

Hidrolisis Biomasa Lignoselulosa Untuk Xilitol

Awan Purnawan*, Ahmad Thontowi, Lutfi Nia Kholida, Urip Perwitasari

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong Science Center- Botanical Garden (CSC-BG), Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong Bogor 16911, Indonesia

ABSTRAK

Xilitol adalah gula alkohol dengan lima atom karbon. Gula ini digunakan sebagai pemanis industri pangan dan makanan, karena memiliki karakter yang menguntungkan. Meskipun xilitol diproduksi secara industri oleh reduksi kimia D-xilosa yang berasal dari hidrolisis hemiselulosa, metode produksi ini tidak ekonomis karena persyaratan untuk D-xilosa murni, suhu tinggi, dan tekanan tinggi. Oleh karena itu, produksi xilitol melalui pendekatan bioteknologi dengan bantuan mikroorganisme menjadi fokus sebagai metode yang ekonomis dan ramah lingkungan. Selain itu, untuk meningkatkan produksi bio-xilitol, strain mikroorganisme telah mengalami strategi modifikasi genetik. Review ini menjelaskan upaya produksi xilitol dari biomasa lignoselulosa, proses perlakuan biomasa, dan mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi xilitol

Kata kunci: lignoselulosa, pra-perlakuan, fermentasi, xilitol

ABSTRACT

Xylitol is a sugar alcohol with five atoms of C. This sugar is used as a sweetener in the food industry and confectionary, because it has a favorable character. Although xylitol is produced industrially by the chemical reduction of D-xylose derived from hemicellulose hydrolyzate, this production method is not economical because of the requirements for pure D-xylose, high temperature, and high pressure. Therefore, the production of xylitol with a biotechnological approach with the help of microorganisms becomes the focus as an economical and environmentally friendly method. In addition, to increase bio-xylitol production, strains of microorganisms have undergone genetic modification strategies. This review article describes the latest advances made in the production of xylitol from lignocellulase biomass, biomass treatment processes, and microorganisms that play a role in xylitol fermentation.

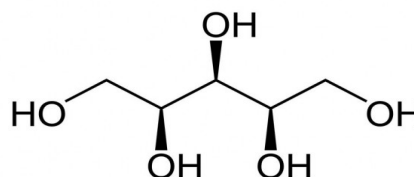
Keywords: lignocellulose, pretreatment, fermentation, xylitol

Citation: Purnawan, A., Thontowi, A., Kholida, L. N., dan Perwitasari, U. (2021). Hidrolisis Biomasa Lignoselulosa Untuk Xilitol. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 19(3), 485-496, doi:10.14710/jil.19.3.485-496

1. Pendahuluan

Xilitol ($C_5H_{12}O_5$) adalah pemanis makanan alami yang telah digunakan sebagai pengganti sukrosa karena memiliki tingkat kemanisan yang sama, yaitu sebesar 0.8 - 1.0. Namun xilitol mempunyai nilai kalori 2.4 kalori/gram, sedangkan sukrosa 4 kalori/gram (Jain and Grover, 2015). Beberapa manfaat untuk kesehatan telah dikaitkan dengan konsumsi xilitol. Xilitol berupa serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau yang memiliki rumus kimia $C_5H_{12}O_5$ dengan ikatan kimia berbentuk (2R,3r,4S)-Pentena-1,2,3,4,5-pentanol atau nama lainnya adalah 1,2,3,4,5-pentehidroksipentan. Titik cair xilitol terletak antara 92–96°C dan titik didihnya 126 °C, densitas xilitol sebesar 1,52 g/cm³ dengan massa mol 152,15 g/mol. Salah satu manfaat yang penting adalah dalam kesehatan mulut, mengurangi atau mencegah kerusakan gigi dengan menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Ur-Rehman *et al.*, 2015). Xilitol juga dapat digunakan untuk pengobatan beberapa penyakit seperti diabetes, anemia hemolitik, proses inflamasi,

penyakit usus besar, cedera parenteral dan ginjal, serta untuk mencegah infeksi pernapasan, otitis media akut dan osteoporosis. Manfaat xilitol yang cukup banyak, memperluas bertumbuhnya pasar xilitol, termasuk aplikasi dalam industri makanan dan farmasi telah meningkat secara signifikan dalam beberapa dekade terakhir (López-linares *et al.*, 2017). Secara tradisional, produksi xilitol pada skala besar melalui proses reduksi kimia dari D-xilosa dengan penambahan katalis nikel pada suhu tinggi dengan efisiensi konversi sekitar 50-60 % (Ur-Rehman *et al.*, 2015).



Gambar 1 Rumus bangun xilitol

* Penulis Korespondensi: awantea16@gmail.com

Pada proses kimia, suhu yang digunakan sekitar 80-140 °C, tekanan diatas 50 atm dan diperlukan separasi serta purifikasi karena penggunaan katalis yang menjadikan proses kimia menjadi mahal. Proses bioteknologi dianggap efisien dan mengurangi biaya dalam produksi xilitol (Wei *et al.*, 2010). Pada proses bioteknologi menggunakan mikroorganismedengan kemampuan mengubah xilosa menjadi xilitol dengan efisiensi konversi sekitar 65-85 % (Rafiqul and Sakinah, 2012). Ragi dinyatakan mikroorganisme terbaik dalam memfermentasi xilitol. Biokonversi xilosa menjadi xilitol oleh ragi dianggap menjadi alternatif yang menarik untuk proses kimia secara komersial pada skala besar saat ini, karena membutuhkan energi yang lebih rendah (suhu dan tekanan yang diperlukan lebih ringan), berkelanjutan, dan ramah lingkungan (López-linares *et al.*, 2017).

Produksi xilitol melalui reduksi katalitik pada larutan xilosa murni dari hidrolisat hemiselulosa. Proses bioteknologi untuk produksi xilitol menggunakan ragi untuk fermentasi xilosa, dimana konversi xilosa menjadi xilitol dilakukan oleh enzim *NADPH-dependent xylose reductase XR* (Lee *et al.*, 2003). Proses kimiawi melalui tahapan separasi untuk memisahkan produk dengan residu, selanjutnya melalui tahapan hidrogenasi kimia dengan tekanan dan suhu tinggi untuk menghasilkan produk berupa xilitol. Proses biologi dengan proses enzimatik melalui fermentasi mikroorganisme dengan beberapa tahapan separasi seperti sentrifugasi, adsorpsi, membran filtrasi dan proses *downstream*/teknologi proses pengolahan lainnya untuk menghasilkan produk akhir berupa xilitol. Tinjauan ini menyajikan wawasan tentang berbagai strategi proses *pretreatment* atau pra-perlakuan biomassa yang digunakan baik dalam skala laboratorium, pilot atau berskala besar. Pada tulisan ini dipaparkan lebih ke arah hidrolisis biomassa lignoselulosa dengan beberapa metode, secara fisika, kimia, biologi, maupun campuran diantaranya. Proses hidrolisis ini menjadi penting untuk memperoleh monomer xilosa. Xilosa inilah yang digunakan ragi dalam metabolismenya untuk produksi xilitol.

2. Komposisi Lignoselulosa Untuk Xilitol

Sekarang ini biomassa banyak terdapat pada perkebunan sebagai limbah yang belum dimanfaatkan secara optimal keberadaannya. Pada biomassa tersebut banyak mengandung senyawa-senyawa selulosa, hemiselulosa dan lignin. Tanaman yang mengandung biomassa yg belum dimanfaatkan diantaranya adalah tongkol jagung, bagase tebu, jerami padi, jerami sorgum, batang tembakau dan masih banyak lagi lainnya. Limbah tanaman tersebut sekarang dapat

dimanfaatkan sebagai bahan baku yang unik, untuk menghasilkan produk organik yang berkelanjutan, karena sumbernya dapat diperbaharui serta membuka rute baru untuk memproduksi bahan bakar atau produk lainnya.

Bagian struktural biomassa selulosa adalah gabungan dari rantai selulosa yang disatukan oleh ikatan hidrogen sebagai serat selulosa panjang, yang pada gilirannya disatukan dengan hemiselulosa dan lignin. Komposisi ini memungkinkan pertumbuhan tanaman yang dapat menahan perubahan cuaca dan melawan serangan oleh organisme dan serangga. Struktur kimia selulosa adalah polimer linier sederhana terdiri dari unit monomer D-glukopiranos β -(1 \rightarrow 4). Rantai selulosa pada primer dinding sel tanaman biasanya memiliki Derajat Polimerisasi (DP) dalam kisaran 5.000-7.500 unit monomer glukosa, sedangkan DP selulosa dari kayu sekitar 10.000 dan selulosa dari kapas sekitar 15.000 (Berlin, 2013; Dutta dan Wu, 2014).

Hemiselulosa umumnya diklasifikasikan menurut residu gula utama pada tulang belakang, misalnya xilan, manan, dan glukon. Xilan dan manan adalah residu yang paling umum, tergantung pada spesies tanaman, tahap perkembangan, dan jenis jaringan. Berbagai sub-kelas dari hemiselulosa dapat ditemukan, termasuk glukuronoxilan, arabinoxilan, manan linier, glukomanan, galaktomanan, galaktoglukomanan, β -glukan, dan xiloglukan. Xilan adalah polisakarida yang memiliki ikatan β -(1 \rightarrow 4)-D-xilopiranos sebagai rantai utama dan memiliki beberapa rantai samping. Tanaman sebagian besar mengandung hemiselosa sepertiganya didominasi oleh xilan (Wyman *et al.*, 2005).

Penelitian pembuatan xilosa dari berbagai bahan baku biomassa yang mengandung lignoselulosa telah banyak dilakukan (Chandel *et al.*, 2007; Oktaviani *et al.*, 2019; Thontowi *et al.*, 2020; Hermiati *et al.*, 2020a). Adapun komposisi lignoselulosa terdiri dari gula polimer selulosa, hemiselulosa, dan makro molekul lignin (Hermiati *et al.*, 2020b). Selulosa adalah suatu polimer yang disusun oleh homo-polisakarida D-glukosa (C₆-Heksosa) dihubungkan oleh ikatan β -1,4-glukosidik. Hemiselulosa adalah polimer heteropolisakarida yang terdiri dari gula pentosa dan heksosa (C-5 dan C-6) dengan rantai utama dibentuk oleh D-xilosa atau D-galaktosa, tergantung pada sumber biomasanya, yang bercabang dengan gula lain seperti L-arabinosa, D-asam glukuronik, D-glukosa, D-mannosa, dan molekul lainnya, seperti sebagai asam (Jorgensen *et al.* 2007). Sedangkan lignin adalah makromolekul kompleks yang terdiri dari unit fenil propana yang melindungi selulosa-hemiselulosa yang memberikan integritas pada struktur lignoselulosa (Canilha *et al.*, 2008).

Tabel 1. Komposisi biomasa lignoselulosa (Kim 2018)

Biomasa	Bobot kering (%)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Sekam Barley	33.6	37.2	19.3
Serat Jagung	14.3	16.8	8.4
Pericarp jagung	22.5	23.7	4.7
Tangkai jagung	37.0	22.7	18.6
Jerami gandum	30.2	21.0	17.0
Jerami padi	31.1	22.3	13.3
Jerami gandum hitam	30.9	21.5	22.1
Rumput-rumputan	39.5	20.3	17.8
Bagas tebu	43.1	31.1	11.4
Batang bunga matahari	33.8	20.2	17.3

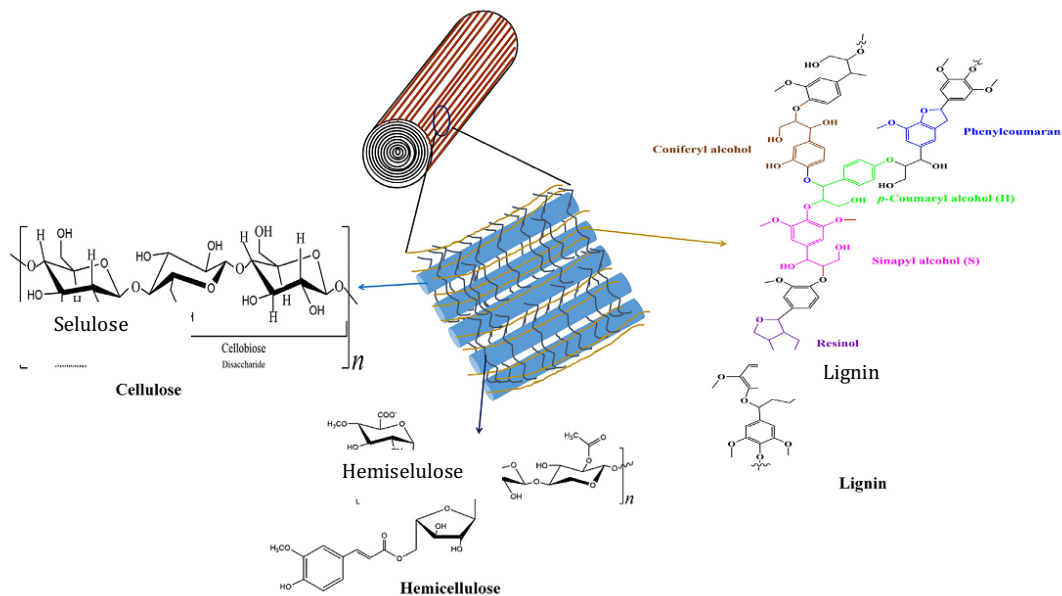
Catatan: Biomassa yang disajikan memiliki kadar xilan yang tinggi dalam fraksi hemiselulosa

3. Biomassa Lignoselulosa

Biomassa lignoselulosa (BLS), terdiri dari polimer-polimer yang berbeda dan tersusun dari polisakarida (selulosa dan hemiselulosa), polimer lignin fenol aldehida dengan zat polar dan non-polar yang terikat secara kuat (Yu. *et al.*, 2017). Gambar 1 menunjukkan BLS memiliki penampilan fisik dan kekuatan yang berbeda, tersusun dari selulosa homopolimer, heteropolimer hemiselulosa, dan lignin (Kumar *et al.*, 2020). Struktur BLS sangat kompleks, terikat secara kuat dan kaku terhadap hidrolisis enzimatis, sehingga dapat menghambat konversi BLS menjadi *biofuel* atau bioproduk lainnya. *Pretreatment* atau pra-perlakuan dapat membantu dalam mengatasi kekakuan alami ini, sehingga BLS menjadi lebih mudah pecah menjadi komponen-komponennya. Oleh sebab itu pra-perlakuan dapat meningkatkan aksesibilitas enzim

hidrolisis ke selulosa dan bagian hemiselulosa yang menghasilkan gula-gula sederhana. Selanjutnya gula sederhana ini difermentasi untuk menghasilkan bahan bakar atau bioproduk lainnya (Sun *et al.*, 2016). Adapun polifenol lignin dan hidrolisat lainnya dapat dikonversi menjadi bahan kimia bernilai tambah sebagai bahan kimia penting untuk aplikasi yang menguntungkan secara ekonomi.

Polimer lignoselulosa dihubungkan satu sama lain melalui ikatan khusus dan berkontribusi 70 % dari total biomassa. Karakteristik kekuatan biomassa dari konstituen polimerik tergantung pada variasi konsentrasi dari polimer. Oleh karena itu sangat mempengaruhi jenis strategi pra-perlakuan yang diterapkan untuk dekonstruksinya. Kandungan polimer biomassa yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 2 Struktur selulosa, hemiselulosa, dan lignin

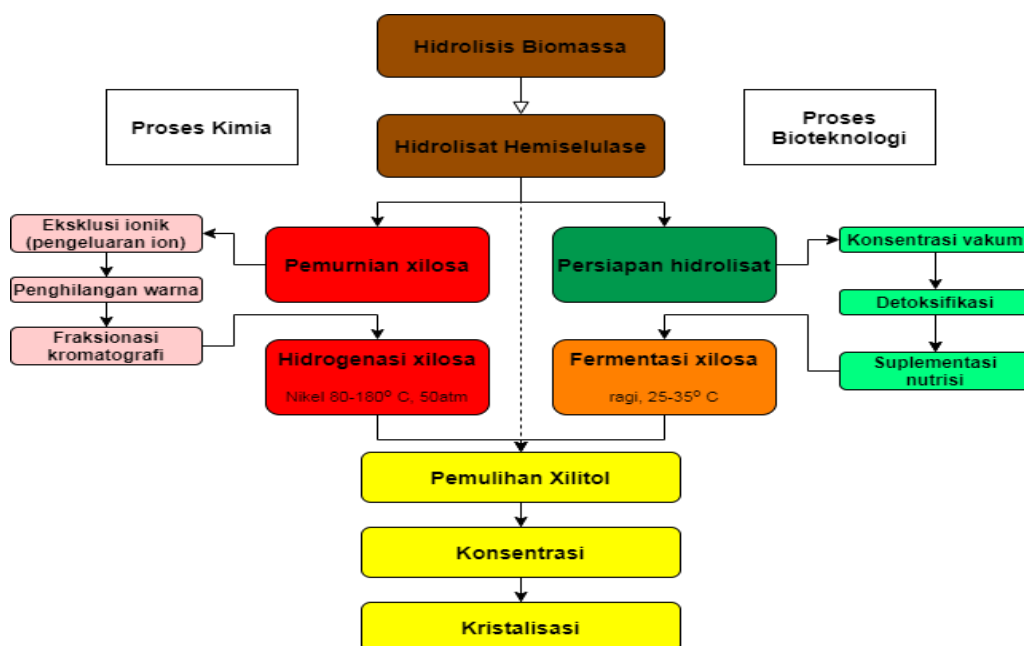
Tabel 2. Fitur karakteristik selulosa, hemiselulosa dan lignin (Kumaret al,2020)

Sifat	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Struktur unit	Gugus β-D-Glukopiranososa	L-arabinosa, D-xilosa	Siringil, guaiasil, para-hidroksi-phenil
Obligasi bergabung dengan unit struktural	ikatan β- (1,4) glikosidik	β-1,4-Glikosidik linkage, β-1,2 (or 3, 6)-glikosidik	Ikatan CeC, ReOeR', β-O-4-aril
Tingkat polimerisasi	~ 10.000-15.000	~200	~ 4000
Polimer	β-1.4-Glukan	Glukomanan, galaktoglukomanan, xilan	Tipe G-, GS-, dan GSH
Jenis ikatan	Hidrogen	kimia	kimia
Kristalinitas	Kristalinitas tertata tinggi	Variabel, tidak berbentuk	Polimer 3D tidak seragam, tidak linier
Struktur	Struktur mikro serat melipat bersama untuk membentuk serat kemudian bundel bersama-sama menjadi serat selulosa	Rantai samping pendek bersama dengan rantai tulang punggung	Unit fenil propanoid saling bertautan jenis obligasi
Efek serangan kimia dan enzimatik	Memberikan stabilitas	Mudah terurai menjadi hidrolisis	memberikan pembangkangan alami/ <i>Impart natural recalcitrance</i>

4. Metode Pra-perlakuan Secara Kimia

Pra-perlakuan adalah metode atau langkah terpenting dalam efisiensi biaya konversi BLS menjadi xilitol. Pemilihan pra-perlakuan yang tepat sangat mempengaruhi biaya biorefineri berbasis bahan baku lignoselulosa. Dalam beberapa dekade terakhir metode pra-perlakuan biomassa telah diidentifikasi, dievaluasi, dikembangkan dan dipraktikkan/diuji-cobakan di skala laboratorium, pilot atau industri. Proses konversi bahan lignoselulosa menjadi xilitol terdiri atas tiga tahap, yaitu pra-perlakuan, sakarifikasi atau hidrolisis selulosa menjadi gula-gula sederhana, dan fermentasi gula-gula sederhana menjadi xilitol. Selanjutnya,

dilakukan pemurnian xilitol melalui distilasi dan dehidrasi untuk memperoleh xilitol murni. Menurut Hermiati *et al.*, (2010), pra-perlakuan bertujuan untuk menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa dan meningkatkan porositas bahan. Namun, pada proses ini perlu biaya tinggi. Untuk mengurangi biaya produksi tinggi, telah diteliti berbagai proses agar dapat menurunkan biaya operasional tinggi tersebut. Langkah langkah yang telah diteliti dalam pra-perlakuan adalah dengan mereaksikan BLS dengan bahan-bahan kimia berupa: berbagai asam (sulfat, klorida, fumarat, malenat); basa/alkali (NaOH, KOH, NH₄OH, Ca(OH)₂), dan garam logam yang biasa disebut dengan metode pra-perlakuan.



Gambar 3 Proses kimia dan bioteknologi untuk produksi xilitol dari biomassa. (Canilha *et al.*,2013; Hou-Rui 2012; Pal *et al.*, 2016).

4.1. Pra-perlakuan Asam

Pra-perlakuan dengan asam telah dipelajari sebelumnya secara ekstensif. Asam dapat melarutkan hemiselulosa, meningkatkan porositas biomassa dan membuat selulosa lebih mudah diakses oleh serangan enzim (Bai *et al.*, 2016). Suhu untuk pra-perlakuan asam encer berkisar antara 120–200 °C, tergantung pada tingkat kebutuhan pra-perlakuan. Kombinasi dari suhu rendah dengan konsentrasi asam tinggi atau suhu tinggi dengan konsentrasi asam rendah biasanya lebih disukai. Asam organik (asam asetat, asam format, dan asam oksalat), serta asam anorganik (asam klorida, asam maleat, nitrat, nitrit, orto-fosfat, dan asam sulfat) digunakan untuk dekonstruksi biomassa (Kumar, 2018).

Asam yang biasa digunakan paling banyak adalah asam klorida dan asam sulfat. Tao *et al.*, (2017) menunjukkan pra-perlakuan asam klorida encer *Triarrhena lutarioriparia* menghasilkan 1,34 kali lipat peningkatan hidrolisis enzimatis dengan total pengurangan hasil gula 100,14 mg/g biomassa dibandingkan dengan yang tidak digunakan. Penggunaan asam sulfat encer (0,5 %) menghasilkan gula pereduksi 457 mg/g dari *Zizania pra-perawatan latifolia*. Pada pra-perlakuan asam, menghasilkan produk samping beberapa senyawa yang dapat menghambat fermentasi seperti furfural dan hidroximetil furfural. Oleh karena itu pemilihan asam yang tepat, konsentrasi, pengaturan waktu reaksi, dan suhu sangat membantu dalam meminimalkan senyawa inhibitor. Liu *et al.*, (2016) menunjukkan dua tahap proses, di mana pra-perlakuan HCl encer (0,7 %), 120 °C selama 40 menit, diikuti oleh penggilingan jagung (selama 15 menit) dari brangkas jagung menghasilkan gula sederhana yang tinggi (81 % xilosa dan 64 % glukosa).

Kemudian, kelompok riset yang sama An *et al.*, (2017) menyarankan pada metode pra-perlakuan dua tahap, di mana brangkas jagung pertama menjadi asam dioksan diikuti oleh asam klorida encer. Tahap pertama lignin dihilangkan, diikuti oleh hidrolisis hemiselulosa menghasilkan glukosa yang lebih tinggi (91,5 %) dan xilosa (79,7 %). Bahkan pada dosis selulase rendah menghasilkan 3 FPU/g substrat. Hasil penelitian tersebut penting untuk mendukung data bahwa pelarutan lignin dan hemiselulosa adalah penting untuk meningkatkan hidrolisis fraksi selulosa dari biomassa lignoselulosa. Kerugian dari pra-perlakuan asam adalah sifatnya yang korosif, sehingga dibutuhkan reaktor non logam yang mahal, proses kompleks yang dapat meningkatkan biaya produksi. Selain itu sifat asam toksik, sehingga dibutuhkan air yang banyak untuk menetralkan, dan menghasilkan air limbah yang harus di daur ulang. Turunan furfural dan hidrosil-metil furfural dapat bertindak sebagai inhibitor fermentasi, tetapi inhibitor ini dapat dipulihkan untuk aplikasi lebih lanjut dalam menghasilkan nilai tinggi bahan kimia .

4.2. Pra-perlakuan Basa

Langkah pra-perlakuan dengan penambahan senyawa basa dapat merusak struktur lignin dan ikatan-ikatan lainnya (ester, aril-eter, dan ikatan C-C) yang terikat kuat pada polimer lignin dan karbohidrat. Sehingga dengan rusaknya ikatan-ikatan kimia oleh basa, membuat matrik heterogen lebih mudah diakses oleh enzim dalam proses fermentasi. Pra-perlakuan basa biasanya dilakukan dengan menggunakan senyawa seperti NaOH, KOH, Ca(OH)₂, NH₄OH, dan lainnya. Proses dilakukan pada suhu kamar untuk waktu yang lebih lama atau suhu tinggi untuk waktu yang lebih singkat. Pra-perlakuan ini menyebabkan pembengkakan pada selulosa (Wen *et al.*, 2014), kemudian menjadi rusak. Reaksi saponifikasi dapat meningkatkan porositas biomassa, gangguan dalam hubungan silang antara hemiselulosa dan lignin/selulosa. Penggunaan basa dapat memperluas area permukaan, sehingga mudah diakses, mengurangi kristalinitas selulosa, gangguan lignin, menghilangkan gugus asetil, dan membelah asam uronat (Agbor *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Natrium hidroksida digunakan paling umum untuk berbagai macam pra-perlakuan biomassa dari turunan bioetanol, bio-butanol, dan bio-hidrogen (Antonopoulou *et al.*, 2016; Battista *et al.*, 2015; Nges *et al.*, 2015). Penggunaan NaOH encer 2 % (b/b) dengan bantuan suhu menunjukkan pelarutan lignin dalam sekam padi 54 % (b/b). Metode ini sangat efisien dan adanya peningkatan konsentrasi selulosa hingga 51,65 % (b/b) disertai dengan kelarutan hemiselulosa rendah berkisar 10,7-33,1 % (b/b) (Shahabuddin *et al.*, 2018). Penggunaan NaOH berlebih dapat berakibat sebagai inhibitor dalam fermentasi dan memiliki dampak kerusakan lingkungan (Chandra *et al.*, 2015).

Daur ulang katalis senyawa basa setelah pra-perlakuan dapat meningkatkan efisiensi biaya dan meminimalkan dampak kerusakan lingkungan (Chen, 2012). Metode pra-perlakuan basa kekurangannya adalah tidak efisien pada biomassa berkadar lignin tinggi seperti kayu. Kerugian lainnya adalah waktu tinggal yang lama, pengolahan pasca pra-perlakuan mahal, seperti netralisasi bubur hasil pra-perlakuan (Wan *et al.*, 2011) meningkatkan polisakarida yaitu (82,8 % xilan dan 71,5 % glukukan) dan penghapusan lignin (86,1 %).

4.3. Pra-perlakuan Selain Asam dan Basa

Pra-perlakuan selain asam dan basa telah dikembangkan pula pra-perlakuan secara kimia lain yaitu: pra-perlakuan oksidasi, oksidan utama yang digunakan adalah oksigen, ozon, dan hidrogen peroksida. Oksidasi mengakibatkan pembelahan lignin, penghancuran hemiselulosa menjadi gula dan turunannya asam organik sebagian selulosa. Pra-perlakuan berbasis pelarut, pra-perlakuan organo solven memanfaatkan pelarut organik seperti metanol,

etanol, aseton, etilen glikol. Pra-perlakuan *Deep eutectic solvents (DES)*, campuran DES disiapkan dengan kombinasi donor ikatan hidrogen (alkohol, amida, dan asam karboksilat) dan akseptor ikatan hidrogen (kuaterner garam amonium) pada suhu sedang (60–80°C). Campuran ini terdiri dari ion non-simetris yang memiliki titik leleh dan kisi energi rendah (Sattlewal *et al.*, 2018; Sarmad *et al.*, 2017). *Ionic liquid (IL) pretreatment*, IL biasanya terdiri dari kation organik besar dan anion anorganik kecil (titik lebur: 100°C). Senyawa-senyawa tersebut bisa melarutkan karbohidrat dan lignin polimer BLS melalui pemutusan ikatan hidrogen yang mengganggu jaringan rumit interaksi non-kovalen antara selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Ninomiya *et al.*, 2012). *Hydrotropic pretreatment*, adalah proses reaksi kimia yang mengandung gugus fungsi hidrofilik dan hidrofobik yang dapat melarutkan senyawa tersebut dalam larutan biomassa. Beberapa senyawa *hydrotropic* adalah natrium benzoat, natrium simenesulfonat, natrium fenolulfonat, natrium naftalena sulfonat, natrium salisilat, natrium xilena sulfonat, dan natrium toluenasulfonat; *Saltspretreatmen* adalah praperlakuan dengan senyawa-senyawa garam, beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa garam logam dapat mengkatalisasi *dekonstruksi* BLS (Liu *et al.*, 2009). Prinsip dasar dari *Saltspretreatmen* adalah pembentukan asam Lewis dengan logam kompleks dalam air. Kation logam ini bertindak sebagai asam Lewis yang dapat memecahkan ikatan glikosida pada hemiselulosa kemudian menghasilkan xilosa.

4.4. Metode Pretreatment Biohidrolisis

Selain menggunakan katalis kimia, hidrolisis biomassa lignoselulosa juga dapat menggunakan katalis biologi (biohidrolisis). Katalis yang digunakan dalam biohidrolisis biomassa lignoselulosa dapat berupa mikroorganisme maupun enzim. Parameter yang mempengaruhi hidrolisis lignoselulosa secara biologi adalah jenis biomassa, suhu inkubasi, waktu inkubasi, kelembapan, jenis mikroorganisme, aerasi, pH, konsentrasi inokulum, serta ukuran partikel (Sindhu *et al.*, 2015). Mikroorganisme penghidrolisis lignoselulosa paling banyak berasal dari kelompok fungi yang biasa dikenal dengan *wood-rot fungi*. Identifikasi jamur yang dapat menghidrolisis kayu telah lama dilakukan. Sebanyak 126 spesies jamur pelapuk telah dilaporkan dapat melakukan pembusukan kayu. Secara umum jamur tersebut dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu jamur pelapuk coklat, jamur pelapuk putih, dan jamur pelapuk lunak. Jamur pelapuk lunak lebih baik dalam menghidrolisis hemiselulosa dan pektin (Kumar *et al.*, 2018), sedangkan jamur pelapuk putih menghidrolisis lignin lebih baik dibandingkan dengan jenis jamur pelapuk lainnya (Madadi dan Abbas, 2017; Floudas *et al.*, 2020).

Selain fungi, mikroorganisme yang dapat menghidrolisis lignoselulosa yaitu kapang seperti

Neurospora discreta, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*. Kemampuan kapang tersebut dalam menghidrolisis lignin tidak sampai 30 % (Madadi dan Abbas, 2017). Mikroorganisme pendegradasi lignin dari kelompok bakteri yaitu *Burkholderia* sp. Bakteri ini dilaporkan mampu menghidrolisis lignin dari batang gandum sebanyak 16 % setelah 15 hari inkubasi (Yang *et al.*, 2018). Kemampuan jamur pelapuk dalam menghidrolisis biomassa lignoselulosa disebabkan oleh produksi *carbohydrate-active enzyme (CAZy)* atau biasa dikenal sebagai *CAZymes* (Kumar *et al.*, 2018). *CAZymes* dibagi menjadi beberapa kelompok seperti, enzim lignolitik, enzim selulolitik, enzim hemiselulolitik, dan pektinase (Kumar *et al.*, 2018). Enzim lignolitik berperan dalam memecah struktur kayu sedangkan enzim selulolitik dan enzim hemiselulolitik mendegradasi polisakarida menjadi gula sederhana.

Enzim lignolitik adalah enzim yang dapat memotong lignin dari lignoselulosa atau karbohidrat kompleks menjadi bentuk karbohidrat yang lebih sederhana (Kuswiyasari *et al.*, 2015). Aktivitas degradasi lignin oleh *Omphalina* sp. and *P. ostreatus* terjadi pada fase pertumbuhan fungi, miselium dari fungi tumbuh menutupi permukaan kayu dan mengeluarkan enzim-enzim yang dibutuhkan untuk mendegradasi lignin. Enzim yang pertama kali terdeteksi adalah lakase baru kemudian Mangan peroksidase (MnP) dan lignin peroksidase (LiP) (Widiastuti *et al.*, 2008). Penambahan inducer seperti 1 % veratril alkohol diketahui mampu meningkatkan produksi MnP dan 5 % gliserol mampu meningkatkan aktivitas dari lakase yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih dari genus *Trametes* (Krumova *et al.*, 2018). Mekanisme hidrolisis oleh enzim lignolitik berbeda antara satu dengan yang lain. Lignin peroksidase (LiP) bekerja dengan mengoksidasi struktur lignin nonfenolik, Mangan peroksidase (MnP) mengoksidasi senyawa fenolik dari lignin dengan cara mengoksidasi Mangan 2⁺ menjadi Mangan 3⁺. LiP dan MnP memanfaatkan hidrogen peroksida sebagai oksidan dalam menghidrolisis lignin, sedangkan lakase mengoksidasi senyawa fenolik pada lignin dengan bantuan oksigen.

Xilanase dibutuhkan untuk menghidrolisis hemiselulosa yang berasal dari kayu yang keras, sedangkan mannanase digunakan untuk menghidrolisis dari kayu lunak (Álvarez *et al.*, 2016). Aktivitas xilanase dalam menghidrolisis substratnya dapat dihambat oleh produk hidrolisis dari lignoselulosa lain seperti furan dan asam alifatik (Hidayatullah *et al.*, 2020). Xilanase dari famili GH10EX (*glycoside hydrolase family 10endo-xylanase*) diketahui mampu mendegradasi biomassa lebih baik dibandingkan family GH11EX (*glycoside hydrolase family 11endo-xylanase*) karena GH10EX lebih dekat pada rantai utama xilan serta bersifat termotabil (Hu dan Saddler, 2018). Sifat xilanase yang toleran terhadap produk turunan dari hidrolisis lignoselulosa

seperti ethanol dan senyawa fenolik dapat membantu hidrolisis lignoselulosa lebih efektif. Namun, mekanisme xilanase dalam memecah lignoselulosa secara utuh masih membutuhkan riset lebih lanjut. Pemanfaatan xilanase dalam menghidrolisis lignoselulosa banyak digunakan untuk membantu proses fermentasi pembentukan alkohol maupun gula alkohol seperti xilitol.

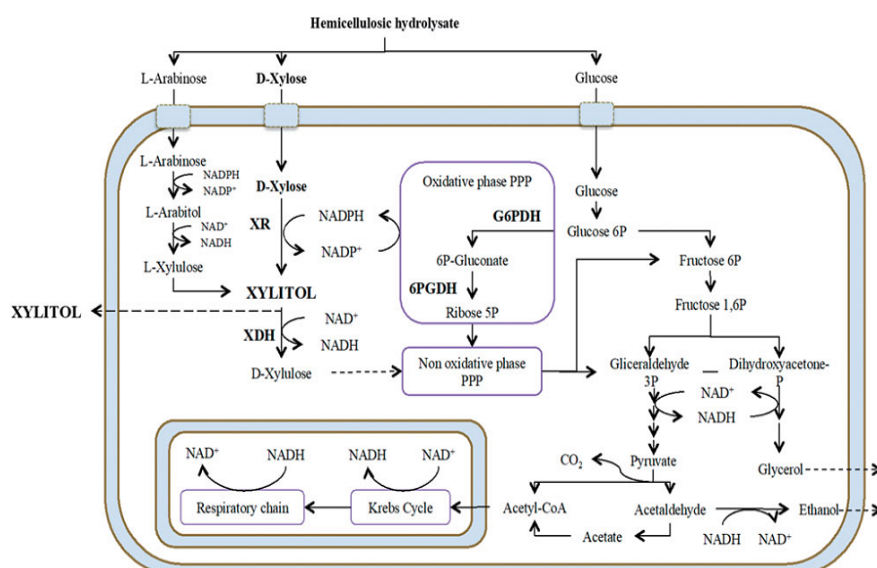
5. Fermentasi Hidrolisat

Produk hidrolisis lignoselulosa baik secara kimiawi maupun biologi dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk fermentasi. Fermentasi adalah proses katabolisme senyawa organik oleh bakteri anaerob atau aerob fakultatif dalam kondisi gelap dan tanpa adanya akseptor elektron melalui reaksi oksidasi-reduksi yang seimbang (Muller, 2001). Pemanfaatan biomasa lignoselulosa sebagai substrat fermentasi karena harganya yang relatif murah, mudah ditemukan, serta *renewable*. Salah satu produk fermentasi biomassa lignoselulosa adalah xilitol (Rao et al., 2016).

Xilitol merupakan gula yang sulit ditemukan atau biasa dikenal sebagai *rare sugar* yang dapat diproduksi secara kimiawi melalui proses hidrogenasi D-xilosa (Granström et al., 2007). Saat ini industri lebih memilih produksi xilitol melalui fermentasi biomassa oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang mampu memproduksi xilitol diantaranya ragi dari genus *Pichia* (Oh et al., 2013), *Candida* (Martiniano et al., 2013), *Sugiyamaela* (Sena et al., 2017). Jalur metabolisme gula hasil hidrolisis biomassa lignoselulosa menjadi xilitol tersaji pada Gambar 4. Mikroorganisme mampu memanfaatkan gula pentose dan heksosa dari hasil pra-perlakuan dari biomasa. Dalam aplikasi xilitol,

mikroorganisme yeast mampu memetabolisme xilosa untuk menghasilkan xilitol.

Beberapa teknik fermentasi dilakukan untuk meningkatkan produksi xilitol. Seperti optimasi jenis substrat, sistem fermentasi (*Simultaneous hydrolysis and fermentation* (SHF) atau *Simultaneous Saccharification and fermentation* (SSF)), teknik kultivasi (single kultur ataupun cokultur), teknik pemberian substrat, komposisi media, dan bahkan rekayasa isolat yang digunakan untuk fermentasi (imobilisasi sel, rekayasa genetik). Pemilihan ragi untuk fermentasi merupakan hal yang penting dalam proses fermentasi xilitol. Beberapa strain ragi digunakan untuk produksi xilitol, yaitu *Candida tropicalis* (Misra dan Raghuwanshi, 2012; Rao et al., 2006), *C. guilliermondii* (Arruda et al., 2017), *C. glycerinogenes* (Zhang et al., 2015), *C. mogii* (Tochampa et al., 2005), *Rhodotorula mucilaginosa* (Vajzovic et al., 2012), *Pichia pastoris* (Cheng et al., 2014), *Yamadazyma ubonensis* (Junyapate et al., 2014), *Scheffersomyces amazonensis* (Cadete et al., 2016), dan *Meyerozyma caribbica* Y67 (Saputra et al., 2020). *Saccharomyces cerevisiae* strain asli tidak dapat memfermentasi gula xilosa untuk membentuk xilitol, namun dengan memasukkan gen penyandi xilosa reduktase (XR) dari *Scheffersomyces (Pichia) stipites*, maka isolat hasil rekayasa dapat memanfaatkan xilosa untuk produksi xilitol (Oh et al., 2013). Jalur pentosa fosfat merupakan jalur utama dalam asimilasi xilosa menjadi xilitol (Ahmad et al., 2012) merekayasa gen *zwf* dan *gnd* (penyandi glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) dan 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH) pada jalur tersebut untuk meningkatkan produksi xilitol (Ahmad et al., 2012).



Gambar 4 Model metabolisme yang terlibat pada asimilasi xilosa dan pembentukan xilitol oleh ragi (Granström et al., 2007).

6. Pemurnian Xilitol Hasil Fermentasi

Fermentasi xilitol, baik dengan menggunakan medium sintesis maupun hidrolisat biomasa, menghasilkan produk samping yang terdiri dari bermacam-macam senyawa kimia meliputi asam asetat, gliserol, 5-HMF, dan furfural (Kresnowati *et al.*, 2016). Dengan adanya senyawa-senyawa tersebut, maka sulit untuk dilakukan pemanfaatannya secara langsung. Oleh karena itu diperlukan proses pemurnian yang tepat dan mampu menghasilkan rendemen xilitol yang tinggi. Pemurnian xilitol juga diutamakan harus memenuhi standar keamanan pangan, karena xilitol banyak dimanfaatkan dalam pangan dan obat. Beberapa metode telah digunakan untuk hal tersebut, antara lain pemisahan cair-cair (Mun *et al.*, 2016), resin pengubah ion (Kitamura *et al.*, 2019), teknologi membran (Faneer *et al.*, 2017), dan kristalisasi (Mukherji *et al.*, 2013).

Pemisahan xilitol hasil fermentasi bisa dilakukan dengan menggunakan pemisahan cair-cair yaitu, memindahkan komponen terlarut dari satu fase ke fase yang lain berdasarkan kelarutan, dimana fase tersebut terdiri dari fase organik dan fase air. Fase organik pada umumnya bersifat semi polar karena mampu mengikat pengotor yang berupa senyawa fenolik, yang banyak terdapat dalam hasil fermentasi yang menggunakan hidrolisat lignoselulosa. Pelarut yang sering digunakan antara lain etil asetat, kloroform, dan diklorometana. Namun, hanya etil asetat yang mampu menjernihkan larutan hasil fermentasi dan dinilai paling efektif untuk digunakan dalam pemurnian xilitol. Keuntungan menggunakan metode ini yaitu sederhana, mudah dilakukan, dan pelarut bisa digunakan secara berulang (Mun *et al.*, 2016).

Pemurnian xilitol juga telah dilakukan dengan metode kromatografi menggunakan resin pengubah ion. Resin pengubah ion mampu menjernihkan larutan untuk mengurangi pengotor yang bersifat dapat larut dalam air, serta senyawa-senyawa inhibitor meliputi garam anorganik, asam asetat, furfural, dan 5-HMF). Penggunaan resin pengubah ion A-860S yang merupakan pengubah anion basa kuat, dan C-150 yang merupakan pengubah kation asam kuat. Pengubah anion digunakan untuk menghilangkan senyawa berwarna dari larutan gula-gulaan, sedangkan pengubah kation digunakan untuk demineralisasi, desalinasi, dan menghilangkan muatan positif dari senyawa gula-gulaan (Wei *et al.*, 2010). Proses pemurnian dengan menggunakan siklus pada resin pengubah ion adalah sebagai berikut, resin diregenerasi dengan larutan NaCl atau NaOH untuk anion dan NaCl atau HCl untuk kation; resin dicuci dengan air deionisasi; kemudian resin digunakan untuk menjernihkan larutan hasil fermentasi; lalu, resin dicuci kembali dengan air deionisasi (Canilha *et al.* 2008). Kondisi optimal diperoleh pada kombinasi resin A-860S dan A-500PS, yaitu sebanyak 97.5 % produk samping dan 99.5 % warna berhasil dihilangkan. Larutan hasil fermentasi yang telah jernih

masih mengandung xilosa, arabinosa, gliserol, asam asetat, dan senyawa turunan lignin. Oleh karena itu, Canilha *et al.*, (2008) melanjutkan ke tahap kristalisasi xilitol dan menghasilkan perolehan xilitol murni sebanyak 43.5 % dari xilitol awal dengan tingkat kemurnian 95.9 %.

Teknologi pemisahan menggunakan membran juga dikembangkan untuk pemurnian xilitol. Membran separasi digunakan untuk pemurnian larutan hasil fermentasi karena dapat menghemat energi dan menghasilkan kemurnian yang tinggi. Membran polietersulfon 10,000 MWCO (*molecular weight cut-off*) dinilai efektif untuk ultrafiltrasi (Faneer *et al.*, 2017) mengkombinasikan membran tersebut dengan *pluronic* F127, sehingga dapat meningkatkan perembesan xilitol. Membran tersebut mampu meloloskan 82.2-90.3 % xilitol serta menahan pengotor oligopeptida dan peptida sebanyak 49.2-53.6 %. Kemurnian kristal yang diperoleh, setelah pemurnian menggunakan membran mencapai 90.3 %.

Metode kristalisasi pada beberapa studi, dikombinasikan dengan metode lainnya untuk memperoleh kristal xilitol sebagai produk akhir (Antunes *et al.*, 2017). Metode ini memerlukan beberapa tahap pemurnian yaitu; adsorpsi, pemekatan dengan cara evaporasi, pengendapan, dan kemudian kristalisasi. Adsorpsi dilakukan dengan penambahan karbon aktif yang bertujuan untuk menjernihkan larutan sehingga dihasilkan kristal xilitol yang jernih dengan kemurnian tinggi. Metode ini mampu mengurangi pengotor lain seperti senyawa fenolik, asam asetat, senyawa aromatik, furfural dan 5-HMF. Wei *et al.*, (2010) melaporkan bahwa dengan menggunakan karbon aktif, rasio penghilangan zat warna mencapai 99 %, sedangkan xilitol yang hilang kurang dari 5 %. Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi cair-cair, penjernihan larutan hasil fermentasi xilitol menggunakan karbon aktif dinilai lebih murah, mudah, efisien, cepat, dan lebih ramah lingkungan (Wei *et al.*, 2010; Misra dan Raghuvanshi 2011). Setelah dilakukan adsorpsi dan pemekatan, larutan hasil fermentasi kemudian dicampur etanol untuk mengendapkan xilitol dan memisahkannya dengan pengotor yang tertinggal dalam supernatan. Lalu dilarutkan kembali dengan akuades. Selanjutnya, dilakukan kristalisasi dengan mengevaporasi larutan pada suhu 30-40 °C dan ditambahkan etanol secara perlahan-lahan hingga terbentuk kristal xilitol. Untuk menambah kemurnian xilitol, kualitas dan kemurnian kristal xilitol sangat dipengaruhi oleh proses pemurnian sebelumnya, antara lain penghilangan pengotor berupa warna (umumnya dari senyawa fenolik), garam-garam mineral, dan sisa gula dan asam (Wei *et al.*, 2010). Laporan dari Kumar (2019) dengan menggunakan kombinasi metode untuk melakukan pemurnian xilitol yang diproduksi dari tongkol jagung oleh *Candida tropicalis* dengan proses karbonasi, pengubahan ion, dan perlakuan menggunakan karbon aktif. Proses karbonasi yaitu menyemburkan gas karbondioksida ke dalam larutan hasil fermentasi.

Proses ini efektif untuk menghilangkan warna, kekeruhan, dan sisa asam pada larutan. Selanjutnya, larutan hasil fermentasi yang terkarbonasi tersebut dipurifikasi dengan kromatografi resin pengubah anion kuat IRN78. Konsentrasi garam dan xilitol sebelum dan sesudah purifikasi dihitung untuk mengetahui tingkat pemurniannya. Selanjutnya larutan xilitol hasil purifikasi dipekatkan dan ditambahkan karbon aktif untuk menghilangkan pengotor-pengotor lain seperti protein dan senyawa fenolik. Setelah dilakukan pemurnian dengan tiga tahap tersebut, tingkat perolehan xilitol murni adalah 78.06 % dari konsentrasi awal xilitol yang diperoleh dengan kemurnian 92-94 %.

7. Kesimpulan

Biomassa banyak terdapat pada perkebunan sebagai limbah yang belum dimanfaatkan secara optimal keberadaannya. Struktur BLS sangat kompleks, terikat secara kuat dan kaku terhadap hidrolisis enzimatik, sehingga dapat menghambat konversi BLS menjadi biofuel. Pretreatment atau perlakuan reaksi awal dapat membantu dalam mengatasi kekakuan alami ini,

sehingga BLS menjadi lebih mudah pecah menjadi komponen-komponennya. Pra-perlakuan asam dapat melarutkan hemiselulosa, meningkatkan porositas biomassa dan membuat selulosa lebih mudah diakses oleh serangan enzim. Pra-perlakuan basa dapat memperluas area permukaan, sehingga mudah diakses, mengurangi kristalinitas selulosa, gangguan lignin, menghilangkan gugus asetil, dan membelah asam uronat. Selain asam dan basa telah dikembangkan pula pretreatment secara biohidrolisis, oksidatif, organo solven, *Deep Eutectic Solvents* (DES), *Ionic Liquid* (IL), hidrotropik, dan garam. Selain itu, kristal xilitol yang diperoleh setelah melalui tahap pemurnian harus memenuhi standar keamanan pangan karena, karena xilitol banyak dimanfaatkan dalam industri pangan dan obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh penulis dalam tulisan ini mempunyai kontribusi yang sama sebagai kontributor utama. Terima kasih disampaikan kepada rekan rekan kelompok penelitian Rekayasa Bioproses Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI atas kerjasamanya.

Tabel 3. Metode pemurnian xilitol dan perolehannya (Koet *al.*, 2008)

Metoda	Media fermentasi dan mikroba	Hasil perolehan
Membran 10,000 MWCO (<i>molecular weight cutoff</i>) polietersulfon	Media sintesis <i>Candida boidinii</i> (BCRC 21432), <i>C. guilliermondii</i> (BCRC 21549), <i>C. tropicalis</i> (BCRC 20520), <i>C. utilis</i> (BCRC 20334), and <i>P. anomala</i> (BCRC 21359)	0.79 g/g xilitol oleh <i>Candida tropicalis</i>
Membran HG19 10,000 MWCO polisulfon	Media sintesis <i>Candida tropicalis</i> (ATCC 96745)	87 % xilitol murni dikristalkan dengan kemurnian 90.3 %
Flokulasi dan adsorpsi menggunakan Aluminium Poliklorida dan karbon aktif 10 %	Hidrolisat ampas tebu <i>Candida guilliermondii</i>	90.3 % xilitol
Ekstraksi cair-cair	Hidrolisat bubuk kayu Meranti <i>Candida tropicalis</i>	78.14 % xilitol
Ekstraksi cair-cair	Hidrolisat ampas tebu <i>Candida guilliermondii</i>	Ekstraksi cair-cair 99.17 % xilitol menggunakan etil asetat 95.41 % xilitol menggunakan kloroform 96.46 % xilitol menggunakan diklorometana
a. Ekstraksi cair-cair b. Karbon aktif c. Kristalisasi	Hidrolisat tongkol jagung <i>Candida tropicalis</i>	47.89 % xilitol dengan kemurnian 98.99 %
a. Karbon aktif	Media sintesis <i>Debaryomyces hansenii</i>	97 % xilitol
b. Kristalisasi	Media sintesis <i>Pichia carribica</i>	0.852 g/g xilitol
a. Karbonasi b. Resin pengubah anion IRN78 c. Karbon aktif	Hidrolisat tongkol jagung <i>Candida tropicalis</i>	78.06 % xilitol kemurnian 92-94 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- Ahmad, I., Shim, W. Y., Jeon, W. Y., Yoon, B. H., & Kim, J. H. (2012). Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1), 199-204. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0641-9>.
- Álvarez, C., Reyes - Sosa, F. M., & Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology*, 9(2), 149-156. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12346>.
- An, S., Li, W., Liu, Q., Li, M., Ma, Q., Ma, L., & Chang, H. M. (2017). A two-stage pretreatment using acidic dioxane followed by dilute hydrochloric acid on sugar production from corn stover. *RSC advances*, 7(52), 32452-32460. <https://doi.org/10.1039/C7RA05280D>.
- An, S., Li, W., Liu, Q., Xia, Y., Zhang, T., Huang, F., ... & Chen, L. (2019). Combined dilute hydrochloric acid and alkaline wet oxidation pretreatment to improve sugar recovery of corn stover. *Bioresource technology*, 271, 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.126>
- Antonopoulou, G., Vayenas, D., & Lyberatos, G. (2016). Ethanol and hydrogen production from sunflower straw: The effect of pretreatment on the whole slurry fermentation. *Biochemical engineering journal*, 116, 65-74.
- Antunes, F. A. F., dos Santos, J. C., da Cunha, M. A. A., Brumano, L. P., dos Santos Milessi, T. S., Terán-Hilares, R., ... & da Silva, S. S. (2017). Biotechnological production of xylitol from biomass. In *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources* (pp. 311-342). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-104172-3_10.
- Arruda, P. V., & Felipe, M. G. (2009). Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Current microbiology*, 58(3), 274-278.
- Bai, X., Lant, P. A., Jensen, P. D., Astals, S., & Pratt, S. (2016). Enhanced methane production from algal digestion using free nitrous acid pre-treatment. *Renewable Energy*, 88, 383-390.
- Battista, F., Mancini, G., Ruggeri, B., & Fino, D. (2016). Selection of the best pretreatment for hydrogen and bioethanol production from olive oil waste products. *Renewable Energy*, 88, 401-407.
- Berlin, A. (2013). No barriers to cellulose breakdown. *Science*, 342(6165), 1454-1456.
- Cadete, R. M., Melo-Cheab, M. A., Viana, A. L., Oliveira, E. S., Fonseca, C., & Rosa, C. A. (2016). The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 1-5.
- Canilha, L., Rodrigues, R. C. L. B., Antunes, F. A. F., Chandel, A. K., Milessi, T. S. D. S., Felipe, M. D. G. A., & Silva, S. D. (2013). Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-Techniques, applications and commercialization*, 1, 15-45.
- Canilha, L., Carvalho, W., Giulietti, M., Felipe, M. D. G. A., & Almeida E Silva, J. B. (2008). Clarification of a wheat straw - derived medium with ion - exchange resins for xylitol crystallization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(5), 715-721. <https://doi.org/10.1002/jctb.1861>.
- Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A., & Kuhad, R. C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource technology*, 98(10), 1947-1950.
- Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(3), 1462-1476. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.035>.
- Chen, X. (2012). Development of effective pretreatment and bioconversion systems for converting organic residuals to bioenergy. University of California, Davis.
- Cheng, H., Lv, J., Wang, H., Wang, B., Li, Z., & Deng, Z. (2014). Genetically engineered *Pichia pastoris* yeast for conversion of glucose to xylitol by a single-fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(8), 3539-3552. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5501-x>
- Dutta, S., & Wu, K. C. W. (2014). Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green chemistry*, 16(11), 4615-4626.
- Faneer, K. A., Rohani, R., & Mohammad, A. W. (2017). Polyethersulfone/pluronic F127 blended nanofiltration membranes for xylitol purification. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21(1), 221-230. <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2101-26>
- Floudas, D., Bentzer, J., Ahrén, D., Johansson, T., Persson, P., & Tunlid, A. (2020). Uncovering the hidden diversity of litter-decomposition mechanisms in mushroom-forming fungi. *The ISME journal*, 14(8), 2046-2059. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0667-6>
- Granström, T. B., Izumori, K., & Leisola, M. (2007). A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(2), 273-276. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0760-4>
- Hermiati, E., Laksana, R. P. B., Fatriasari, W., Kholida, L. N., Thontowi, A., Arnieyanto, D. R., ... & Watanabe, T. (2020). Microwave-assisted acid pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of sugarcane trash. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- Hermiati, E., Oktaviani, M., Ermawar, R. A., Laksana, R. P. B., Kholida, L. N., Thontowi, A., ... & Watanabe, T. (2020). Optimization of Xylose Production from Sugarcane Trash by Microwave-Maleic Acid Hydrolysis. *Reaktor*, 20(2), 81-88.
- Hermiati E., D. Mangunwidjaja, C.T. Sunarti, O. Suparno, B. Prasetya 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4).
- Hidayatullah, I. M., T. Setiadi, M. Tri, A. Penia, R. Boopathy. 2020. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material. *Bioresource technology*, 300, 122740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122740>.
- Hou-Rui, Z. (2012). Key drivers influencing the large scale production of xylitol. In *D-Xylitol* (pp. 267-289). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hu, J., & Saddler, J. N. (2018). Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the

- deconstruction of pretreated biomass?. *Biomass and Bioenergy*, 110, 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.007>.
- Jain, T., & Grover, K. (2015). Sweeteners in human nutrition. *International Journal of Health Sciences and Research*, 5(5), 439-451.
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), 119-134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Junyapate, K., Jindamorakot, S., & Limtong, S. (2014). *Yamadazyma ubonensis* fa, sp. nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(3), 471-480. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0098-8>.
- Kitamura, Y., Shobu, R., Matsuura, H., Jyo, A., & Ihara, T. (2020). Xylitol Separation from a Polyol Mixture Using Lanthanide Ion-loaded Resins. *Analytical Sciences*, 19N032. <https://doi.org/10.2116/analsci.19N032>.
- Ko, C. H., Chiu, P. C., Yang, C. L., & Chang, K. H. (2008). Xylitol conversion by fermentation using five yeast strains and polyelectrolyte-assisted ultrafiltration. *Biotechnology letters*, 30(1), 81-86. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9507>
- Kresnowati, M. T. A. P., Setiadi, T., Tantra, T. M., & Rusdi, D. (2016). Microbial production of xylitol from oil palm empty fruit bunch hydrolysate: Effects of inoculum and pH. *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 48(5), 523-533.
- Krumova, E., Kostadinova, N., Miteva - Staleva, J., Stoyancheva, G., Spassova, B., Abrashev, R., & Angelova, M. (2018). Potential of ligninolytic enzymatic complex produced by white - rot fungi from genus *Trametes* isolated from Bulgarian forest soil. *Engineering in Life Sciences*, 18(9), 692-701. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800055>.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel processing technology*, 199, 106244.
- Kumari, D., & Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 877-891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>.
- Kumar, V., Sandhu, P. P., Ahluwalia, V., Mishra, B. B., & Yadav, S. K. (2019). Improved upstream processing for detoxification and recovery of xylitol produced from corn cob. *Bioresource technology*, 291, 121931.
- Kuswytasari, N. D., Shovitri, M., & Zulaika, E. (2015). Ligninolytic Enzymes Produced by *Gliomastix* sp. in an Organic Waste Medium. *IPTEK the Journal for Technology and Science*, 26(1).
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and microbial technology*, 24(3-4), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X).
- Lee, J. K., Koo, B. S., & Kim, S. Y. (2003). Cloning and characterization of the xyl1 gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Applied and environmental microbiology*, 69(10), 6179-6188. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6179-6188.2003>.
- Liu, Q., Li, W., Ma, Q., An, S., Li, M., Jameel, H., & Chang, H. M. (2016). Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process. *Bioresource technology*, 211, 435-442. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.131>.
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2018). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource technology*, 247, 736-743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139>
- Madadi, M., & Abbas, A. (2017). Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 8(2), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000398>.
- Misra, S., Raghuvanshi, S., Gupta, P., Dutt, K., & Saxena, R. K. (2012). Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(2), 393-402. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9646-2>
- Mukherji, R., Joshi-Navare, K., & Prabhune, A. (2013). Crystalline Xylitol Production by a Novel Yeast, *Pichia caribbica* (HQ222812), and Its Application for Quorum Sensing Inhibition in Gram-Negative Marker Strain *Chromobacterium violaceum* CV026. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(6), 1753-1763.
- Müller, V. (2001). Bacterial fermentation. e LS.
- Mun, L. W., Rafiqul, I. S. M., Sakinah, A. M. M., & Zularisam, A. W. (2016). Purification of bioxylitol by liquid-liquid extraction from enzymatic reaction mixture. *Separation Science and Technology*, 51(14), 2369-2377. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1203335>.
- Nges, I. A., Li, C., Wang, B., Xiao, L., Yi, Z., & Liu, J. (2016). Physio-chemical pretreatments for improved methane potential of *Miscanthus lutarioriparius*. *Fuel*, 166, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.10.108>.
- Ninomiya, K., Kamide, K., Takahashi, K., & Shimizu, N. (2012). Enhanced enzymatic saccharification of kenaf powder after ultrasonic pretreatment in ionic liquids at room temperature. *Bioresource technology*, 103(1), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.19>.
- Oh, E. J., Ha, S. J., Kim, S. R., Lee, W. H., Galazka, J. M., Cate, J. H., & Jin, Y. S. (2013). Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 15, 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.003>.
- Oktaviani, M., Hermiati, E., Thontowi, A., Laksana, R. P. B., Kholida, L. N., Andriani, A., & Mangunwardoyo, W. (2019, March). Production of xylose, glucose, and other products from tropical lignocellulose biomass by using maleic acid pretreatment. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 251, No. 1, p. 012013). IOP Publishing.
- Martiniano, S. E., Chandel, A. K., Soares, L. C., Pagnocca, F. C., & da Silva, S. S. (2013). Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. *3 Biotech*, 3(5), 345-352. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0145-1>.
- Pal, S., Mondal, A. K., & Sahoo, D. K. (2016). Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. *Process Biochemistry*, 51(7), 809-819.

- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Rafiqul, I. S. M., & Sakinah, A. M. (2012). Bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. *International Food Research Journal*, 19(2), 405.
- Rao, R. S., Jyothi, C. P., Prakasham, R. S., Sarma, P. N., & Rao, L. V. (2006). Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource technology*, 97(15), 1974-1978. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.08.015>
- Rao, L. V., Goli, J. K., Gentela, J., & Koti, S. (2016). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Bioresource technology*, 213, 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- Saputra, H., Thontowi, A., Kholida, L. N., & Kanti, A. (2020, February). Efficiency of Xylitol Production from *Meyerozyma caribbica* Y67 with Cell Initiation and Volume Fermentation. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 439, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
- Sarmad, S., Xie, Y., Mikkola, J. P., & Ji, X. (2017). Screening of deep eutectic solvents (DESs) as green CO₂ sorbents: from solubility to viscosity. *New Journal of Chemistry*, 41(1), 290-301. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03140D>.
- Sena, L. M., Morais, C. G., Lopes, M. R., Santos, R. O., Uetanabaro, A. P., Morais, P. B., ... & Rosa, C. A. (2017). d-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(1), 53-67.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource technology*, 199, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.
- Shahabazuddin, M., Chandra, T. S., Meena, S., Sukumaran, R. K., Shetty, N. P., & Mudliar, S. N. (2018). Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresource technology*, 263, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.027>.
- Su, Y., Xian, H., Shi, S., Zhang, C., Manik, S. N., Mao, J., ... & Liu, H. (2016). Biodegradation of lignin and nicotine with white rot fungi for the delignification and detoxification of tobacco stalk. *BMC biotechnology*, 16(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0311-8>.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 199, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>.
- Tao, X., Li, J., Zhang, P., Nabi, M., Jin, S., Li, F., ... & Ye, J. (2017). Reinforced acid-pretreatment of *Triarrhena lutarioriparia* to accelerate its enzymatic hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(29), 18301-18308. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.149>.
- Thontowi, A., Mayangsari, W., Kholida, L. N., Kanti, A., Wardani, A. K., & Hermiati, E. (2020, February). Evaluation of Addition The Activated Charcoals and pH Adjustment in The Treatment of Lignocellulosic Hydrolysates for Xylitol Production. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 439, No. 1, p. 012023). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/439/1/012023>
- Tochampa, W., Sirisansaneeyakul, S., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P., Bakker, H. H., & Chisti, Y. (2005). A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 28(3), 175-183. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0025-0>
- Ur-Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., & Murtaza, M. A. (2015). Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(11), 1514-1528.
- Vajzovic, A., Bura, R., Kohlmeier, K., & Doty, S. L. (2012). Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 1453-1463. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1154-5>
- Wan, C., Zhou, Y., & Li, Y. (2011). Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresource technology*, 102(10), 6254-6259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.075>.
- Wei, J., Yuan, Q., Wang, T., & Wang, L. (2010). Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 4(1), 57-64. <https://doi.org/10.1007/s11705-009-0295-1>
- Wen, Z., Wu, M., Lin, Y., Yang, L., Lin, J., & Cen, P. (2014). Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium cellulovorans*. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-009>
- Widiastuti, H., & Wulaningtyas, A. (2008). Activity of ligninolytic enzymes during growth and fruiting body development of white rot fungi *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 15(4), 140-144. <https://doi.org/10.4308/hjb.15.4.140>.
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E., & Viikari, L. (2005). Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, 1, 1023-1062
- Yang, C. X., Wang, T., Gao, L. N., Yin, H. J., & Lü, X. (2017). Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. *Journal of applied microbiology*, 123(6), 1447-1460. <https://doi.org/10.1111/jam.13562>.
- Zhang, C., Zong, H., Zhuge, B., Lu, X., Fang, H., & Zhuge, J. (2015). Production of xylitol from D-xylose by overexpression of xylose reductase in osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(5), 1511-1527. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1661-8>
- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(5), 561-579. <https://doi.org/10.1002/bbb.1350>