dengan kandungan bahan organik di dalamnya (Nita dkk., 2015).

Kegunaan blotong sebagai pupuk maupun kompos didasarkan pada kandungan nutrisinya (Gupta *et al.*, 2011). Blotong dapat langsung digunakan sebagai pupuk, karena mengandung unsur hara yang dibutuhkan tanah. Pemberian blotong sebanyak 100 ton ke tanaman tebu per hektar dapat meningkatkan bobot dan rendemen tebu secara signifikan. Blotong merupakan bahan yang cukup baik dijadikan sebagai bahan pupuk organik, karena bahan tersebut dapat berfungsi untuk memperbaiki kesuburan tanah melalui perbaikan tekstur tanah yang dicirikan dari sifat fisik tanah dan memperbaiki drainase tanah (Supari dkk., 2015).

II.3 Khamir

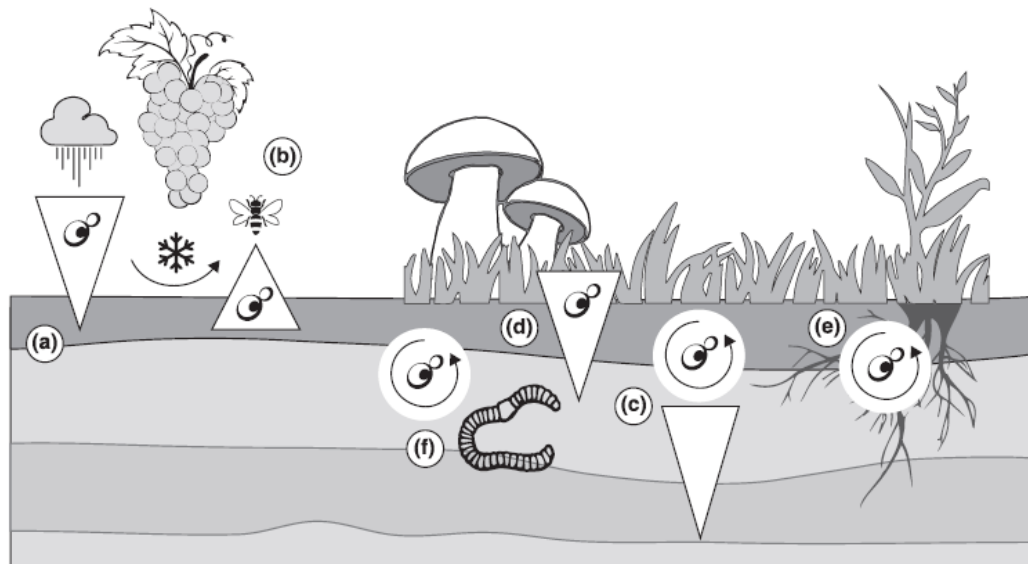
Khamir (*yeast*) adalah kelompok mikroorganisme yang termasuk dalam golongan fungi uniseluler yang sel-selnya berbentuk lonjong atau memanjang dan berkembang biak dengan membentuk koloni basah atau berlendir. Khamir berbeda dari kapang (*mould*) karena sel-sel kapang memanjang dan bercabang yang disebut hifa. Khamir (*yeast*) tumbuh dan berkembang biak dengan membentuk filament, biasa hidup sebagai saprofit maupun parasit (Charisma, 2019).

Khamir dapat dibedakan atas 2 kelompok berdasarkan sifat metabolismenya, yaitu bersifat fermentatif dan oksidatif. Khamir fermentatif merupakan khamir yang dapat melakukan fermentasi seperti memecah gula (glukosa) menjadi alkohol dan gas. Sedangkan jenis oksidatif (respirasi), dapat menghasilkan CO₂ dan H₂O (Charisma, 2019).

II.3.1 Khamir Tanah

Khamir dapat diisolasi dari berbagai tempat seperti tanah, buah-buahan, bunga, daun dan ranting tumbuhan, makanan atau minuman fermentasi (misal tape, cider, nira, tuak), selai buah, buah kering, madu, hewan, khamir pasar dan air.

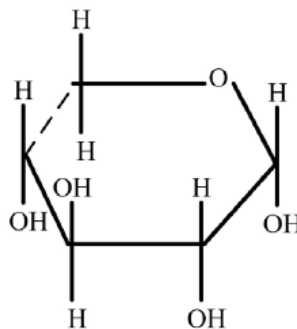
Khamir dapat ditemukan di berbagai jenis tanah, termasuk tanah masam, tanah basah, tanah vulkanik dan tanah kriogenik. Umumnya semakin dalam tanah maka jumlah khamir yang diperoleh juga sangat sedikit, sangat jarang melampaui ribuan sel per gram (Gambar 1c). Khamir akan banyak ditemukan pada tanah yang kaya akan bahan organik seperti pada lahan pertanian. Sebagian besar dari khamir tanah dapat memanfaatkan zat gula yang berasal dari hemiselulosa yaitu L-arabinosa, D-xilosa, dan selobiosa. Diversiti khamir pada tanah dipengaruhi oleh faktor lingkungan termasuk biotik dan abiotik. Respon khamir tanah pada perubahan faktor abiotik seperti kandungan materi organik dalam tanah, pH, suhu, konduktivitas, ketersediaan air dan makronutrien (N, P, K, Na, dan Mg). Selain itu kelembaban tanah atau curah hujan juga mempengaruhi jumlah khamir dalam tanah (Yurkov, 2018)



Gambar 1. Skema Penyebaran Khamir Tanah. Khamir dari buah-buahan matang dibawa ke tanah (a), hibernasi selama musim dingin dan menginokulasi buah-buahan di atas tanah (b). Khamir tanah asli berkembang biak di tanah atas, dan jumlahnya menurun di lapisan tanah yang lebih dalam (c). Kehadiran beberapa khamir terkait dengan pengendapan residu tanaman dan hewan di tanah (d). Beberapa khamir dikaitkan dengan tanaman tanah toots (e) dan invertebrata (f) (Yurkov, 2018)

II. 4 Xilosa

Xilosa merupakan penyusun utama dari hemiselulosa yang digolongkan sebagai monosakarida tipe aldopentosa yang mempunyai lima atom karbon dan satu gugus aldehyd dengan rumus molekul $C_5H_{10}O_5$ (Gambar 2) (Manalu dkk., 2020) yang merupakan penyusun utama polimer xilan tumbuhan dan sebagai salah satu karbohidrat paling melimpah kedua setelah glukosa (Huntley dan Patience, 2018). Hemiselulosa (*Poliosa*) sendiri merupakan komponen utama lignoselulosa berupa matriks polimer bercabang yang tersusun dari polisakarida xilan, glukoroxilan, glukomanan, arabinoxilan dan xiloglukan. Hemiselulosa memiliki struktur acak amorfik yang lemah sehingga sangat mudah terhidrolisis oleh asam atau basa maupun enzim hemiselulase (Susanti dan Fibriana, 2017). Hidrolisis hemiselulosa menghasilkan xilosa sebagai sumber gula, furfural, nylon 6 dan nylon 6,6 dan serat sintetis lainnya. Pemisahan selulosa, hemiselulosa dan lignin masih memberikan produk baru yaitu xilosa, furfural dan glukosa (Suharto, 2018).



Gambar 2. Struktur Kimia Xilosa

Dalam beberapa tahun terakhir, fermentasi xilosa sebagai bahan baku telah mendapat banyak perhatian, dan penggunaan biomassa lignoselulosa untuk mendapatkan xilosa merupakan teknologi yang matang. Pada 1990-an, xilosa digunakan secara luas sebagai bahan kimia penting.

Fungsi dan karakteristik utama xilosa dapat dikemukakan sebagai berikut: (1) tidak dapat diserap oleh tubuh manusia; (2) mendorong pertumbuhan bifidobakteria dan karena itu bermanfaat bagi kesehatan manusia; (3) tidak dapat digunakan oleh mikroorganisme oral; dan (4) memiliki beberapa fungsi fisiologis dari serat makanan, seperti penurun lipid, penurun kolesterol dan pencegahan kanker usus besar. Umumnya, mikroorganisme dapat memetabolisme glukosa untuk pertumbuhan, akan tetapi tidak semua mikroorganisme dapat memfermentasi xilosa (Chen dan Wang, 2016).

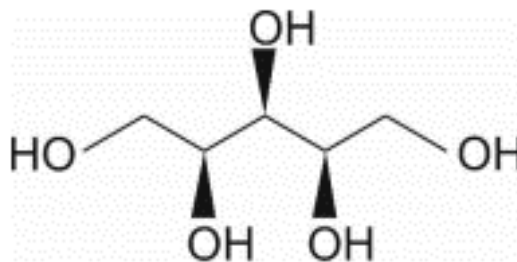
Pada umumnya xilosa akan dikonversi menjadi xilulosa oleh beberapa enzim yang dimiliki oleh beberapa mikroorganisme. Pada bakteri, xilosa dikonversi menjadi xilulosa yang biasanya dikatalis oleh enzim *xylose isomerase* (XI), sedangkan pada khamir dan jamur miselium xilosa akan dikonversi menjadi xilulosa melalui dua jalur dengan bantuan dua enzim yaitu *xylose reductase* (XR) NAD(P)H-*dependent* dan *xylose dehydrogenase* (XDR), dimana enzim XR mengubah xilosa menjadi xilitol sedangkan XDR akan mengubah xilitol menjadi xilulosa. Konsumsi xilosa pada bakteri maupun khamir akan berlanjut ke *pentose phosphate pathway*. Selain kedua mikroorganisme tersebut, *Caulobacter crescentus* juga dapat menggunakan xilosa melalui jalur α -ketoglutarat (Zhao *et al.*, 2020)

II. 5 Xilitol

Xilitol merupakan gula berantai karbon lima (Gambar 3) yang memiliki tingkat kemanisan yang setara dengan sukrosa namun memiliki kalori lebih rendah sekitar 40% dari kelompok karbohidrat lainnya (Mahyati, 2017). Xilitol memiliki rasa manis seperti gula dipasaran akan tetapi yang membedakan adalah proses

metabolisme xilitol dalam tubuh tidak berhubungan dengan insulin. Oleh karena itu, xilitol dapat digunakan sebagai alternatif pengganti gula bagi penderita diabetes. Selain itu xilitol juga dapat dimanfaatkan untuk mencegah pertumbuhan *Streptococcus mutan* yang merupakan bakteri kariogenik yang dapat mengakibatkan plak pada gigi (Acton, 2013). Xilitol dapat diperoleh dari proses reduksi xilosa yang saat ini sedang banyak dikembangkan (Roswiem, 2015)

Arcaño *et al.* (2020) menjelaskan bahwa mengonsumsi xilitol memberikan efek probiotik dengan menurunkan pH feses, akan tetapi dapat menyebabkan efek samping pada saluran pencernaan ketika dikonsumsi berlebih karena daya cerna dan penyerapan usus yang terbatas. Xilitol juga memiliki sifat emolien dan humektan yang dapat digunakan dalam kosmetik. Xilitol juga dapat mengobati infeksi pernapasan, inflamasi, osteoporosis, otitis akut, anemia hemolitik. Produk yang mengandung xilitol dapat menghambat pertumbuhan bakteri enteropatogenik yang berkontribusi mengurangi munculnya otitis akut dan gangguan nasofaring.



Gambar 3. Struktur Kimia Xilitol

Tabel 2. Sifat Fisik Xilitol (Tangri dan Singh, 2017)

Properti	Xilitol
Rumus	C ₅ H ₁₂ O ₅
Berat Molekul	152.15
Wujud	Putih, bubuk kristal
Bau	Tidak ada

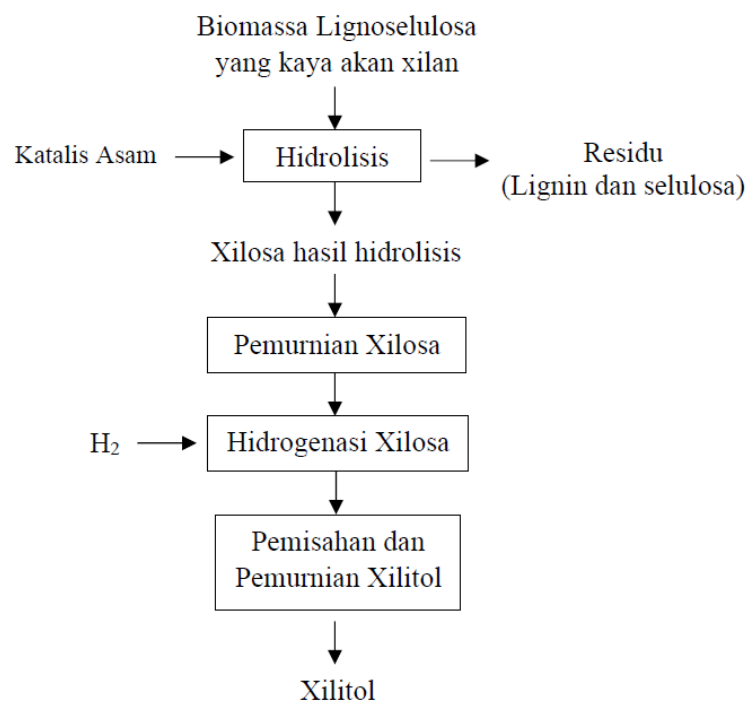
Kelarutan pada 20°C	169 g/100 g H ₂ O
pH dalam air (1 g/10 mL)	5-7
Titik Lebur (°C)	93-94.5
Titik Didih (pada 760 mmHg)	216°C
Densitas (15°C)	1.50 gL ⁻¹
Nilai Kalori 4.06 kal / g	16.88 J/g
Manisnya relatif	Sama dengan sukrosa, lebih besar dari sorbitol dan manitol.

Xilitol secara alami dapat ditemukan pada buah-buahan dan sayuran (pisang, anggur, stroberi, rasberi, selada, wortel, kembang kol, bawang, dll), serta di khamir, lumut, rumput laut, dan jamur tetapi dengan jumlah yang sangat sedikit. Dari sumber tersebut sebenarnya dapat diekstrak melalui ekstraksi padat/cair, akan tetapi proses tersebut tidak layak karena memakan biaya yang tinggi selain itu kandungan xilitol yang dihasilkan relatif rendah (I. S.M. Rafiqul dan Sakinah, 2013). Saat ini telah dipelajari dan dikembangkan beberapa metode untuk memproduksi xilitol dalam jumlah yang besar dan murah. Produksi xilitol dapat dilakukan secara kimiawi maupun bioteknologi.

II.6 Produksi Xilitol Secara Kimiawi

Xilitol dapat diproduksi dari proses reduksi hidrolisat hemiselulosa yang mengandung banyak xilosa, seperti pada tongkol jagung dan ampas tebu. Pada skala industri xilitol dapat diproduksi secara kimiawi (Acton, 2013). Produksi xilitol dengan proses kimiawi dengan menggunakan bahan lignoselulosa melalui 4 tahap: 1) Hidrolisis asam dari biomassa lignoselulosa, tujuan dari tahap ini yaitu untuk memecah struktur lignoselulosa dan mengurai hemiselulosa menjadi gula monomer dengan kisaran suhu 394-433 K. Pada tahap ini akan dihasilkan produk-produk

yang tidak diinginkan. 2) pemisahan dan pemurnian hidrolisat untuk mendapatkan xilosa murni dengan cara menghilangkan produk-produk sampingan yang tidak diinginkan. 3) hidrogenasi katalitik dari xilosa menjadi xilitol, hidrogenasi merupakan reaksi redoks, dimana dua atom hidrogen digabungkan menjadi molekul organik dengan bantuan katalis logam pada tekanan (5 MPa) dan suhu (353-413 K) yang tinggi dan 4) kristalisasi dan pemurnian xilitol untuk mendapatkan produk xilitol (Arcaño et al., 2018).



Gambar 4. Skema Produksi Xilitol secara Kimiawi dari Bahan Lignoselulosa (Arcaño et al., 2018).

Produksi xilitol secara kimiawi dapat memperoleh produk xilitol lebih tinggi akan tetapi proses ini memakan biaya yang sangat tinggi terlebih pada tahap pemurnian untuk memperoleh xilosa murni. Selain itu, proses reduksi secara kimiawi juga dapat menyebabkan permasalahan lingkungan, membutuhkan energi, tekanan dan suhu yang tinggi, serta tidak dapat memisahkan dan memurnikan xilosa dari pentosa serta heksosa seperti arabinosa dan glukosa. Tingginya harga xilitol di

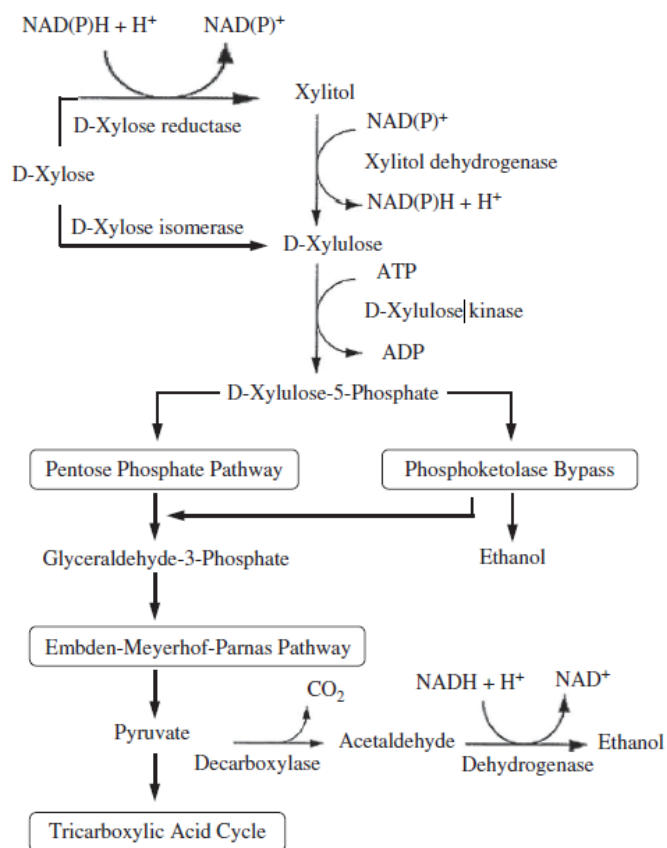
pasaran berkaitan dengan mahalanya biaya produksi xilitol (Acton, 2013; Rafiqul dan Sakinah, 2013; Hernández-Pérez *et al.*, 2019; Arcaño *et al.*, 2020).

II.7 Produksi Xilitol Secara Bioteknologi

Salah satu upaya yang dapat diterapkan untuk meningkatkan produksi xilitol selain menggunakan proses kimiawi yaitu secara bioteknologi dengan memanfaatkan mikroorganisme (Ambarsari *et al.*, 2015). Beberapa jenis mikroorganisme telah diteliti dapat dimanfaatkan dalam produksi xilitol seperti strain *Pachysolen tannophilus*, *Candida lucitaniae*, *Candida shehatae* (Rose dan Harrison, 2012). Pada umumnya khamir yang dapat mengonsumsi xilosa yaitu dari genus *Candida*. Akan tetapi Deorukhkar dan Roushani (2018). menjelaskan bahwa tidak semua khamir genus *Candida* dapat mengonsumsi xilosa. Adapun khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang umum digunakan memang baik dalam memfermentasi gula utama seperti glukosa, fruktosa, sukrosa dan maltosa, namun tidak mampu memfermentasi gula pentosa dan gula heksosa seperti xilosa dan arabinosa (umumnya berasal dari biomassa lignoselulosa), sehingga strain liar *S. cerevisiae* kurang cocok digunakan dalam memproduksi xilitol (Hidayat *et al.*, 2018). Disisi lain, saat ini telah banyak dikembangkan *S. cerevisiae* rekombinan sehingga xilosa dapat dikonsumsi dan diubah menjadi xilitol (Ahuja *et al.*, 2018).

II.7.1 Metabolisme Khamir Fermentatif Xilosa

Metabolisme khamir memfermentasi xilosa melibatkan enzim *xylose reductase* (XR) *NADPH-dependent* atau *NADP-dependent* yang hanya dimiliki oleh beberapa spesies khamir (Cadete *et al.*, 2012; Veras *et al.* 2017)



Gambar 5. Jalur Metabolisme Xilosa (Rafiqul dan Sakinah, 2013).

Pada khamir penghasil xilitol, xilosa diubah menjadi xilitol baik oleh NADPH atau NADH-*dependent* XR. Kemudian dilepaskan dari sel mikroba atau mengalami oksidasi menjadi xilulosa oleh NADP⁺- atau NAD⁺-linked *xylitol dehydrogenase* (XDH). Kedua reaksi dipilih sebagai langkah pembatas laju untuk metabolisme xilosa dan produksi xilitol. Mengkatalisis fosforilasi xilulosa menjadi xilulosa-5-fosfat (X5P) dan selanjutnya produk yang dihasilkan dapat memasuki jalur Pentosa Fosfat (PPP) (Rafiqul dan Sakinah, 2013)

II.7.2 Faktor Yang Mempengaruhi Produksi Xilitol

Proses fermentasi yang menghasilkan xilitol dalam khamir dikendalikan oleh rangkaian faktor-faktor seperti: konsentrasi substrat, sumber karbon, co-substrat, inoculum, derajat aerasi, suhu dan pH.

II.7.2.1 Konsentrasi Xilosa

Konsentrasi xilosa antara 100 – 150 g/L dapat menghambat produksi xilitol karena adanya penimbunan hasil metabolisme. Kenaikan konsentrasi xilosa akan menyebabkan penurunan kecepatan pertumbuhan organisme, kecuali aerasi ditingkatkan. Konsentrasi substrat yang rendah dapat menurunkan hasil produksinya karena substrat tersebut sebagian digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel (Diana dan Lasmini, 2016). Menurut Wahyuni dkk. (2004) kandungan xilosa dalam media produksi dalam jumlah yang cukup sangat penting karena xilosa merupakan aldopentosa dengan rumus $C_5H_{10}O_5$ sehingga memiliki fungsi sebagai sumber karbon yang berguna dalam metabolisme sel khamir yaitu dalam pembentukan energi dan pertumbuhan bagi sel khamir.

II.7.2.2 Sumber Karbon dan Nitrogen

Penggunaan D-glukosa sebagai substrat dalam konsentrasi rendah, mengarah pada peningkatan efisiensi produksi. Efek ini dapat dijelaskan oleh fakta bahwa D-glukosa digunakan dalam pertumbuhan sel, D-xilosa hanya dikonsumsi setelahnya. Di antara sumber nitrogen, ekstrak khamir dan urea adalah nutrisi yang disukai oleh khamir yang memproduksi xilitol (Ghindea *et al.*, 2010). Penambahan $(NH_4)_2SO_4$ merupakan sumber nitrogen dan dapat membantu penyerapan xilosa (Ambarsari *et al.*, 2015), KH_2PO_4 merupakan sumber fosfor, dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sebagai sumber nutrisi. Menurut Wachid and Mutia (2019) unsur makronutrien seperti C, N, K, P dan Mg serta unsur mikronutrien seperti Fe, Mg, Zn mempengaruhi pertumbuhan khamir untuk menunjang penggandaan sel.

II.7.2.3 Kondisi Aerasi

Aerasi memegang peranan penting dalam mengakumulasi xilitol karena berkaitan dengan aktivitas metabolisme dari enzim *Xylose Reductase* (XR) (Azizah,

2019). Oksigen merupakan faktor penting dalam degradasi xilosa oleh khamir. Telah dibuktikan bahwa dalam kondisi anaerobik total, dapat menghentikan jalur metabolisme yang menghasilkan xilitol dari xilosa. Tingkat oksigen yang dibutuhkan untuk metabolisme xilosa juga merupakan komponen khusus untuk setiap spesies (Ghindea *et al.*, 2010), ketersediaan oksigen yang terbatas mempengaruhi proses seluler yang berhubungan dengan karbon antara, produksi energi, dan pertumbuhan sel (Arcaño *et al.*, 2018)

II.7.2.4 Suhu

Laju pertumbuhan dan produksi xilitol bergantung pada suhu karena kemampuan sel khamir untuk menyerap xilosa dari lingkungan dan efisiensi dari enzim intraseluler dipengaruhi oleh suhu. Suhu 29°C – 34°C memberikan hasil xilitol lebih tinggi, akan tetapi suhu dibawah 28°C dan diatas 35°C dapat menurunkan hasil xilitol (Tamburini *et al.*, 2015).

II.7.2.5 pH

Nilai pH awal yang digunakan selama proses fermentasi dipilih tergantung pada spesies yang digunakan. pH optimal untuk *D. hansenii* adalah 5,5, sedangkan untuk *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* dan *C. boidinii* nilainya masing-masing 4,5-5, 6,0, dan 7,0 (Ghindea *et al.*, 2010). Mardawati dkk. (2018) menjelaskan peningkatan pH (pH 7) dan penurunan pH (pH 3) dapat menyebabkan penurunan perolehan xilitol hal ini disebabkan pH yang tinggi mempengaruhi sistem transport xilosa pada khamir sehingga dapat membatasi pembentukan xilitol. Sedangkan pH rendah mengganggu keseimbangan proses kimia sehingga mempengaruhi permeabilitas sel khamir dan tidak terjadinya penyesuaian mikronutrien. Akan tetapi Tamburini *et al.* (2015) dalam penelitiannya menemukan bahwa pH rendah

yaitu pH 2.5 khamir masih mampu menghasilkan xilitol lebih baik dengan konsumsi xilosa 88% dibandingkan pH di atasnya.

II.7.2.6 Penambahan Kosubstrat

Menurut Ambarsari dkk (2015) adanya penambahan kosubstrat akan mempengaruhi kadar xilitol yang diperoleh. Dalam penelitiannya menjelaskan bahwa kadar xilitol pada penambahan kosubstrat berupa glukosa akan menghasilkan *product yield* lima kali lipat lebih banyak dibandingkan media yang hanya mengandung xilosa.