

# Purification of Xylooligosaccharide From Cassava Pulp by Ultrafiltration Method

(Pemurnian Xilooligosakarida Dari Ampas Singkong Dengan Metode Ultrafiltrasi)

Anak Agung Istri Ratna Dewi<sup>\*)</sup>, Kamelia Rizqi Fauziyah, Dwi Indarti

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember  
Jalan Kalimantan 37, Jember 68121*

## ABSTRACT

Xylan is the main component of hemicellulose. Xylan can be extracted from agricultural waste, such as cassava pulp. Xylan is used as an endo- $\beta$ -1,4-D-xylanase substrate to produce impure xylooligosaccharides (XOS). This study aims to purify XOS from cassava pulp using the ultrafiltration method. The components of XOS obtained from the enzymatic hydrolysis were analyzed using thin layer chromatography (TLC) and densitometry methods. In addition, the XOS was purified by the ultrafiltration method using a cellulose membrane with a Molecular Weight Cut Off (MWCO) of 12 kDa. The permeate obtained from the purification results was also analyzed using TLC and densitometry. The results of this study indicated that the components in XOS cassava pulp before and after purification by the TLC method were X5 and X6, while the XOS components before and after purification by the densitometric method were X3, X4 and X5.

**Keywords:** Xylan, Xylooligosaccharides, Cassava, Ultrafiltration.

<sup>\*)</sup>Corresponding author:  
Anak Agung Istri Ratna Dewi  
E-mail: istri\_dewi.fmipa@unej.ac.id

## PENDAHULUAN

Xilan adalah komponen utama dari hemiselulosa. Xilan dapat diekstraksi dari limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan XOS menggunakan metode hidrolisis secara enzimatis [1]. Xilan dari sumber ampas singkong dihidrolisis oleh enzim endo  $\beta$ -1,4-D-xilanase yang berasal dari *Bacillus sp* dalam abdominal rayap isolat terpilih, dengan aktivitas endo  $\beta$ -1,4-D-xilanase sebesar 0,29 U/mg. Proses hidrolisis xilan ampas singkong pada suhu 40°C selama 16 jam dan menghasilkan produk xilooligosakarida (XOS). Xilooligosakarida merupakan oligomer gula yang terdiri dari ikatan  $\beta$ -(1-4)-xilosida dari unit xilosa. Xilooligosakarida memiliki beberapa komponen yaitu xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentaosa (X5), xilohexaosa (X6) [1].

Xilooligosakarida dari hidrolisis ampas singkong yang diperoleh dalam penelitian tersebut masih belum murni. Hal ini dikarenakan masih ada komponen lain yang tidak diinginkan seperti xilan dan sisa enzim.

Maka perlu dilakukan pemurnian untuk menghilangkan komponen yang tidak diinginkan tersebut. Pemurnian merupakan suatu proses pemisahan fisik bahan kimia yang diinginkan dari bahan pengotornya. Dalam proses pemurnian dapat digunakan berbagai metode agar didapatkan suatu zat yang murni. Salah satu metode pemurnian adalah menggunakan membran ultrafiltrasi. Ultrafiltrasi adalah proses pemisahan dengan membran berdasarkan perbedaan ukuran pori membran dengan ukuran partikel yang akan dipisahkan dan hasil dari pemisahan sehingga diharapkan larutan hasil pemisahan (permeat) mengandung komponen yang sesuai [2]. Metode ultrafiltrasi digunakan karena metode ini bisa menyaring molekul dengan berat molekul yang besar. Fei Wong [3] telah melakukan penelitian mengenai pemurnian XOS menggunakan metode ultrafiltrasi untuk pemurnian XOS yang diperoleh melalui hidrolisis jerami padi. Membran yang digunakan dalam penelitian ini adalah membran selulosa komersil (Millipore USA) dengan *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) sebesar 5 kDa. Komponen yang diperoleh

pada permeal dalam penelitian tersebut adalah X1 sampai X6. Geetha dan Gunasekaren [4] juga melakukan penelitian mengenai pemurnian XOS menggunakan metode ultrafiltrasi untuk pemurnian. Membran yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah membran komersil dengan MWCO sebesar 10 kDa. Membran tersebut mampu memurnikan XOS yang akan digunakan untuk pembuatan sirup XOS prebiotik. Debora [5] juga melakukan penelitian mengenai pemurnian XOS dari cangkang almond. Membran yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah membran komersil dengan MWCO sebesar 8 kDa. Kinerja membran tersebut kurang maksimal dalam memurnikan XOS cangkang almond sehingga diperlukan metode tambahan untuk meningkatkan kemurniannya. Berdasarkan data tersebut, peneliti menggunakan membran selulosa komersil (Merk Serva, Servapor dialysis membrane) dengan MWCO sebesar 12 kDa.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember dan Laboratorium Kimia Fisik Fakultas MIPA Universitas Jember.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer, kuvet, *autoclave*, *sentrifuge*, *laminar air flow*, *shaker incubator*, *hotplate*, lemari asam, *water bath*, *magnetic stirrer*, *vortex*, kulkas, *oven*, pH-meter, kompresor, dan satu set alat ultrafiltrasi.

Bahan yang digunakan adalah enzim endo-1,4-D-xilanase yang berasal dari abdomen rayap. Bahan lain yang digunakan adalah membran ultrafiltrasi komersial dengan MWCO sebesar 12 kDa, media Luria Bertani (LB), triptofan, *yeast extract*, *oat spelt xylan*, xilosa, standar xilooligosakarida NaCl, KNaTartrat, asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, fenol, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, etanol 95%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, asam sitrat, 1-butanol, CH<sub>3</sub>COOH, HCl  $\alpha$ -naftol, dan plat TLC F254.

### Proses Hidrolisis Xilan Ampas Singkong oleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

Hidrolisis xilan dilakukan dengan mencampurkan 50 mL enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan sebanyak 50 ml konsentrasi 1,1% (b/v) [6] dalam buffer fosfat-sitrat pH 5. Campuran substrat dan enzim diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 40 °C [7]

selama 16 jam [8]. Kontrol yang digunakan untuk membandingkan hasil yang diperoleh adalah endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang diinaktifkan. Inaktif enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dilakukan dengan 125  $\mu$ l enzim dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit. Hasil hidrolisis xilan dengan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase berupa XOS ampas singkong dianalisis dengan metode KLT dan densitometri.

### Pemurnian XOS Ampas Singkong dengan Membran Ultrafiltrasi

Larutan XOS ampas singkong dimurnikan dengan ultrafiltrasi menggunakan membran dengan MWCO 12 kDa. Larutan XOS yang akan diultrafiltrasi disebut umpan. Umpan sebanyak 50 mL dialirkan menuju membran menggunakan alat ultrafiltrasi untuk dilakukan proses pemurnian. Tekanan diatur sebesar 2.5 bar. Hasil pemurnian larutan kemudian dialirkan menuju gelas ukur untuk dianalisis komponennya dan retentatnya dibuang.

### Analisis XOS Ampas Singkong Sebelum dan Setelah Pemurnian dengan KLT

XOS ampas singkong sebelum dan setelah pemurnian diuji menggunakan KLT. Kromatoplat terlebih dahulu diaktifkan dengan dicelupkan ke dalam wadah berisi eluen. Sebanyak 20  $\mu$ L produk XOS ampas singkong sebelum dan setelah pemurnian ditotolkan pada kromatoplat yang telah diaktifkan.. Selain sampel XOS ampas singkong, standar XOS, xilan yang dihidrolisis dengan enzim inaktif juga ditotol dalam kromatoplat. Kromatoplat yang mengandung sampel dan standar dicelupkan dalam wadah yang telah berisi eluen. Eluen tersebut berupa campuran dari n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 2:1:1 [9]. Kromatoplat diambil setelah eluen mencapai batas garis atas. Kromatoplat dikeringkan dan disemprot dengan larutan penampak noda yang terdiri dari campuran  $\alpha$ -naftol, asam sulfat, dan etanol dengan perbandingan 1:10:200 [10]. Kromatoplat kemudian diletakkan dalam oven dengan suhu 100°C selama 5 menit hingga noda tampak. Noda yang terbentuk selanjutnya diukur jaraknya dari batas bawah dan digunakan untuk menentukan faktor retensi yang diperoleh dengan menggunakan persamaan:

$$R_f = \frac{r_s}{r_s} \quad (1)$$

### Analisis XOS Ampas Singkong Sebelum dan Setelah Pemurnian dengan Densitometri

XOS ampas singkong sebelum dan setelah pemurnian diuji menggunakan densitometri. Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit berupa bercak pada KLT. Kromatoplat diaktifkan dengan cara dicelupkan ke dalam wadah berisi eluen. Sebanyak 20  $\mu$ L produk XOS ampas singkong sebelum dan setelah pemurnian ditotolkan pada kromatoplat yang telah diaktifkan. Kromatoplat yang mengandung sampel dan standar dicelupkan dalam wadah berisi eluen. Eluen tersebut berupa campuran dari n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 2:1:1 [9]. Kromatoplat kemudian diambil setelah eluen mencapai batas garis atas lalu dikeringkan dengan cara dianginkan. Kemudian dilanjutkan pembacaan komponennya dengan fotodensitometer pada panjang gelombang 303. nm *Scanning* instrumen densitometer dilengkapi dengan digital konverter dan data akan diproses secara digitalisasi oleh komputer sehingga dapat ditentukan luas area dan data nilai Rf.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Hidrolisis Xilan Ampas Singkong oleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

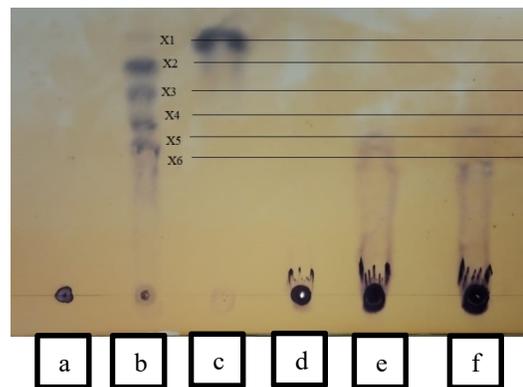
Proses hidrolisis xilan ampas singkong dengan endo  $\beta$ -1,4-D-xilanase menghasilkan XOS. Hasil hidrolisis dari xilan ampas singkong oleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase kemudian dipanaskan pada suhu 100°C. Hal ini dilakukan untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm suhu 40°C. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan antara produk hidrolisis dan pengotor lain seperti enzim ataupun sisa rantai xilan yang tidak dihidrolisis oleh enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Xilooligosakarida yang diperoleh dari produksi tersebut masih belum murni. Xilooligosakarida produk hidrolisis xilan ampas singkong dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Xilooligosakarida Produk Hidrolisis Xilan Ampas Singkong

### Hasil Analisis XOS Ampas Singkong Sebelum dan Setelah Pemurnian dengan KLT

Analisis dengan KLT bertujuan untuk melihat kemampuan enzim dalam menghidrolisis xilan dalam campuran sampel dan produk hidrolisis yang dihasilkan. Analisis juga didasarkan pada warna spot noda yang terbentuk pada titik penotolan dan munculnya spot baru pada kromatogram seiring dengan bertambahnya waktu hidrolisis.. Hasil pemisahan setelah proses elusi ditunjukkan dengan adanya spot noda yang terpisah pada plat silika. Spot noda yang terlihat merupakan komponen-komponen dari XOS ampas singkong . Gambar 2 menunjukkan kromatogram hasil uji KLT dari XOS. ampas singkong.



Gambar 2 Kromatogram XOS Produk Hidrolisis Xilan Ampas Singkong; (a) xilan ampas singkong; (b) standar xos; (c) standar xilosa; (d) xilan + enzim inaktif; (e) XOS ampas singkong sebelum pemurnian; (f) XOS ampas singkong setelah pemurnian

Gambar 2 merupakan kromatogram hasil uji KLT dari XOS ampas singkong menunjukkan produk dari XOS yang ditandai dengan terlihatnya spot noda di plat yang digunakan. Pada Gambar 2 untuk lajur a merupakan sampel xilan ampas singkong yang tidak terhidrolisis. Kromatogram menunjukkan tidak adanya spot noda yang terelusi, dengan noda hanya berada pada titik awal penotolan. Pada lajur b standar XOS terlihat adanya spot noda yang terpisah. memiliki kandungan X1 sampai X6. Lajur c standar xilosa dengan adanya satu spot noda. Pada lajur d (xilana + enzim inaktif) tidak memperlihatkan adanya spot noda yang terpisah namun terdapat spot noda di titik awal penotolan. Hal tersebut disebabkan endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang digunakan merupakan enzim inaktif, sehingga xilan tidak terhidrolisis menjadi XOS. Kromatogram KLT pada XOS sebelum pemurnian (lajur e) menunjukkan beberapa spot noda terpisah dan masih terdapatnya spot noda di titik awal penotolan. Spot noda-yang terpisah adalah komponen XOS ampas singkong hasil hidrolisis endo-  $\beta$ -1,4-D-xilanase. Ini menunjukkan bahwa endo-  $\beta$ -1,4-D-xilanase mampu menghidrolisis xilan dari ampas singkong. Noda yang terdapat di titik awal penotolan tersebut diduga karena terdapat sisa xilan yang belum terhidrolisis oleh enzim. Xilan yang belum terhidrolisis tidak bisa dielusi oleh eluen. Hal ini karena xilan merupakan polimer dengan berat molekul besar. Semakin besar ukuran partikel, maka kemampuan bergerak semakin kecil sehingga menyebabkan kemampuan difusi juga rendah [11]. Spot noda-terpisah merupakan komponen sampel XOS yang belum melalui pemurnian (lajur e) memiliki posisi yang hampir sejajar dengan noda pemisahan dari standar XOS (lajur b). Berdasarkan hasil perhitungan, noda-noda produk hidrolisis sebelum pemurnian (lajur e) yang mampu terbaca memiliki nilai Rf sebesar 0,3 dan 0,25. Nilai tersebut sama seperti nilai Rf standar XOS. Nilai Rf menunjukkan 0,3 dan 0,25 secara berturut-turut sama seperti nilai X5 dan X6. Data nilai Rf selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil ini menunjukkan bahwa hidrolisis xilan dari ampas singkong hanya menghasilkan produk X5 dan X6. Data yang diperoleh memiliki kemiripan dengan dengan hasil yang dilaporkan oleh Rahma yang menghasilkan produk X2 hingga X6 [12].

Tabel 1 Hasil Perhitungan Nilai Rf XOS Sebelum Pemurnian

Keterangan	Sebelum Pemurnian			
	Jarak		Rf	
	Standar	Sampel	Standar	Sampel
X1	6	-	0,6	-
X2	5	-	0,5	-
X3	4,5	-	0,45	-
X4	3,5	-	0,35	-
X5	3	3	0,3	0,3
X6	2,5	2,5	0,25	0,25

Deteksi kromatografi lapis tipis selanjutnya adalah XOS ampas singkong setelah proses pemurnian. pada (lajur f) Pada Gambar 2 menunjukkan beberapa spot noda terpisah dan masih terdapat spot noda dititik awal penotolan. Noda-noda yang terpisah yang dihasilkan pada kromatogram tersebut menunjukkan adanya komponen XOS ampas singkong yang telah dimurnikan yaitu X5 dan X6 (Tabel 2), sedangkan noda yang terdapat di titik awal penotolan tersebut diduga karena terdapat sisa xilan yang tidak tersaring oleh membran.. Tahap pemurnian dengan ultrafiltrasi masih belum bisa untuk menghilangkan sisa xilan, hanya bisa memisahkan komponen saja. Hasil ini dapat dilihat dari adanya noda yang pekat di titik awal penotolan pada plat KLT. Bercak tersebut merupakan bercak dari sisa xilan yang tidak terhidrolisis oleh endo-  $\beta$ -1,4-D-xilanase. Hal ini disebabkan ukuran xilan dari ampas singkong tersebut belum diketahui secara pasti sehingga ukuran pori membran yang digunakan peneliti tidak mampu menghilangkan xilan.

Tabel 2 Hasil Perhitungan Nilai Rf XOS Ampas Singkong Setelah Pemurnian

Keterangan	Setelah Pemurnian			
	Jarak		Rf	
	Standar	Sampel	Standar	Sampel
X1	6	-	0,6	-
X2	5	-	0,5	-
X3	4,5	-	0,45	-
X4	3,5	-	0,35	-
X5	3	3	0,3	0,3
X6	2,5	2,5	0,25	0,25

### Hasil Analisis XOS Sebelum dan Setelah Pemurnian dengan Densitometri

Data hasil analisis yang diperoleh dari KLT tersebut diperkuat dengan data metode analisis kedua yaitu analisis densitometri. Hasil densitometri pertama dan kedua menunjukkan bahwa sampel XOS sebelum dan setelah pemurnian terdeteksi memiliki komponen yang sama yakni X3, X4, dan X5 (Tabel 3). Prediksi nilai komponen berdasarkan jarak dan Rf dari analisis KLT. Hasil yang diperoleh tersebut memiliki sedikit perbedaan dengan hasil pada analisis KLT. Hal ini disebabkan densitometri memiliki tingkat akurasi yang lebih tinggi sehingga bisa membaca pita/bercak noda yang sangat tipis seperti X3, sedangkan data komponen X6 (pada KLT) tidak terbaca pada densitometri. Hal ini disebabkan noda pada plat tersebut terlalu melebar yang akan menghasilkan puncak absorpsi yang lebar dan tumpul [13]. Terjadinya pelebaran pita atau noda disebabkan oleh ketidakmerataan diameter dari partikel fase diam yang menyebabkan perbedaan dorongan kapiler, yang secara otomatis akan menghasilkan kecepatan aliran yang tidak merata dari fase gerak saat melalui pipa kapiler.

Tabel 3 Hasil Analisis XOS Ampas Singkong dengan Densitometri

No	Sampel	Rf	Prediksi
1.	Sampel 1 (Xos sebelum pemurnian)	0,28	X5
		0,33	X4
		0,44	X3
2.	Sampel 2 (Xos sesudah pemurnian/ <i>permeat</i> )	0,29	X5
		0,34	X4
		0,44	X3

Keterangan: (X1) Xilosa, (X2) Xilobiosa, (X3) Xilotriosa, (X4) Xilotetrosa, (X5) Xilopentosa.

### KESIMPULAN

Komponen xilooligosakarida hasil hidrolisis xilan ampas singkong yang terdeteksi sebelum dan setelah pemurnian oleh membran ultrafiltrasi dengan metode kualitatif KLT adalah X5 dan X6. Sedangkan untuk metode densitometri yang terdeteksi adalah X3, X4 dan X5. Hasil pemurnian tersebut belum maksimal karena sisa xilan pada proses hidrolisis belum mampu terpisahkan.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ratnadewi, A. A. I., A. B. Santoso, E. Sulistyanyingsih, & W. Handayani. 2016. "Application of Cassava Peel and Waste as Raw Materials for Xylooligosaccharide Productin Using Endoxylanase from *Bacillus Subtilis* of Soil Termite Abdomen". *Procedia Chemistry*. 18 (31-38).
- [2] Piluharto. 2003. Kajian Sifat Fisik Film Tipis Nata de Coco Sebagai Membran Ultrafiltrasi. *Jurnal Ilmu Dasar*. 4: 55.
- [3] Wang Fei. 2011, Improvement in The Productivity of Xylooligosaccharides from Rice Straw by Feed Xylanase with Ultrafiltration. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63(1): 161-166.
- [4] Geetha K., Gunasekaran, P. 2017, . Purification of Endoxylanase from *Bacillus pumilus* B20 for Production of Prebiotic Xylooligosaccharide Syrup; An In vitro Study. *Iran J Biotechnol*. 15(4): 232–240.
- [5] Debora N., T. Charlez, G. Ricard, M. Daniel. 2006. Purification of Xylo-oligosaccharides from Almond Shells by Ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 53: 235-243.
- [6] Rahmawati, Melia Dwi. 2016. Studi Kinetika Reaksi Enzimatis Endo-β-1,4-D-Xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Singkong. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- [7] Firdausa, F. K. 2016. Ekstraksi Xilan dari Limbah Ampas Singkong dan Pemanfaatnya Sebagai Substrat Endo-β-1,4-D-xilanase. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- [8] Kurniawan, Andika Ade. 2015. "Optimasi kondisi hidrolisis xilan oat dengan endo-β-1,4-D-xilanase asal mikroorganisme dalam sistem abdominal rayap untuk produksi xilooligosakarida". Tidak Diterbitkan. Skripsi: Universitas Jember.
- [9] Kubata, Suzuki, Horitsu, Kawai, dan Takamizawa. 1994. "Purification and Characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, Which Produces Exclusively Xylobiose from Xylan". *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2): 531.
- [10] Wang X, Zhao G, Li J. 2011 Kinetic and Thermodynamic Study of 1-naphthol Adsorption from Aqueous Solution to Sulfonated Graphene Nanosheets. *Chem Eng J*. 173:185–90.
- [11] Stoddard, J.M, Nguyen,L.,Chavez H.M.,and Nguyen, K.,2007. TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions *Journal Chemical Communication*, Issue 12
- [12] Rahma, Marena Talita. 2016. "Karakterisasi Fermentasi Xilooligosakarida Ampas Singkong Hasil Hidrolisis endo-β-1,4-D-xilanase oleh *Lactobacillus acidophilus*". Skripsi: Universitas Jember.

- [13] Jammes J & Dubery L. 2011. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC Jacinda Journal of Planar Chromatography. 2011. 24(1): 82-87.