



PENGARUH ASAM AMINO TERHADAP PROSES FERMENTASI BIOETANOL DAN ANTIOKSIDAN DENGAN BAHAN BAKU TANDAN KOSONG SAWIT

The Effect of Amino Acid on The Bioethanol and Antioksidan Fermentation from Oil Palm Empty Fruit Bunches

Muryanto

Pusat Penelitian Kimia – LIPI, Kawasan Puspipstek Serpong, Tangerang Selatan 15314, Indonesia
Email: moeryanto.mrt@gmail.com

ABSTRAK

Bioetanol merupakan salah satu energi alternatif untuk mensubstitusi bahan bakar minyak. Salah satu sumber bahan baku bioetanol adalah tandan kosong kelapa sawit. Pada proses fermentasi dihasilkan limbah fermentasi yang dapat diekstrak menjadi senyawa antioksidan. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh penambahan asam amino terhadap kandungan bioetanol dan senyawa antioksidan yang dihasilkan. Variasi asam amino yang digunakan pada penelitian ini yaitu L-sistein, glisin, dan asam glutamat. Proses fermentasi dilakukan secara *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*, sedangkan ekstraksi senyawa antioksidan dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Hasil penelitian menunjukkan kadar etanol tertinggi pada TKKS tanpa penambahan asam amino sebesar 5,44% dan kadar glutation tertinggi pada TKKS dengan penambahan asam glutamat setelah ekstraksi dengan metanol diperoleh sebesar 290 ppm.

Kata kunci : Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKS), SSF, Antioksidan, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Bioethanol is an alternative energy for substituting fuel oil. Oil palm empty fruit bunches is one source of bioethanol raw material. The fermentation process produces fermentation waste which can be extracted into antioxidant compounds. In this research, the effect of adding amino acids into bioethanol and antioxidant compounds generated from the fermentation process was studied. The variations of amino acid were L-cysteine, glycine, and glutamic acid. The fermentation process is carried out by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), while extraction of antioxidant compounds is carried out using methanol solvents. The results showed that the highest ethanol content on OPEFB without amino acids was 5.44% and the highest glutathione content on OPEFB with the addition of glutamic acid after extraction with methanol obtained 290 ppm.

Keywords : Oil Palm Empty Fruit Bunches (OPEFB), SSF, Antioxidant, *Saccharomyces cerevisiae*

PENDAHULUAN

Berkurangnya cadangan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui menyebabkan terjadinya kelangkaan bahan bakar minyak (BBM) di berbagai daerah. Sejak tahun 2008 Indonesia resmi menjadi salah satu negara importir minyak akibat meningkatnya kebutuhan energi yang tidak diimbangi dengan produksi BBM. Fenomena

ini menunjukkan bahwa Indonesia tidak dapat lagi bergantung pada sumber energi fosil dan harus mulai mencari sumber energi non fosil [1]. Salah satu sumber energi non fosil yang dapat digunakan untuk bahan bakar adalah bioetanol. Bioetanol yang sekarang sedang berkembang adalah bioetanol generasi dua yang berasal dari lignoselulosa karena tidak berbenturan dengan bahan pangan. Salah satu sumber

lignoselulosa yang paling melimpah adalah tandan kosong kelapa sawit (TKS) yang merupakan limbah dari industri pengolahan minyak sawit. Ratio TKS mencapai 22% hingga 25% dari berat buah segar [1], [2]. TKS mengandung 36,59% selulosa, 24,97% hemiselulosa dan 26,53% lignin [3].

Proses untuk mendapatkan bioetanol berbahan dasar lignoselulosa dilakukan melalui tahapan proses perlakuan awal untuk menghilangkan lignin dan meningkatkan kandungan selulosa yang kemudian akan di hidrolisis baik dengan kimia maupun dengan enzim untuk menghasilkan glukosa. Kemudian glukosa difermentasi untuk menghasilkan bioetanol menggunakan ragi. Metode yang efektif dan efisien untuk produksi bioetanol diantaranya adalah metode *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF). Metode SSF dilakukan dengan proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara bersamaan. Secara umum metode SSF dapat meningkatkan produktivitas bioetanol, meningkatkan kecepatan hidrolisis dengan cara menghambat produk inhibitor, membutuhkan enzim yang lebih sedikit, waktu proses yang singkat dan biaya yang diperlukan lebih rendah [4], [5].

Sementara itu berdasarkan penelitian Wu et al. [6] (2010), proses fermentasi menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae* akan menghasilkan produk samping berupa senyawa antioksidan glutation. Glutation adalah tripeptida yang terdiri dari sistein, glisin, dan asam glutamat. Glutation adalah agen antioksidan yang dapat diterapkan di berbagai bidang seperti farmasi, kosmetik, bahan makanan dan bidang lainnya [7], [8]. Glutation dalam sel terdapat dalam dua bentuk yaitu *glutathione peroksidase* (GSH) dan *glutathione disulfide* (GSSG). Kebanyakan glutation yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan ragi

diperoleh dalam bentuk GSH [9]. Glutation berada pada intraseluler *S. cerevisiae*, sehingga untuk memperolehnya harus dilakukan proses ekstraksi. Proses ekstraksi antioksidan glutation dapat dihasilkan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut etanol 25% [10], etanol 40% [11], H_3PO_4 0.1 M [9] and buffer fosfat pH 7.2 [12]. Penambahan asam amino tertentu pada proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan antioksidan pada ragi. Pada penelitian ini akan dibahas pengaruh penambahan asam amino terhadap kandungan bioetanol yang dihasilkan dari proses fermentasi TKS. Selain itu akan dilihat juga pengaruhnya terhadap kandungan antioksidan dari limbah fermentasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Tandan kosong kelapa sawit diperoleh dari pabrik kelapa sawit di Riau, Indonesia. TKS terlebih dahulu dilakukan proses perlakuan awal kimia dengan menggunakan larutan NaOH 10% pada suhu $150^{\circ}C$, tekanan 4 bar, selama 30 menit. TKS kemudian dicuci hingga pH netral dan dikeringkan dengan menggunakan oven hingga kadar air dibawah 10%. Proses SSF dilakukan dengan menggunakan buffer sitrat 0.05 M pH 4.85, asam amino yang digunakan glisin, L-sistein, dan asam glutamat. Ragi yang digunakan adalah ragi kering komersial *Saccharomyces cerevisiae*. Sedangkan enzim yang dipakai pada penelitian ini menggunakan enzim selulase kompleks Cellic® Ctec2 dan Cellic® Htec2 dari Novozymes. Proses ekstraksi menggunakan larutan metanol. Sedangkan analisa antioksidan menggunakan bahan buffer fosfat pH 7,52, dan aloksan monohidrat.

Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

Proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan serentak dengan menggunakan metode SSF yang dilakukan oleh Triwahyuni *et al* [5]. TKS yang telah melalui proses perlakuan awal sebelumnya di grinding hingga halus, sebanyak 15 gram berat kering TKS di masukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL setelah itu ditambahkan buffer sitrat pH 4.8 0.05 M dan disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian setelah dingin, enzim selulase (Cellic® Ctec2 dan Cellic®Htec2) 30 FPU, ragi *S. cerevisiae* 1% w/v, dan variasi asam amino (L-sistein, L-glisin, Asam Glutamat) sebanyak 0.05 gram ditambahkan secara bersamaan pada awal fermentasi hingga total volume 100 ml. Sebagai kontrol dilakukan juga proses SSF tanpa penambahan asam amino. Setelah itu dimasukkan ke dalam *shaker incubator* dan dilakukan fermentasi selama 72 jam pada suhu 32°C dan kecepatan 150 rpm. Analisis sampel dilakukan pada jam ke- 72.

Ekstraksi Antioksidan

Sampel yang telah difermentasi selama 72 jam dipisahkan antara etanol yang terbentuk dan ampas fermentasi dengan cara sentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm. Endapan yang dihasilkan kemudian dicuci dengan akuades dan di sentrifuge kembali selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Ampas fermentasi kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga kering. Ampas fermentasi yang telah kering selanjutnya digerus hingga halus. Proses ekstraksi senyawa antioksidan dilakukan dengan melarutkan padatan dengan metanol menggunakan perbandingan ampas fermentasi dengan pelarut 1:3 (b/v). Lama waktu ekstraksi terbagi menjadi 2 tahap yaitu 90 menit pendiaman dan 15 menit

sonikasi. Setelah diekstraksi kemudian sampel disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan filtrat dan endapan. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan metode aloksan menggunakan spektrofotometer uv-vis.

Analisis Senyawa Antioksidan

Analisis antioksidan glutation menggunakan metode yang dilakukan oleh Wen *et al.* [13]. Sebanyak 1 mL sampel hasil ekstraksi ditambahkan 1 mL aloksan 1000 mg/L kemudian ditambahkan sebanyak 3.5 mL buffer fosfat pH 7,52 dan 0,5 mL larutan glisin 0,1 M. Setelah itu diaduk menggunakan vortex dan didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang dan serapan diukur pada panjang gelombang 305 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar glutation dihitung berdasarkan persamaan regresi linier yang dihasilkan dari larutan standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

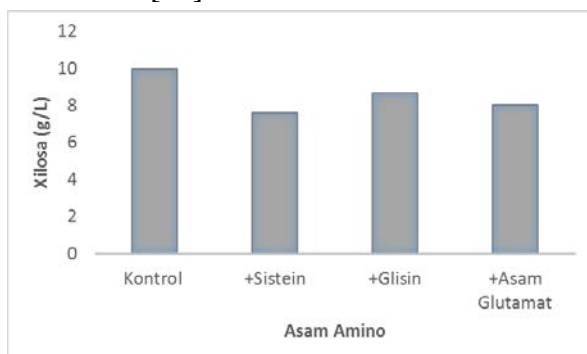
Pengaruh variasi asam amino terhadap kadar etanol

Proses SSF dilakukan dengan menambahkan enzim dan ragi secara bersamaan pada awal fermentasi. Glukosa yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim kemudian digunakan sebagai substrat oleh *Saccharomyces cerevisiae* yang terdapat pada kultur sehingga menghasilkan bioetanol. Enzim selulase yang digunakan pada proses ini adalah enzim selulase kompleks Cellic® Ctec yang mengandung β -glukosidase dan hemiselulase dan Cellic® Htec2 yang mengandung endoxylinase. Enzim selulase kompleks berperan pada proses sakarifikasi (hidrolisis) yaitu bertujuan untuk memecah rantai panjang selulosa menjadi monomer glukosa, kemudian glukosa tersebut secara simultan dikonversi menjadi etanol oleh

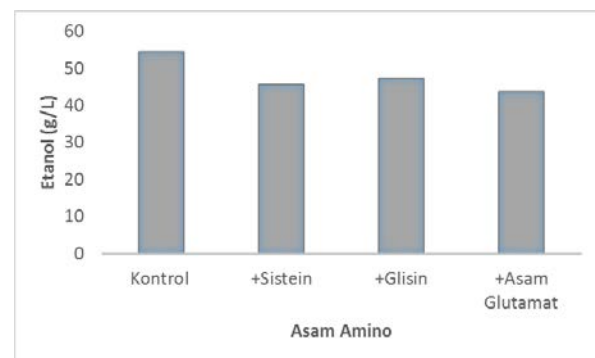
saccharomyces cerevisiae [14]. Kandungan hemiselulase dan endoxylinase yang terdapat pada enzim selulase kompleks tersebut dapat menghidrolisis hemiselulosa menjadi xylosa.

Gambar 1 menunjukkan kadar xylosa setelah fermentasi tertinggi pada sampel tanpa penambahan asam amino yaitu 10 g/L. Masih adanya kadar xylosa ini menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* tidak dapat menfermentasi xylosa untuk menjadi etanol. Ragi *S. cerevisiae* mampu mengubah glukosa menjadi bioetanol sementara xylosa umumnya dikonversi menjadi bioetanol oleh *pichia stipitis*[15], [16].

Kadar bioetanol yang dihasilkan pada proses SSF TKS selama 72 jam ditunjukkan pada Gambar 2. Proses SSF lebih menguntungkan dibandingkan proses lain, karena mengurangi proses terbentuknya inhibitor yang dapat menghambat proses fermentasi. Proses SSF menghasilkan bioetanol disemua penambahan asam amino, namun penambahan asam ssf amino menurunkan kadar bioetanol yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae*. Kadar etanol tertinggi diperoleh pada proses SSF tanpa penambahan asam amino dengan kadar sebesar 5.44%. Penambahan asam glutamate memberikan penurunan yang paling besar yaitu sekitar 20%. Penambahan asam amino penyusun glutathion dapat menghambat pertumbuhan sel *S. cerevisiae* ketika proses fermentasi [17].



Gambar 1. Kadar xylosa setelah proses SSF tandan kosong sawit



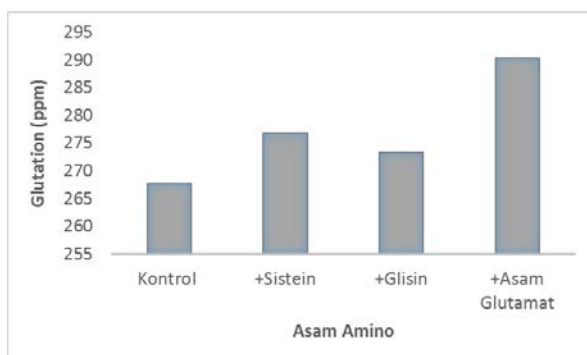
Gambar 2. Pengaruh variasi asam amino terhadap kadar bioetanol

Pengaruh variasi konsentrasi pelarut dan variasi asam amino terhadap kadar glutathion

Pada penelitian ini dilakukan penambahan asam amino pada medium fermentasi berupa variasi asam amino seperti sistein, glisin, dan asam glutamat. Menurut Wang *et al.* [11] penambahan medium seperti asam amino sistein akan menghasilkan glutathion yang lebih banyak jika dibandingkan tanpa penambahan asam amino. Ekstraksi glutathion dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Pelarut metanol menghasilkan kadar glutathion tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi lain [18]. Analisis kadar glutathion menggunakan metode aloksan memanfaatkan reaksi yang terjadi antara aloksan dan glutathion yang terkandung dalam filtrat. Glutathion yang merupakan asam amino yang memiliki gugus tiol akan bereaksi dengan aloksan sehingga dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 305 nm [13].

Gambar 3 menunjukkan konsentrasi glutathion yang paling tinggi dengan konsentrasi metanol. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh pengaruh sifat kepolaran antara glutathion yang bersifat semi polar jika ditinjau dari struktur glutathion. Karena sifat

kepolaran metanol yang lebih rendah dibandingkan sifat kepolaran air, maka interaksi yang terjadi antara pelarut metanol lebih tinggi dengan glutathion. Konsentrasi glutathion tertinggi diperoleh pada penambahan asam glutamate yaitu sebesar 290,26 ppm. Penambahan asam amino terbukti dapat meningkatkan kandungan antioksidan glutathion, namun menurunkan kadar etanol yang dihasilkan, sejalan dengan penelitian Ling et al. [17].



Gambar 3. Pengaruh variasi asam amino terhadap kadar antioksidan

KESIMPULAN

Penambahan asam amino mempunyai pengaruh terhadap kadar bioetanol dan antioksidan yang dihasilkan. Penggunaan asam amino meningkatkan kadar glutathion tetapi menurunkan kadar etanol; Kadar bioetanol tertinggi dihasilkan tanpa penambahan asam amino yaitu sebesar 54.38 g/L, sedangkan kadar bioetanol terendah dihasilkan dengan penambahan asam glutamat sebesar 43.80 g/L. Kadar glutathion yang dihasilkan dengan penambahan asam glutamate setelah ekstraksi dengan metanol sebesar 290.26 ppm.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Amalina Nur Husnina yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini. Kegiatan penelitian ini didanai oleh kegiatan Unggulan LIPI tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] B. Purwantana and B. Prastowo, "Gratifikasi Tandan Kosong Kelapa Sawit: Konversi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit untuk Sumber Energi Terbarukan," in *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Perkebunan*, 2011.
- [2] B. Subiyanto, B. Subiyakto, Sudiyono, M. Gopar, and S. S. Munawar, "Utilization of Palm Oil Bunches from Oil Palm Processing Industry for Particle Board with Phenol Formadehida Adhesives (in Bahasa)," *J. Trop. Wood Sci. Technol.*, vol. 2, no. 2, 2004.
- [3] M. Muryanto, Y. Sudiyani, and H. Abimanyu, "Optimization of NaOH Alkali Pretreatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch for Bioethanol," *InaJAC*, vol. 18, no. 1, pp. 27–35, 2016.
- [4] P. Binod *et al.*, "High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production," *Fuel*, Aug. 2011.
- [5] E. Triwahyuni, Muryanto, Y. Sudiyani, and H. Abimanyu, "The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunches," in *Energy Procedia*, 2015, vol. 68.
- [6] X. Wu, L. Tang, Y. Du, and Z. Xu, "Improving glutathione extraction from crude yeast extracts by optimizing

- aqueous two-phase system composition and operation conditions,” *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 6, pp. 1829–1835, 2010.
- [7] E. Lorenz, M. Schmach, U. Stahl, and M. Senz, “Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biotechnol.*, vol. 216, pp. 131–139, 2015.
- [8] Y. S. Suzuki T, Yokoyama A, Tsuji T, Ikeshima E, Nakashima K, Ikushima S, Kobayashi C, “Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 112, no. 2, pp. 107–113, 2011.
- [9] K. Sasaki, K. Y. Hara, H. Kawaguchi, T. Sazuka, C. Ogino, and A. Kondo, “Nanofiltration concentration of extracellular glutathione produced by engineered *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 121, no. 1, pp. 96–100, Jan. 2016.
- [10] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, Y.-X. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 2, pp. 1011–1014, Jan. 2009.
- [11] Z. Wang, T. Tan, and J. Song, “Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production,” *Process Biochem.*, vol. 42, no. 1, pp. 108–111, 2007.
- [12] J.-Y. Cha, J.-C. Park, B.-S. Jeon, Y.-C. Lee, and Y.-S. Cho, “Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8,” *J. Microbiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 51–55, Mar. 2004.
- [13] S. Wen, T. Zhang, and T. Tan, “Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Process Biochem.*, vol. 41, no. 12, pp. 2424–2428, 2006.
- [14] Muryanto, E. Triwahyuni, H. Hendarsyah, and H. Abimanyu, “Reuse black liquor of alkali pretreatment in bioethanol production,” in *Energy Procedia*, 2015, vol. 68.
- [15] W.-H. Chen, T.-S. Lin, G.-L. Guo, and W.-S. Huang, “Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*,” *Energy Procedia*, vol. 14, pp. 1261–1266, 2012.
- [16] F. A. Gonçalves, H. A. Ruiz, E. Silvino dos Santos, J. A. Teixeira, and G. R. de Macedo, “Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept,” *Renew. Energy*, vol. 94, pp. 353–365, 2016.
- [17] G. Liang, X. Liao, G. Du, and J. Chen, “Elevated glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 5, pp. 1432–1440, Nov. 2008.
- [18] M. Muryanto, Alvin, M. Nurdin, U. Hanifah, and Y. Sudiyani, “Extraction of glutathione from EFB fermentation waste using methanol with sonication process,” *AIP Conf. Proc.*, vol. 1904, no. 1, p. 20011, Nov. 2017.