

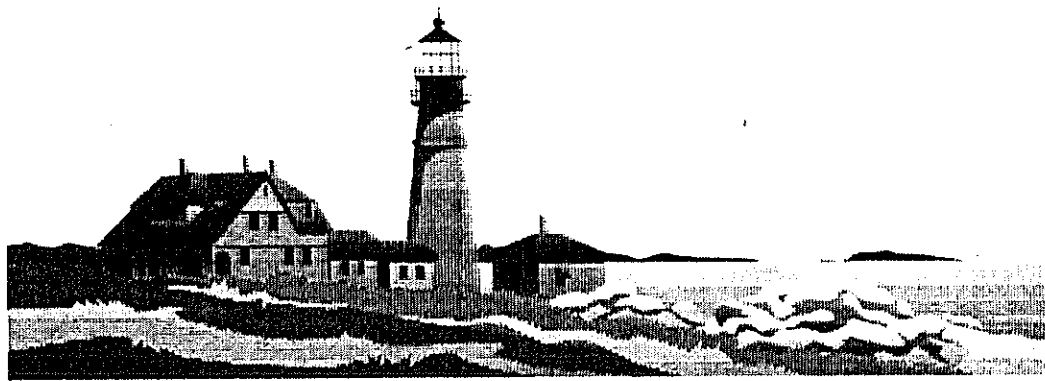


*"Dan Dia-lah yang menjadikan bintang-bintang bagimu. Agar kamu menjadikannya petunjuk dalam kegelapan di darat dan di laut. Sesungguhnya Kami (Allah) telah menjelaskan tanda-tanda kebesaran (Kami) kepada orang-orang yang mengetahui."*

*(QS. Al-An'am : 97)*

*"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang yang berakal."*

*(QS. Ali Imran : 190)*



*Kenangan buat Bapak (Alm.)  
Untuk Ibu, Kakak, Adik, Bulik Mini dan  
Keluarga, Mbak Sri, Mbak Yuni, Yennisari  
dan Adikku yang sangat kusayangi:  
Dina Prahastiti Sari*

# RANCANG BANGUN PROSES FERMENTASI ASETON - BUTANOL - ETANOL DARI HIDROLISAT TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT ( *Elaeis guineensis* JACQ )

Oleh  
**SUPRASONO**  
F 27. 1139



1994  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
B O G O R

Suprasono. F 27. 1139. **Rancang Bangun Proses Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol Dari Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* JACQ).** Di bawah Bimbingan E. Gumbira-Sa'id dan Liesbetini Hartoto.

## RINGKASAN

Hidrolisis tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara enzimatik menghasilkan gula sederhana yang dapat difermentasi oleh *Clostridium acetobutylicum* P 262 menjadi aseton, butanol dan etanol. Hidrolisis dengan perlakuan delignifikasi TKKS dengan NaOH 1 N, diteruskan dengan otoklaf 121°C selama 15 menit memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan tanpa perlakuan otoklaf. Hidrolisis tanpa perlakuan otoklaf menghasilkan kadar gula tertinggi ( 2.59 g/l gula pereduksi) dengan tingkat sakarifikasi sebesar 17.60 persen. Hidrolisis dengan perlakuan otoklaf menghasilkan kadar gula 3.50 g/l dengan tingkat sakarifikasi sebesar 23.80 persen.

Hidrolisis TKKS dengan penambahan dosis enzim dua kali lipat (Enzim selulase 2 persen dan selobiase 0.4 persen) mengakibatkan kadar gula pereduksi mengalami peningkatan menjadi 7.50 g/l gula pereduksi. Tingkat sakarifikasi yang berhasil dicapai adalah 50.97 persen.

Penggunaan hidrolisat TKKS untuk fermentasi ABE menggunakan *C. acetobutylicum* P 262 memberikan total pelarut tertinggi (14.23 g/l) dengan menggunakan kadar gula pereduksi awal sebesar 60 g/l. Berdasarkan atas gula yang dikonsumsi, hasil (*Yield*) yang dicapai adalah 0.272. Laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu_{maks}$ ) pada fermentasi dengan kadar gula awal 60 g/l adalah 0.281 jam<sup>-1</sup>. Total asam yang dihasilkan adalah 13.73 g/l. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah 0.263 g pelarut/g biomassa.jam.

Fermentasi dengan menggunakan kadar gula awal 44 g/l memberikan total pelarut sebanyak 5.79 g/l atau *Yield* = 0.165 didasarkan atas gula yang dikonsumsi. Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) pada fermentasi dengan kadar gula 44

g/l adalah  $0.041 \text{ jam}^{-1}$ , dengan total asam yang dihasilkan adalah  $11.92 \text{ g/l}$ . Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah sebesar  $0.132 \text{ g pelarut/g biomassa.jam}$ .

Fermentasi aseton-butanol-etanol dengan menggunakan kadar gula awal  $80 \text{ g/l}$  memberikan total pelarut sebanyak  $9.40 \text{ g/l}$  atau *Yield* sebesar  $0.188$  didasarkan atas gula yang dikonsumsi. Laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu_{maks}$ ) adalah  $0.297 \text{ jam}^{-1}$ . Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah  $0.305 \text{ g pelarut/g biomassa.jam}$ .



**RANCANG BANGUN PROSES  
FERMENTASI ASETON - BUTANOL - ETANOL DARI  
HIDROLISAT TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT  
(*Elaeis guineensis* JACQ)**

Oleh  
**SUPRASONO**

**F 27.1139**

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN  
pada Jurusan TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor**

**1994**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
B O G O R**

INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

RANCANG BANGUN PROSES  
FERMENTASI ASETON - BUTANOL - ETANOL DARI  
HIDROLISAT TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT  
(*Elaeis guineensis* JACQ)

SKRIPSI

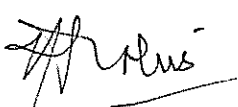
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN  
Pada Jurusan TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

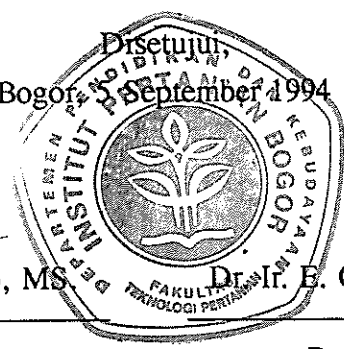
Oleh  
SUPRASONO  
F 27.1139

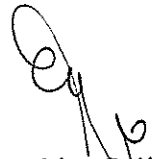
Dilahirkan pada tanggal 31 Oktober 1972  
di KEBUMEN

Tanggal Lulus : 29 Agustus 1994

Disetujui,  
Bogor, 5 September 1994

  
Ir. Liesbetini Hartoto, MS



  
Dr. Ir. E. Gumbira-Sa'id, MA Dev.

Dosen Pembimbing II

Dosen Pembimbing I



## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, skripsi sebagai hasil laporan penelitian ini dapat penulis selesaikan. Penelitian ini dilakukan sejak bulan Maret hingga bulan Juli 1994. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada:

1. Ibu, adik dan kakak sekeluarga yang dengan ikhlas dan kasih selalu mengiringi dan menyertai dengan doa,
2. Dr. Ir. E. Gumbira-Sa'id, MADev. dan Ir. Liesbetini H., MS yang telah membimbing, mendorong dan menyokong selama penulis melakukan penelitian,
3. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, MSc. atas saran untuk perbaikan skripsi,
4. Dr. Ir. Dedi Fardiaz, MSc. dari Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi yang telah menyumbang pinjaman perangkat bioreaktor satu liter,
5. Dewan Riset Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek Riset Unggulan Terpadu (DRN-LIPI-BAPPENAS) melalui "Biokonversi limbah padat industri minyak kelapa sawit untuk produksi aseton butanol dan etanol,
6. Lalu Sukarno, BSc. beserta seluruh Laboran dan teknisi di laboratorium Bioindustri, laboratorium Teknologi Kimia dan laboratorium DIT Jurusan Teknologi Industri Pertanian atas bantuan dan kerja sama yang penuh pengertian,
7. Yennisari, Agus Ratmono, Agus Purwanto, Asep Priadi, Rochmat Pudjiono, Masitowati serta rekan-rekan lainnya yang telah banyak membantu kelancaran penelitian ini.

Akhirnya *tiada gading yang tidak retak*, penelitian ini sangat sederhana untuk hasil yang sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran diterima dengan tangan terbuka. Semoga hasil penelitian ini berguna bagi yang membacanya.

Bogor, Agustus 1994

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT	5
B. SIFAT FISIK DAN KIMIA BAHAN SELULOSA	6
1. Selulosa	6
2. Hemiselulosa	8
3. Lignin	8
C. DELIGNIFIKASI ALKALI DAN HIDROLISIS ENZIMATIS TKKS	9
1. Delignifikasi Alkali	9
2. Hidrolisis Enzimatis TKKS	11
D. FERMENTASI ASETON BUTANOL ETANOL	13
1. Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	13
2. Fermentasi Curah ABE	15
3. Sifat Aseton, Butanol dan Etanol	18
4. Sifat Racun Produk Fermentasi ABE	19
III. BAHAN DAN METODA	20
A. BAHAN DAN ALAT	20
1. Bahan	20
2. Alat	21





B. WAKTU DAN TEMPAT	21
C. TATA LAKSANA	21
D. METODA PENELITIAN	22
1. Penyiapan Bahan dan Analisis Komposisi Kimiawi Tandan Pengecilan Tandan Kosong Kelapa Sawit	22
2. Delignifikasi Tandan Kosong Kelapa Sawit	22
3. Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit	23
E. FERMENTASI ASETON-BUTANOL-ETANOL	26
1. Pengeaktifan Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> P 262	26
2. Penyiapan Medium Propagasi	27
3. Fermentasi Curah Produksi ABE	30
4. Analisis Hasil Fermentasi	33
5. Analisis Parameter Kinetika Fermentasi	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
A. HIDROLISIS ENZIMATIK TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT	36
1. Analisis Proksimat Tandan Kosong Kelapa Sawit	36
2. Delignifikasi TKKS Menggunakan Basa Kuat	37
3. Hidrolisis Enzimatis Tandan Kosong Kelapa Sawit	39
B. FERMENTASI ASETON-BUTANOL-ETANOL	41
1. Fermentasi Dengan Kadar Gula Awal 44 g/l	44
2. Fermentasi Dengan Kadar Gula Awal 60 g/l	49
3. Fermentasi Dengan Kadar Gula Awal 80 g/l	53
V. KESIMPULAN DAN SARAN	58
A. KESIMPULAN	58
B. SARAN	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Rumus bangun selulosa	7
Gambar 2. Rantai selulosa yang tersusun dari unit glukosa	7
Gambar 3. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase	12
Gambar 4. Mekanisme hidrolisis enzimatis selulosa	13
Gambar 5. Jalur biokimiawi pembentukan aseton-butanol-etanol oleh <i>Clostridium acetobutylicum</i>	17
Gambar 6. Skema bioreaktor 20 liter untuk hidrolisis TKKS secara enzimatis	24
Gambar 7. Diagram alir produksi gula dari proses hidrolisis TKKS	25
Gambar 7. Diagram alir proses aktivasi <i>C. acetobutylicum</i> P 262	27
Gambar 8. Diagram alir proses propagasi <i>C. acetobutylicum</i> P 262	29
Gambar 9. Bioreaktor volume satu liter yang digunakan untuk fermentasi ABE dengan substrat hidrolisat TKKS murni	31
Gambar 10. Diagram alir proses penyiapan medium fermentasi dari hidrolisat TKKS murni	32
Gambar 11. Bioreaktor baja tahan karat volume 20 liter yang digunakan untuk hidrolisis TKKS	39
Gambar 12. Grafik peningkatan kadar gula pereduksi pada sakarifikasi TKKS dengan perlakuan dan konsentrasi enzim berbeda	41
Gambar 13. Grafik hubungan nilai pH dengan jumlah asam selama fermentasi ABE dengan kadar gula awal 44 g/l	45
Gambar 14. Ilustrasi proses fermentasi aseton-butanol-etanol pada bioreaktor satu liter dengan substrat hidrolisat TKKS	46
Gambar 15. Grafik hubungan antara jumlah gula yang digunakan dengan pelarut dan biomassa yang dihasilkan pada fermentasi ABE dengan kadar gula awal 44 g/l	47
Gambar 16. Grafik perubahan parameter kinetika fermentasi ABE pada kadar gula 44 g/l	48



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian	65
Lampiran 2. Prosedur analisis gula pereduksi	67
Lampiran 3. Prosedur analisis lignin, selulosa dan hemiselulosa	69
Lampiran 4. Hasil perhitungan kadar gula hidrolisat TKKS dengan bioreaktor hidrolisis volume 20 liter	74
Lampiran 5. Rekapitulasi hasil fermentasi aseton-butanol-etanol dari hidrolisat tandan kosong kelapa kawit	76
Lampiran 6. Data parameter kinetika fermentasi ABE pada substrat hidrolisat TKKS	78

Halaman ini merupakan bagian dari karya tulis yang dihasilkan oleh mahasiswa dan dosen IPB University. Karya tulis ini merupakan bagian dari karya tulis yang dihasilkan oleh mahasiswa dan dosen IPB University. Karya tulis ini merupakan bagian dari karya tulis yang dihasilkan oleh mahasiswa dan dosen IPB University.





pemanfaatan tandan kosong kelapa sawit yang memberikan harapan adalah untuk produksi alkohol furfural untuk pakan ternak.

Bahan berlignoselulosa merupakan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat fermentasi dalam biokonversi menghasilkan senyawaan yang berguna dan bernilai ekonomi tinggi. Diantara produk-produk biokonversi dari bahan berlignoselulosa yang mempunyai nilai tinggi adalah pelarut organik, asam-asam amino dan antibiotika.

Berdasarkan data dari *Oil World Annual* sampai dengan tahun 1991 Indonesia telah memperoleh 12.3 persen pangsa ekspor minyak sawit dunia dengan volume ekspor mencapai lebih dari satu juta ton. Pada Tabel 1 disajikan luas areal dan produksi kelapa sawit di Indonesia.

Tabel 1. Luas areal perkebunan dan produksi minyak kelapa sawit Indonesia <sup>a)</sup>

Tahun	Luas areal (ha)	Produksi (ton)
1988	862 859	1 733 335
1989	973 528	1 964 454
1990	1 126 677	2 412 612
1991 <sup>b)</sup>	1 310 996	2 657 600
1992 <sup>c)</sup>	1 460 765	3 162 228

<sup>a)</sup> Direktorat Jenderal Perkebunan (1992).

<sup>b)</sup> Data sementara (Gumbira-Sa'id, 1994c)

<sup>c)</sup> Data estimasi

Secara teknologi biokonversi limbah lignoselulosa yang dapat dilakukan adalah pembuatan bahan pelarut organik seperti aseton-butanol-etanol (ABE).

Crueger dan Crueger (1984) menyatakan bahwa aseton, butanol dan isopropanol dapat dihasilkan dari fermentasi pati, tetes tebu, sukrosa, hidrolisat kayu (selulosa) dan pentosa. Menurut Azemi *et al.* (1994) tandan kosong kelapa sawit yang telah dihidrolisa dapat digunakan sebagai substrat fermentasi untuk menghasilkan produk bernilai ekonomi tinggi, misalnya asam-asam amino dan silitol.

Pemanfaatan TKKS untuk produksi aseton-butanol etanol (ABE) diharapkan dapat meningkatkan nilai tambah limbah tandan kosong kelapa sawit. Aseton-butanol-etanol (ABE) adalah bahan kimia yang banyak digunakan dalam industri sebagai pelarut, pembuat plastik, resin dan pelapis. Selain itu penggunaan ABE yang memiliki harapan cerah adalah sebagai bahan alternatif pengganti minyak bumi. Pembuatan aseton-butanol-etanol pada saat ini menggunakan sistem penyulingan dari derivat minyak bumi melalui proses kimiawi. Peningkatan harga derivat minyak bumi mengakibatkan alternatif pembuatan ABE dari tandan kosong kelapa sawit melalui proses biokonversi semakin penting dan memiliki harapan cerah.

Pada proses fermentasi aseton-butanol-etanol, butanol dihasilkan sebagai pelarut campuran bersama aseton dan etanol, dengan butanol sebagai fraksi yang terbesar. Fermentasi dilakukan secara anaerobik dengan menggunakan *Clostridium acetobutylicum*. Fermentasi aseton-butanol-etanol berkembang pesat pada masa perang dunia I dimana produk yang dihasilkan digunakan sebagai bahan dasar pembuat peledak dan bahan sintesis produk lain (Gumbira-Sa'id, 1994). Industri ABE berkembang pesat di Jepang dan Amerika (Walton dan Martin, 1979).

Produk fermentasi yang paling banyak digunakan sebagai bahan dasar penunjang industri adalah pelarut organik. Pada tahun 1991 lebih dari 79 000 ton etanol dibutuhkan oleh industri-industri di Indonesia (CIC, 1992).



Butanol merupakan pelarut organik selain etanol yang dapat diproduksi secara fermentasi. Pada saat ini, butanol diproduksi secara kimiawi. Kebutuhan butanol Indonesia pada tahun 1991 mencapai 17 000 ton (BPS, 1991). Pada awalnya butanol yang diproduksi secara fermentasi mempunyai peranan yang sangat penting. Biaya pemisahan produk, operasionalisasi pabrik dan mahalanya biaya bahan baku mengakibatkan industri fermentasi aseton-butanol-etanol terdesak oleh industri-industri kimiawi ABE yang berbahan baku minyak bumi dengan proses yang berjalan dengan sangat efisien. Menipisnya cadangan minyak bumi diharapkan dapat menjadikan awal kebangkitan industri fermentasi aseton-butanol-etanol yang pernah berjaya pada tahun-tahun sebelumnya.

## B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mempelajari teknik dan rancangan proses hidrolisis tandan kosong kelapa sawit dengan menggunakan bioreaktor volume 20 liter,
2. Mempelajari pengaruh kadar gula pada medium terhadap rendemen aseton-butanol-etanol yang dihasilkan dalam proses fermentasi secara anaerobik menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* P 262.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

Tandan kosong kelapa sawit merupakan hasil samping dari proses pengolahan kelapa sawit. Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* JACQ) adalah tanaman berkeping tunggal dalam famili palmae, sub kelas monocotyledone, kelas Angiospermae, subdivisi Pteridophyta dan Divisi Tracheophyta (Hartley, 1967; Lubis, 1992).

Tanaman kelapa sawit dapat mulai dipanen pada umur 3.5 sampai 4 tahun. Menurut Naibaho (1983) tandan sawit dianggap matang bila jumlah buah yang berondol telah mencapai dua berondolan per kilogram tandan. Selanjutnya dinyatakan setiap pohon dapat menghasilkan enam tandan buah dengan bobot berkisar antara 5 sampai 30 kilogram setiap tandan (Aritonang, 1986).

Menurut Hartley (1967) dan Azemi *et al.* (1994) tandan buah segar sawit mengandung 70 persen buah dan 30 persen diantaranya adalah tandan kosong. Komposisi tandan kosong kelapa sawit disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi kimia TKKS <sup>a)</sup>.

Komponen	Persentase (dasar kering)
Hemiselulosa (pentosan)	24.0
Selulosa	40.0
Lignin	21.0
Abu dan bahan lain	15.0

<sup>a)</sup> Azemi *et al.* (1994).

## B. SIFAT FISIK DAN KIMIA BAHAN SELULOSA

Bahan lignoselulosik terdiri atas tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan berikatan dengan senyawa lain, yaitu hemiselulosa dan lignin. Komposisi limbah lignoselulosa secara umum disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Bahan Berlignoselulosa

Komponen	Persentase <sup>a)</sup> (dasar kering)	Persentase <sup>b)</sup> (dasar kering)
Selulosa	25 - 40	34.3
Hemiselulsa	25 - 50	39.6
Lignin	10 - 30	19.9
Protein		4.6

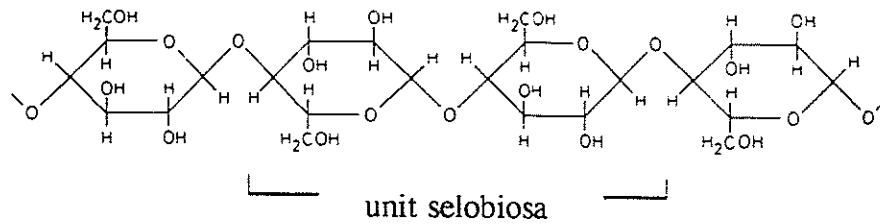
<sup>a)</sup> Cowling dan Kirk *di dalam* Gaden *et al.* (1976)

<sup>b)</sup> Tsao *et al.* (1978)

### 1. Selulosa

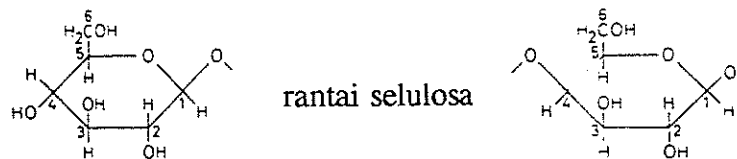
Selulosa adalah polimer dari  $\beta$  - glukosa dengan tingkat polimerisasi 200 sampai 2000 kDa dan mempunyai struktur kristal (Parisi, 1989). Menurut Janes (1969) derajat polimerisasinya antara 14 - 14.000 dengan rumus bangun seperti yang disajikan pada Gambar 1.

Molekul-molekul selulosa berikatan secara paralel dengan jembatan hidrogen membentuk mikrofibril. Gabungan beberapa mikrofibril disebut makrofibril (Haigler *di dalam* Nevel dan Zeronian, 1985). Pada Gambar 2 dapat dilihat rantai selulosa tersusun atas satuan-satuan anhidroglukosa yang saling berikatan melalui atom  $C_1$  dan  $C_4$  (Judoamidjojo, *et al.* (1989).



Gambar 1. Rumus bangun selulosa (Fengel dan Wegener, 1989).

Struktur mikrofibril dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu bagian kristal yang sangat kuat dan tidak tembus air dan bagian amorf yang bersifat lunak. Bagian kristal selulosa banyak mengandung jembatan hidrogen antar molekul dan bagian tersebut jumlahnya dominan, yaitu 85 persen dari selulosa. Bagian amorf hanya sedikit atau sama sekali tidak mengandung jembatan hidrogen dan jumlahnya hanya 15 persen dari selulosa. Kokohnya struktur kristal dari selulosa mengakibatkan selulosa sukar dihidrolisa dan menjadi hambatan dalam hidrolisis selulosa (Tsao *et al.*, 1988).



Gambar 2. Rantai selulosa yang tersusun dari unit glukosa. (Fengel dan Wegener, 1989).



## 2. Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai bobot molekul lebih kecil dari selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis dan mempunyai kontak permukaan antar molekul lebih luas dibandingkan dengan selulosa (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

Menurut Cowling *di dalam* Gaden *et al.* (1972), hemiselulosa adalah heteropolimer bercabang dari glukosa, xilosa, galaktosa, manosa, arabinosa dan asam-asam urat dari glukosa dan galaktosa yang saling berikatan secara 1-3, 1-4, dan 1-6 glikosida. Derajat polimerisasi hemiselulosa dapat mencapai 200.

Hidrolisis hemiselulosa dengan asam kuat encer akan menghasilkan gula pentosa dan heksosa (sebagian besar gula pentosa yang terdiri dari xilosa dan arabinosa). Hidrolisis lebih lanjut akan menghasilkan furfural dan produk terdekomposisi lainnya.

## 3. Lignin

Lignin adalah polimer aromatik kompleks yang terbentuk melalui struktur tiga dimensi sinamil alkohol (derivat dari fenil propana) dengan bobot molekul 11 000 (Haigler *di dalam* Nevel dan Zeronian, 1985). Unit sinamil alkohol tersebut diikat dengan ikatan C-O-C dan C-C (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Menurut Tsao *et al.* (1978), lignin didefinisikan sebagai makromolekul polifenol.

Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan oksidator lainnya. Dalam keadaan biasa, larutan sulfit dapat melarutkan lignin. Pada suhu tinggi,

lignin dapat mengalami perubahan struktur sehingga membentuk asam format, metanol, asam asetat, aseton dan vanilin (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

### C. DELIGNIFIKASI ALKALI DAN HIDROLISIS ENZIMATIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

#### 1. Delignifikasi Alkali

Perlakuan pendahuluan dengan alkali adalah salah satu alternatif metoda delignifikasi bahan berlignoselulosa yang telah lama digunakan. Selain dapat melarutkan lignin, perlakuan alkali dapat juga melarutkan hemiselulosa (Murdiyatmo, 1985 *di dalam* Darnoko, 1992). Selain itu larutan alkali juga dapat menjadi agen pengembang (*sweeling agent*) molekul-molekul selulosa, sehingga akan meningkatkan daya larut selulosa dan daya kerja enzim.

Penggunaan larutan alkali yang dapat didaur ulang akan menekan biaya operasi. Perlakuan pendahuluan delignifikasi dengan metoda alkali terhadap substrat berlignoselulosa adalah pilihan yang cukup layak untuk proses hidrolisis enzimatis skala komersial (Gharpuray *et al.*, 1982).

Kompleksnya struktur kimia tandan kosong kelapa sawit menyebabkan TKKS sulit untuk diubah langsung menjadi glukosa dan gula-gula sederhana lain. Perlakuan pendahuluan TKKS sebelum dihidrolisa dilakukan untuk mempermudah kerja enzim selulase. Pengecilan ukuran dan delignifikasi TKKS yang akan dihidrolisa dapat mempertinggi efisiensi dan produktivitas kerja enzim, sehingga glukosa yang dihasilkan menjadi tinggi. Perendaman TKKS dalam asam kuat dan basa kuat encer dapat menghilangkan serta memecahkan struktur berkrystal dari lignoselulosa sehingga kerja enzim menjadi lebih baik.





## 2. Hidrolisis Enzimatis Tandan Kosong Kelapa Sawit

Enzim adalah agen biologik yang mempunyai kerja sangat spesifik, selektif dan produktif pada substrat tertentu. Spesifitas kerja enzim ditunjukkan dari kemampuannya untuk menjalankan reaksi biologik yang spesifik, kerja pada suhu dan tekanan yang rendah, hal tersebut tidak dapat dilakukan dengan proses reaksi kimia biasa.

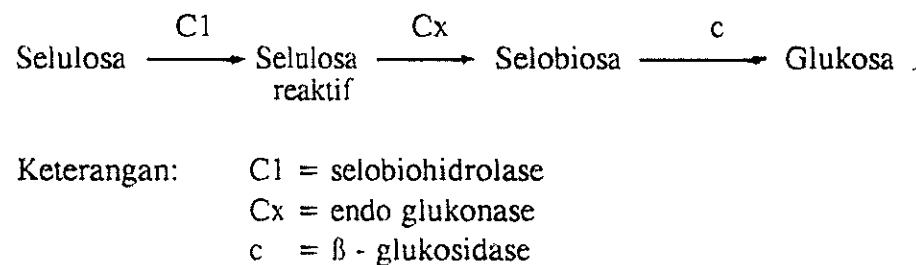
Kemampuan kerja enzim yang spesifik dalam selang yang sempit terkadang tidak dapat berjalan sebagaimana mestinya. Hal ini disebabkan dalam substrat tempat enzim tersebut bekerja terdapat zat atau bagian substrat yang menghalangi enzim untuk mereaksikan reaksi yang dimaksud. Enzim selulase (pemecah selulosa) merupakan suatu kompleks enzim yang bekerja bertahap atau bersama-sama mengkatalisa selulosa menjadi glukosa (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

Parisi (1989) menyatakan bahwa enzim selulase adalah campuran dari *endo-β-1.4* glukon glukanohidrolase (E.C. 3.2.1.4), *exo-β-1.4* glukanselobiohidrolase (E.C.3.2.1.91) dan  $\beta$ -glukosidase (E.C. 3.2.1.21). Sistem enzim yang kompleks diatas dihasilkan oleh sejumlah kapang mesofilik dan termofilik, bakteri mesofilik dan termofilik serta beberapa jenis *Actinomycetes*.

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1989) enzim *endo-β-1.4* glukon glukanohidrolase (E.C. 3.2.1.4) menghidrolisa ikatan  $\beta-1.4$  secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa. Enzim *exo-β-1.4* glukanselobiohidrolase (E.C. 3.2.1.91) menyerang selulosa nonpereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim  $\beta-1.4$ -D glukon glukohidrolase (E.C. 3.2.1.74) menyerang rantai ujung selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa.

Okazaki dan Moo-Young (1978) menyatakan bahwa produk hidrolisis selulosa terutama glukosa dan selobiosa menghambat kerja hidrolitik enzim selulase. Penghambatan produk diidentifikasi sebagai salah satu faktor yang berpengaruh pada kinetika enzimatik selulosa. Hidrolisis selulosa dengan menggunakan selulase sangat dipengaruhi oleh pH, suhu, dan adanya produk akhir yang bersifat menghambat.

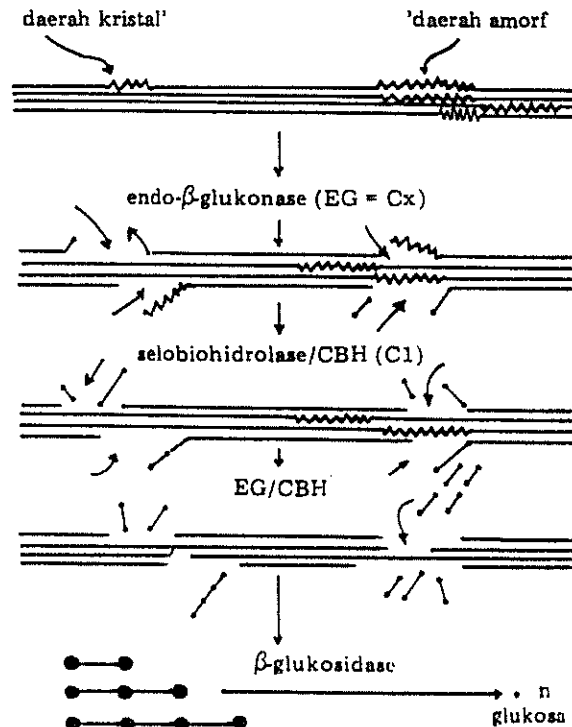
Mekanisme hidrolisis selulosa secara enzimatik menurut Reese (1950) di dalam Judoamidjojo *et al.* (1989) disajikan pada Gambar 3. Mekanisme hidrolisis selulase secara lengkap disampaikan oleh Montenecourt dan Eveleigh (1979) di dalam Judoamidjojo *et al.* (1989) disajikan pada Gambar 4.



Gambar 3. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Reese, 1950).

Dalam rangka memperoleh hidrolisat tandan kosong kelapa sawit yang kaya gula, maka proses hidrolisis dilakukan melalui beberapa tahap. Berdasarkan hasil penelitian Fajarrini (1991) dan Mikosari (1991) tahap-tahap pra hidrolisis tandan kosong kelapa sawit yang telah pernah dilakukan antara lain adalah pengecilan ukuran dan pencucian dengan air panas untuk menghilangkan tanin dan lemak. Penghilangan lignin dilakukan dengan perendaman TKKS dalam asam sulfat encer, sedangkan penghilangan hemiselulosa dilakukan dengan perendaman larutan besi (III) selama sembilan jam. Hidrolisis

dilakukan dengan menggunakan enzim selulase 0.9% (v/b) dan enzim selobiose 0.2% (v/b) di dalam bufer sitrat pH 4.8 dengan hasil gula pereduksi 500 ppm dan tingkat konversi lebih dari 10 persen.



Gambar 4. Mekanisme hidrolisis enzimatik selulosa (Montenecourt dan Eveleigh (1979) di dalam Judoamidjojo *et al.* (1989).

## D. FERMENTASI ASETON - BUTANOL - ETANOL

### 1. Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Fardiaz (1982) menyatakan bahwa *Clostridium acetobutylicum* termasuk bakteri pembentuk spora, digolongkan dalam famili Bacillaceae. Lebih lanjut dinyatakan bahwa bakteri *Clostridium acetobutylicum* bersifat anaerobik



yang digolongkan dalam kelompok butirrat yang mampu memfermentasikan asam butirrat menjadi  $\text{CO}_2$  dan gas  $\text{H}_2$ .

Menurut Pelzcar dan Chan (1986), bakteri *C. acetobutylicum* termasuk kelas endospora, famili bacillaceae, genera *Clostridium* dengan bentuk batang. Bakteri tersebut termasuk gram negatif dan bersifat anaerobik obligat, heterotrof dan termofilik.

Menurut Wang *et al.*, (1978) berdasarkan pola pertumbuhannya *C. acetobutylicum* termasuk mikroorganisme yang memiliki pola pertumbuhan campuran. Pada sebagian pertumbuhan, bakteri tersebut menghasilkan pelarut dan pada fase kematiannya juga menghasilkan pelarut. Dengan demikian tingginya jumlah biomassa yang dihasilkan tidak menjamin tingginya jumlah pelarut yang dihasilkan.

Kultur bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang menghasilkan butanol dan aseton pertama kali diisolasi oleh Weizman pada tahun 1935 dengan menggunakan pati dan limbah buangan sebagai sumber karbon. Selanjutnya kultur yang ada ditumbuhkan pada medium tetes tebu. Beberapa laporan yang dipublikasikan oleh McCuthen dan Hickey (1954) mencatat bahwa produktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan pelarut mencapai 18-20 g pelarut/l. Beberapa sumber habitat untuk isolasi bakteri *C. acetobutylicum* adalah dari tanah atau pasir, akar tanaman leguminosa, kentang dan tanaman penghasil pangan (biji) lainnya (Calam, 1983).

Menurut Thomson (1991) *C. acetobutylicum* merupakan katalis bioindustri yang sangat penting karena kemampuannya untuk mengkonversi substrat karbon menjadi pelarut berupa aseton, butanol dan etanol, asam asetat dan butirrat serta gas  $\text{H}_2$  dan  $\text{CO}_2$ . Kemampuan menghasilkan aseton, butanol dan etanol sangat tergantung dari jenis bakteri dan sumber karbon yang digunakan.

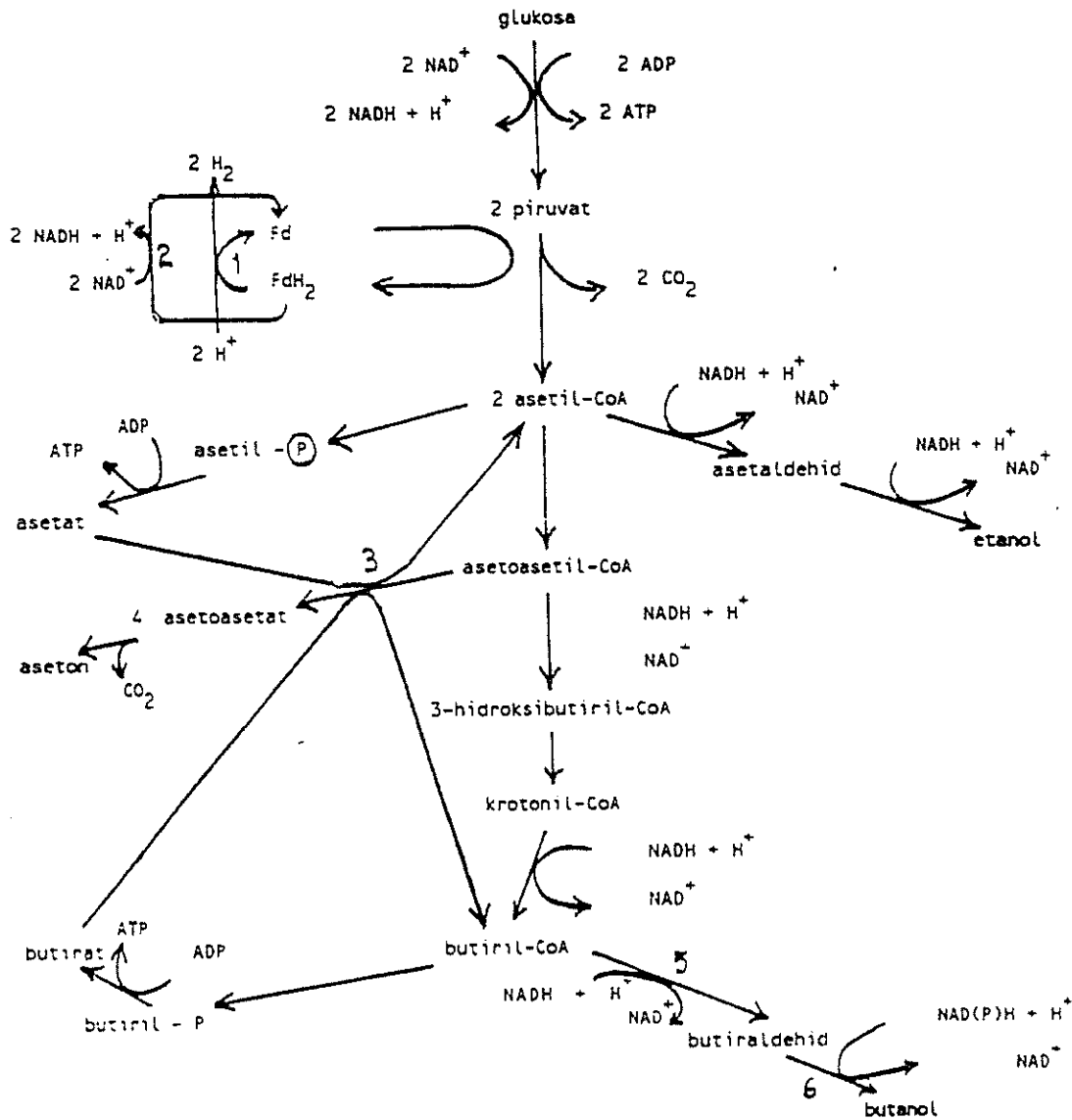
## 2. Fermentasi Curah ABE

Hampir keseluruhan proses fermentasi yang telah diterapkan dalam skala industri adalah proses curah (batch). Proses curah mempunyai produktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan proses sinambung, namun alasan sulitnya menerapkan proses sinambung, jaminan keberhasilan yang lebih tinggi pada proses curah dan kemudahan menjaga dari kontaminasi mengakibatkan proses curah lebih banyak diterapkan pada skala industri. Beberapa proses fermentasi curah yang banyak diterapkan adalah pembuatan bir, produksi protein sel tunggal, produksi monosodium glutamat dan proses fermentasi aseton butanol dan etanol.

Fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) dilakukan pertama kali pada tahun 1940 pada substrat tetes tebu dimana produk yang dihasilkan adalah 60 persen butanol, 30 persen aseton dan 5-10 persen etanol. Fermentasi dilakukan pada kultur curah dengan konsentrasi gula awal 45 - 50 g/l selama 40 - 45 jam (Higgins *et al.*, 1991; Crueger dan Crueger, 1984).

Fermentasi aseton-butanol-etanol dengan menggunakan *C. acetobutylicum* memerlukan kondisi anaerobik dan kisaran suhu mesofilik pada nilai pH awal substrat yang cukup rendah. Fond *et al.* (1986) bekerja pada suhu 35°C untuk fermentasi ABE pada kultur curah menggunakan *C. acetobutylicum*. Selama fermentasi, pH medium dipertahankan pada kisaran pH 4.8 dengan penambahan larutan NaOH 6 N secara sinambung. Yerushalmi dan Volesky (1985) melakukan fermentasi serupa pada kondisi 38°C. Peneliti lain Kanchanatawee dan Maddox (1989), bekerja secara curah dengan pH 5.0 - 5.5 melalui penambahan KOH 3M ke dalam medium secara otomatis.





Keterangan :

1. Hidrogenase
2. NADH: Fd dekarboksilase
3. CoA tranferase
4. Asetoasetat dekarboksilase
5. Butiraldehida dehidrogenase
6. Butanol dehidrogenase

Gambar 5. Jalur biokimiawi pembentukan aseton-butanol-etanol oleh *Clostridium acetobutylicum* (Gottschalk dan Gruppe 1992; Creuger dan Crueger, 1984).

### 3. Sifat Aseton, Butanol dan Etanol

Sardjoko (1991) menyatakan bahwa aseton, butanol dan etanol termasuk senyawa kimia hasil produksi yang diperoleh melalui proses fermentasi biologik. Fermentasi didasarkan atas penggunaan pati dibawah kondisi anaerobik pada suhu 34°C pada substrat yang digunakan. Selama proses fermentasi pH akan turun secara drastis dari 6 sampai 5 karena dihasilkan asam butirat dan asetat kemudian meningkat kembali karena asam yang ada dikonsumsi untuk diubah menjadi pelarut organik.

Tjokroadikoesoemo (1986), menyatakan aseton adalah bahan kimia berwujud cair, tidak berwarna dan berbau amis menusuk hidung dan bersifat sangat mudah menguap. Kegunaan aseton yang paling banyak adalah untuk pelarut organik. Pada tekanan 760 mm Hg aseton memiliki titik didih 54.48°C, sedangkan menurut Paturau (1989), aseton memiliki bobot jenis spesifik 0.791 pada (20°C/20°C) dan titik beku -9.4°C.

Butanol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ ) atau n-butyl alkohol adalah cairan yang tidak berwarna dengan bau anggur. Butanol memiliki sifat titik didih 117.42°C, bobot jenis spesifik 0.8109 (20°C/20°C) serta mempunyai kelarutan 7.5 persen pada suhu 30°C (Paturau, 1989).

Etanol adalah cairan yang tidak berwarna dengan bau khas dan dapat larut dalam air dan eter. Karakteristik etanol menurut Paturau (1969) dan Tjokroadikoesoemo (1986) adalah memiliki titik didih 78.32°C pada tekanan 766 mm Hg, bobot jenis spesifik 0.7937 (15°C/15°C).

#### 4. Sifat Racun Produk Fermentasi ABE

Sifat umum dari produk fermentasi adalah racun bagi penghasil produk itu sendiri. Peristiwa penghambatan oleh produk akhir merupakan hal yang umum dijumpai pada proses fermentasi. Butanol merupakan produk utama akhir fermentasi yang bersifat menghambat berlangsungnya fermentasi. Gutierrez dan Maddox (1992), menyatakan bahwa butanol dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50 persen pada konsentrasi 7 - 13 g/l. Penghambatan sempurna terjadi jika konsentrasi butanol melewati 12 - 16 g/l. Selain pertumbuhan sel yang terhambat menurut Linden *et al.*, (1991) konsentrasi produk akhir juga mempengaruhi proses transport unsur hara ke dalam sel dan aktivitas enzim ATP-ase pada sekeliling membran sel. Pada Tabel 4 disajikan penghambatan produk akhir pada proses fermentasi aseton butanol dan etanol.

Tabel 4. Konsentrasi produk akhir yang menghambat pertumbuhan *C. acetobutylicum* ATCC 824 <sup>a)</sup>

Produk	Penghambatan Terjadi Sampai 50 Persen	
	(g/l)	(M)
Asam butirat	6.0	0.07
Butanol	11.0	0.15
Asam Asetat	8.0	0.13
Etanol	51.0	1.10
Aseton	84.0	1.45

<sup>a)</sup> Linden (1991)



### III. BAHAN DAN METODA

#### A. BAHAN DAN ALAT

##### 1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan kimia untuk proses hidrolisis tandan kosong kelapa sawit dan bahan-bahan kimia untuk proses fermentasi sebagai sumber hara tambahan. Bahan-bahan kimia untuk proses hidrolisis tandan kosong kelapa sawit meliputi natrium hidroksida, natrium sitrat, arang aktif, kertas saring, asam sitrat, asam khlorida pekat, pereaksi DNS (*Dinitro Salisilic Acid*), resin anion dan kation, natrium metabisulfit, dan natrium K-tartrat.

Tandan kosong kelapa sawit diperoleh dari PTP. XI Kertajaya, Malingping, Kabupaten Lebak, Jawa Barat. Enzim selulase dan selobiase diperoleh dari PT. Supra Incomer perwakilan NOVO di Jakarta.

Bahan kimia untuk proses fermentasi adalah *Cooked Meat Medium*, *Reinforced Clostridial Agar*, D(+)-glukosa,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , natrium khlorida, amonium asetat, asam amino p-benzoat, biotin,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , ekstrak khamir, etanol 70 persen, etanol 95 persen.

Biakan bakteri yang digunakan adalah *Clostridium acetobutylicum* P262 yang diperoleh dari Prof. Ian S. Maddox, Jurusan Teknologi Proses dan Lingkungan, Universitas Massey, Selandia Baru. Biakan tersebut berupa suspensi spora yang disimpan pada suhu 4°C.

## 2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bioreaktor volume dua liter (Gumbira-Sa'id, 1994b), Reaktor volume 20 liter (Gumbira-Sa'id, 1994b), bioreaktor volume satu liter, penangas air, kotak inokulasi anaerobik (Gumbira-Sa'id *et al.*, 1994), pompa vakum, pipet, timbangan, labu ukur, gelas ukur, erlenmeyer, pH meter, otoklaf, kromatografi gas (GC), injektor, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC), Kolom resin, selang plastik silikon, tabung gas, kapas, alumunium foil, botol sampel, sentrifuse, dan ruang steril (*Clean bench*).

## B. WAKTU DAN TEMPAT

Penelitian ini dilakukan selama enam bulan, sejak awal bulan Maret sampai dengan akhir bulan Juli 1994. Penelitian utama dilakukan di laboratorium Bioindustri Jurusan Teknologi Industri Pertanian, FATETA IPB sedangkan analisis ABE, asam organik dan gula dilakukan di laboratorium Hara II, BALITTAN Bogor.

## C. TATA LAKSANA

Penelitian pendahuluan merupakan kegiatan untuk mendapatkan gula dari tandan kosong kelapa sawit. Penelitian pendahuluan meliputi penentuan komposisi TKKS, pengecilan ukuran TKKS, delignifikasi, dan hidrolisis TKKS untuk menghasilkan gula. Penelitian Utama meliputi serangkaian proses fermentasi untuk menghasilkan aseton-butanol-etanol.

Delignifikasi TKKS kelapa sawit dilakukan dengan menggunakan metoda Anis *et al.* (1994). Delignifikasi dilakukan dengan perendaman serbuk TKKS 60

mesh dalam larutan NaOH 1 N selama dua jam. Pada delignifikasi perlakuan yang diterapkan adalah perlakuan tanpa otoklaf dan dilanjutkan dengan otoklaf 121°C selama 15 menit.

Hidrolisis TKKS bebas lignin dilakukan dengan larutan bufer sitrat 0.05 M dan suhu 48°C selama 72 jam. Perlakuan hidrolisis dilakukan dengan menggunakan Enzim selulase 1 persen (v/b) dan 2 persen (v/b) serta enzim selobiase sebanyak 20 persen dari jumlah enzim selulase.

Fermentasi aseton-butanol-etanol dilaksanakan sebanyak tiga kali dengan menggunakan kadar gula awal 40, 60 dan 80 g/l. Fermentasi dilakukan secara acak selama 80 jam dengan pengambilan contoh setiap 10 jam.

#### D. METODA PENELITIAN

##### 1. Penyiapan Bahan dan Analisis Komposisi Kimiawi Tandan Kosong Kelapa Sawit

Pengecilan ukuran tandan kosong kelapa sawit dilakukan dengan menggunakan *hammer mill* hingga mencapai ukuran 60 mesh. Pengecilan ukuran dilakukan pada tandan kosong kelapa sawit yang telah dikeringkan dengan dijemur dan dibersihkan dari pengotor lain. Analisis tandan kosong kelapa sawit dilakukan terhadap TKKS sebelum didelignifikasi dan sesudah delignifikasi untuk mengetahui kadar abu, selulosa, lignin dan hemiselulosa TKKS. Metoda analisis disajikan pada Lampiran 3.

##### 2. Delignifikasi Tandan Kosong Kelapa Sawit

Delignifikasi tandan kosong kelapa sawit dimaksudkan untuk menghilangkan lignin yang akan menghalangi kerja enzim selulase dan enzim selo-

biase. Penghilangan lignin dilakukan menggunakan metoda Azemi *et al.*, (1994) dengan perendaman serbuk TKKS dalam NaOH 1 N selama dua jam. Perbandingan bobot TKKS dengan volume larutan adalah 1 : 20.

Kesempurnaan delignifikasi ditingkatkan dengan pemanasan TKKS tersebut dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pencucian dilakukan dengan menggunakan air hingga warna larutan menjadi jernih. Penetralan pH dilakukan dengan menggunakan asam khlorida tiga persen dan pencucian terakhir dengan menggunakan air panas bersuhu 80°C. TKKS yang didapat dikeringkan dalam oven bersuhu 70°C hingga mencapai kadar air 10 persen.

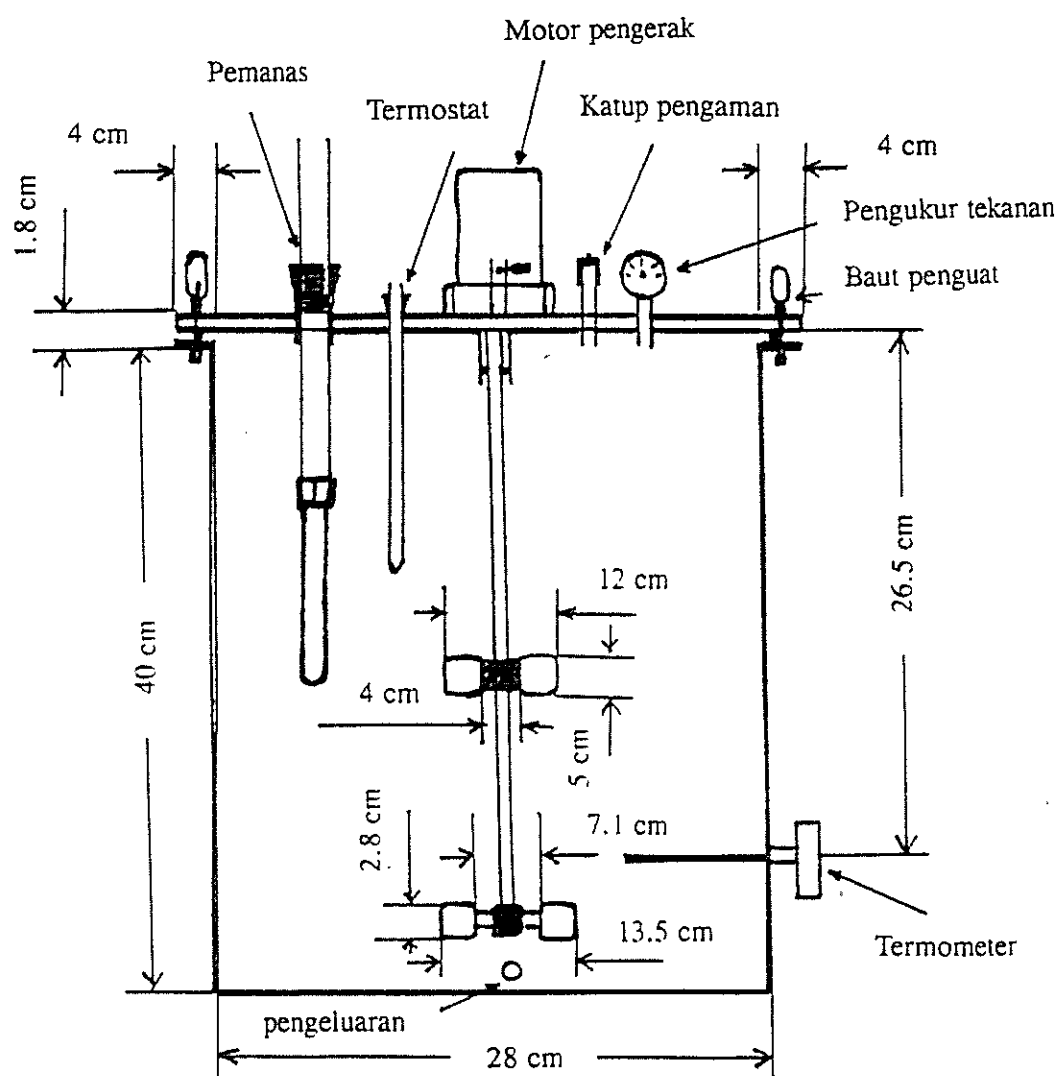
### 3. Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit

Hidrolisis tandan kosong kelapa sawit dilakukan dengan menggunakan metoda Azemi *et al.*, (1994). Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan larutan bufer sitrat 0.05 M ber pH 4.8 pada suhu 48°C selama 72 jam. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 3 persen (b/v), enzim selulase satu persen (v/b) dan enzim selobiase 0.2 persen (v/b).

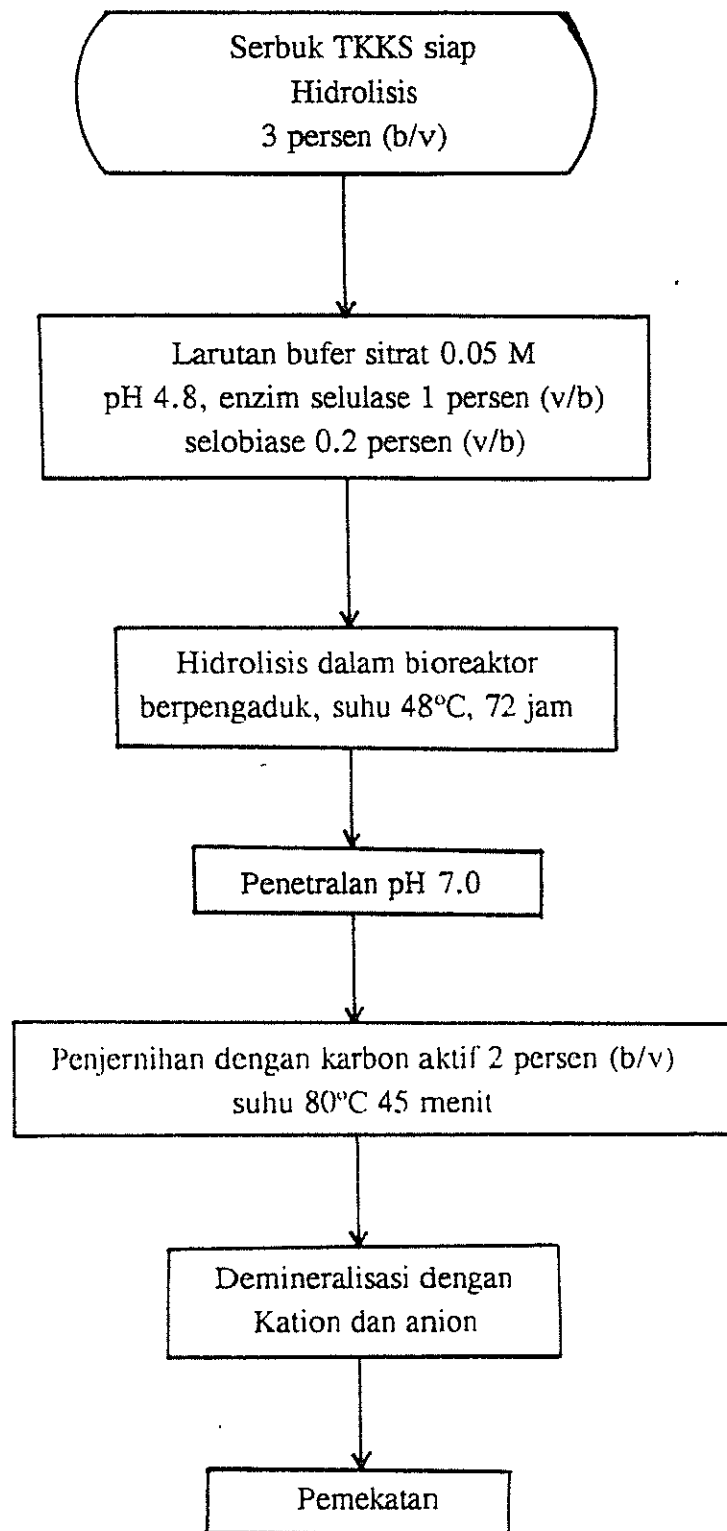
Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan bioreaktor volume 20 liter. Pengambilan contoh dilakukan setiap enam jam sekali untuk dianalisa kadar gula pereduksinya. Pada Gambar 6 disajikan skema gambar bioreaktor 20 liter yang digunakan untuk hidrolisis enzimatik tandan kosong kelapa sawit.

Setelah 72 jam hidrolisis dihentikan, cairan yang didapat dinetralkan dengan menggunakan NaOH 1 N hingga pH 7.0 dan disaring untuk memisahkan padatan dari cairannya. Beningan yang ada dimurnikan dengan menggunakan arang aktif 2 persen (b/v) yang dipanaskan pada suhu 80°C selama 45 menit. Perlakuan akhir dari proses ini adalah penghilangan mine-

ral dengan menggunakan resin anion dan kation. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan gula hidrolisat tandan kosong kelapa sawit murni. Gula hidrolisat selanjutnya dipekatkan sampai kadar gula 40 - 80 g/l dengan cara penguapan suhu 80°C. Proses perolehan gula dari hidrolisis tandan kosong kelapa sawit disajikan pada Gambar 7.



Gambar 6. Skema bioreaktor 20 liter untuk hidrolisis TKKS secara enzimatis



Gambar 7. Diagram alir produksi gula dari proses hidrolisis TKKS

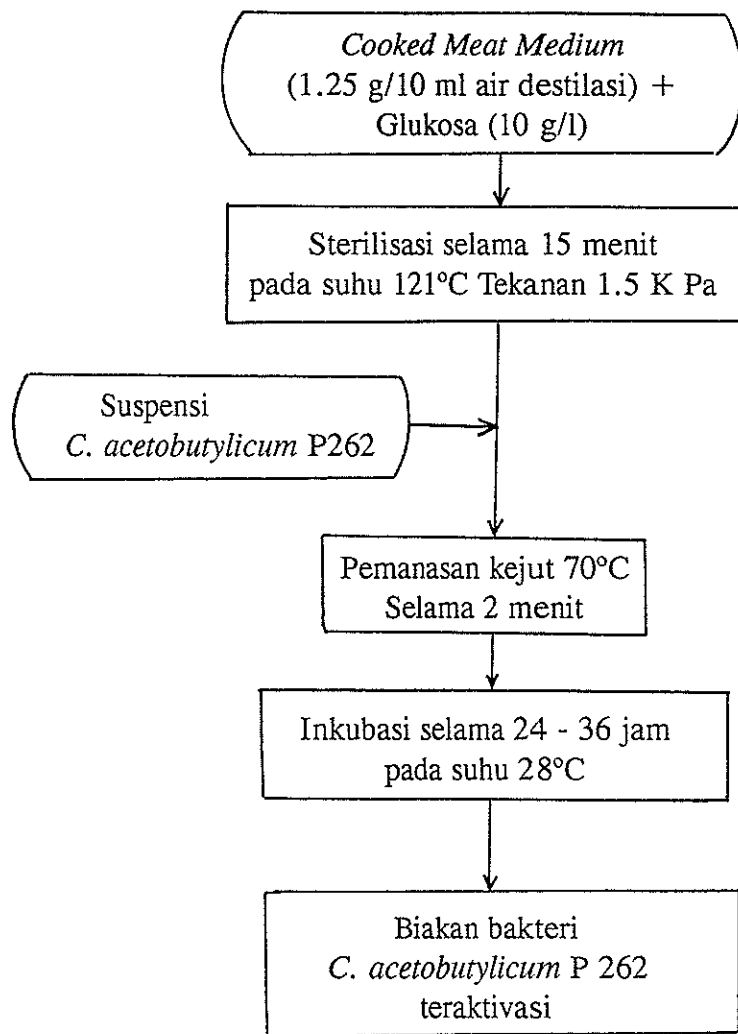


## E. FERMENTASI-ASETON-BUTANOL-ETANOL

### 1. Pengaktifan Bakteri *Clostridium acetobutylicum* P 262

Sebelum digunakan untuk fermentasi, biakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* P 262 yang berupa spora disimpan pada suhu 4°C atau biakan pada agar miring, perlu diaktifkan untuk melihat viabilitasnya. Aktivasi bakteri dilakukan dengan menginokulasikan suspensi spora sebanyak 0.1 ml atau biakan pada agar miring ke dalam 10 ml medium yang berisi *Cooked Meat Medium* dengan tambahan glukosa 0.10 g dalam tabung reaksi berulir. Sebelumnya medium disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Inokulasi dilakukan setelah medium didinginkan pada suhu ruang dan dilakukan dengan kondisi anaerobik dalam kotak inokulasi anaerobik. Kondisi anaerobik diciptakan dengan mengalirkan gas nitrogen yang dilewatkan pada kawat tembaga yang dipanaskan pada suhu 250°C. Setelah inokulasi dilakukan biakan diberi panas kejut pada suhu 70°C selama dua menit. Biakan disimpan pada *jar* anaerobik pada suhu ruang selama 24 jam hingga terlihat motilitasnya ditandai dengan menculnya gas yang mendorong medium ke permukaan. Pada Gambar 8 disajikan diagram alir proses aktivasi bakteri *C. acetobutylicum* P 262



Gambar 8. Diagram Alir Proses Aktivasi *Clostridium acetobutylicum* P 262

## 2. Penyiapan Medium Propagasi

Propagasi bakteri dilakukan dengan menggunakan medium sintetis sebanyak 100 ml. Komposisi medium propagasi adalah sama dengan medium produksi, hanya sumber karbon (gula) pada medium produksi diganti dengan hidrolisat tandan kosong kelapa sawit. Komposisi medium propagasi disajikan pada Tabel 5. Sebelum disterilkan, medium propagasi dipanaskan pada

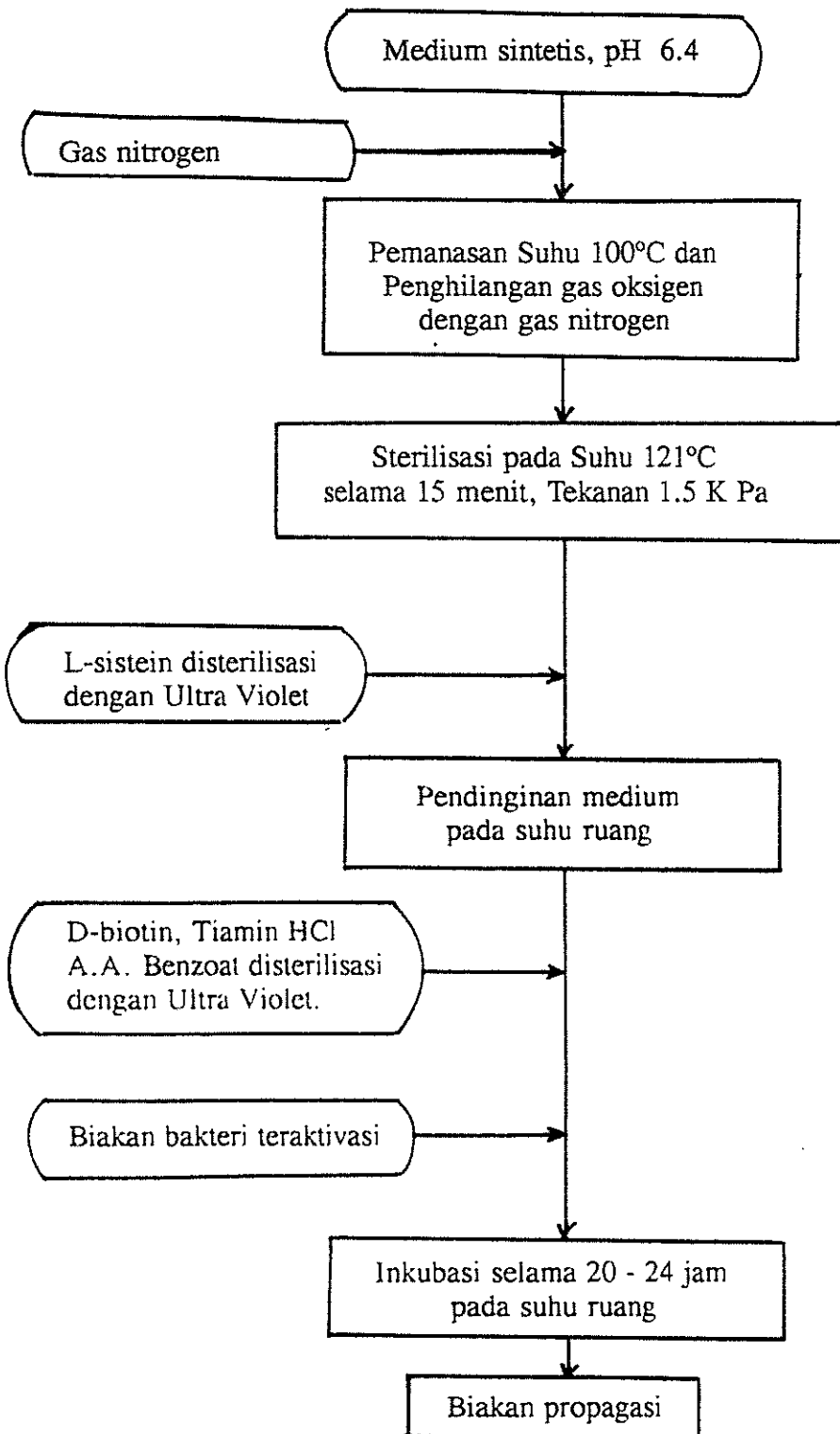
suhu 100°C sambil ditiupkan gas nitrogen untuk menjamin tidak ada oksigen yang terlarut dalam medium. Biotin, tiamin klorida, L-sistein dan asam 4-aminobenzoat disterilkan secara terpisah dengan menggunakan sinar ultraviolet. L-sistein HCl dicampurkan pada saat medium masih panas sedangkan biotin, tiamin klorida HCl dan asam 4-amino benzoat dicampurkan pada saat medium telah dingin.

Inokulasi dilakukan dengan memindahkan 5 ml cairan medium aktivasi ke dalam medium sintesis dalam kotak inokulasi anaerobik. Inkubasi dilakukan selama 20 - 24 jam pada suhu 28°C hingga terbentuk gas pada permukaan medium. Pada Gambar 8 disajikan diagram alir proses propagasi *C. acetobutylicum* P 262.

Tabel 5. Komposisi medium propagasi <sup>a)</sup>

Komponen	Konsentrasi (g/l)
D(+)-glukosa	60
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.524
NaCl	1.0
Na-asetat	1.0
L-sisteinklorida.H <sub>2</sub> O	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.4
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.02
D(+)-Biotin	0.004
Tiamin klorida.HCl	0.016
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0
Ekstrak khamir	5.0
Asam 4-aminobenzoat	0.04

<sup>a)</sup> Kanchanatawe *et al.* (1992)

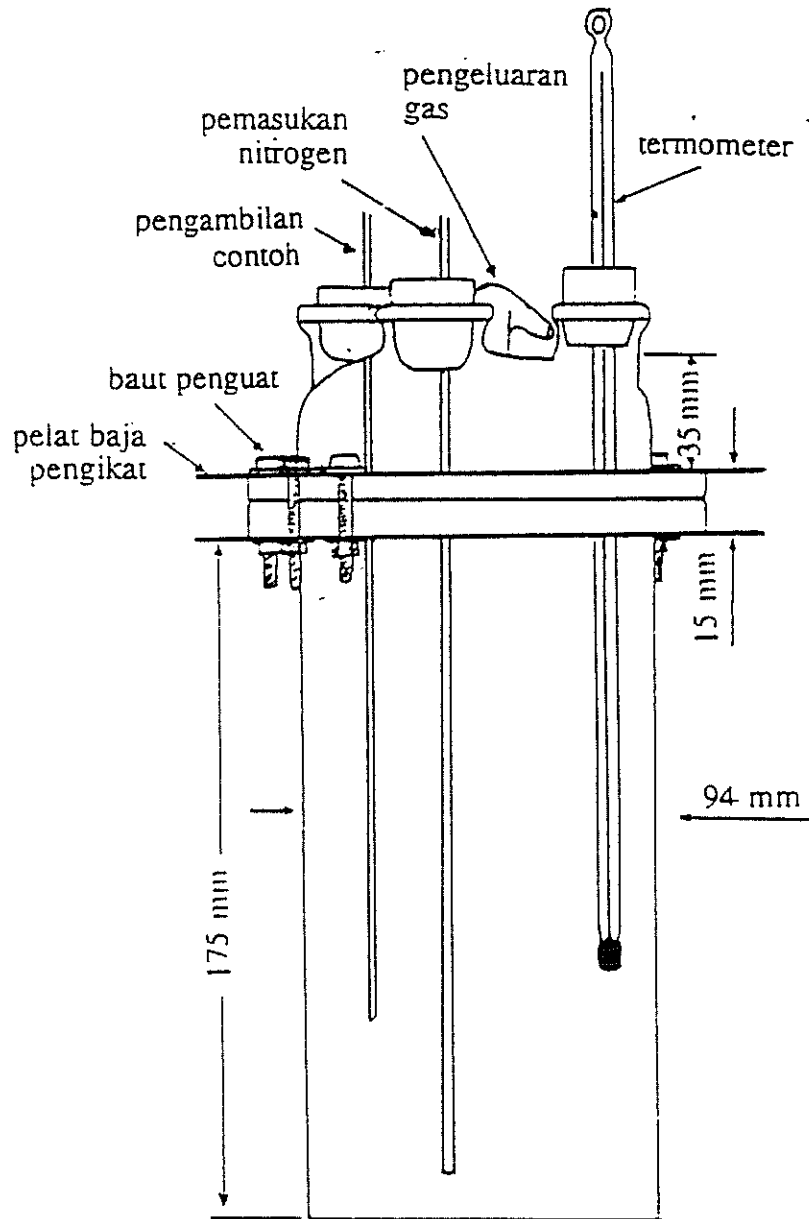


Gambar 8. Diagram alir proses propagasi *Clostridium acetobutylicum* P 262

### 3. Fermentasi Curah produksi ABE

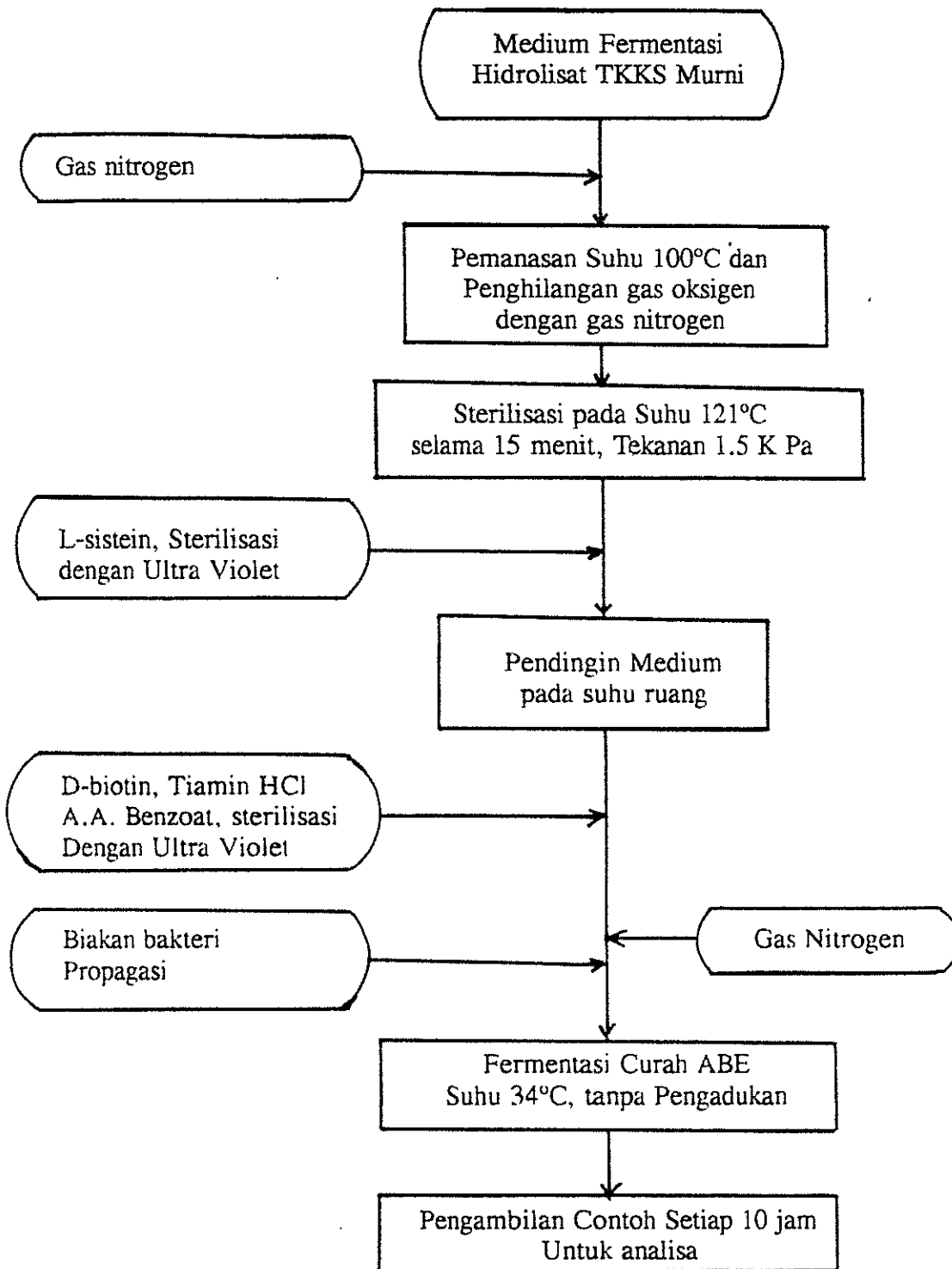
Fermentasi curah dilakukan dalam bioreaktor volume satu liter bermerek "Okura" yang dibuat oleh Fuji elektrik, Jepang. Fermentasi curah diawali dengan mempersiapkan bioreaktor seperti yang disajikan pada Gambar 9. Persiapan meliputi pencucian bioreaktor, sterilisasi bioreaktor dan penyiapan medium. Tata cara penyiapan substrat hampir sama dengan penyiapan medium propagasi. Pada Gambar 10 disajikan diagram alir proses fermentasi ABE dengan substrat hidrolisat tandan kosong kelapa sawit.

Untuk membuat medium produksi sumber karbon D(+)-glukosa di substitusi dengan hidrolisat tandan kosong kelapa sawit. Kadar gula produksi yang digunakan pada penelitian ini adalah 40, 60 dan 80 g/l. Medium ditempatkan terpisah dari fermentor dengan menggunakan erlemeyer 2000 ml dimana pH medium diatur dengan menggunakan NaOH 1 N atau HCl 3 persen hingga pH 6.4. Medium fermentasi disterilkan dengan autoklav pada suhu 121°C selama 15 menit. Pemasukan medium dilakukan apabila medium telah dingin dengan prinsip pendorongan gas nitrogen ke dalam labu erlenmeyer yang telah dihubungkan dengan selang silikon ke dalam bioreaktor. Pada saat setelah selesai pemindahan medium dilakukan peniupan gas nitrogen untuk menjamin kondisi tanpa oksigen selanjutnya dengan prinsip yang sama medium propagasi diinokulasikan dengan teknik penggantian tempat (*displacement*), yaitu dengan cara mengalirkan gas nitrogen ke dalam medium propagasi. Fermentasi dilakukan secara curah pada suhu 34°C selama 80 jam, pengambilan contoh untuk analisa dilakukan setiap 10 jam. Contoh diawetkan dengan penambahan 10 persen (v/v) asam meta fosfat 0.2 M.



Gambar 9. Bioreaktor volume satu liter yang digunakan untuk fermentasi ABE dengan substrat hidrolisat-TKKS murni.





Gambar 10. Diagram alir proses fermentasi ABE dengan hidrolisat TKKS murni

#### 4. Analisis Hasil Fermentasi

Contoh diukur pH-nya dan dilakukan sentrifusi untuk memisahkan biomasanya. Sentrifusi dilakukan pada suhu 4°C dengan menggunakan sentrifusi Janetzki 5000 dengan kecepatan 5500 rpm selama 25 menit. Filtrat yang berupa beningan dimasukkan ke dalam botol contoh untuk kemudian dilakukan analisis ABE dan gula sisa. Biomassa yang mengendap dicuci dengan aquades dan disentrifusi kembali untuk kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 3 jam.

Kadar gula dianalisa dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC-*High Performance Liquid Chromatografi*). HPLC Waters 440 dilengkapi dengan kolom Bondapak C18 (3000 mm x 3.9 mm), detektor RI (*Refractive Index*) yang dilanjutkan dengan detektor absorbansi (*absorbance*) model 440 pada panjang gelombang 254 nm. Suhu kerja kolom adalah 60°C dengan laju alir cairan 1 ml/min. Hasil analisa dicetak oleh Waters 740 data modul.

Aseton, butanol, etanol dan asam dianalisa dengan menggunakan kromatografi gas (GC). GC Hitachi model 263-50 dilengkapi dengan detektor ionisasi api (FID) dengan suhu 155°C, kolom jejal porafak Q 100/200 mesh (0.7 m x 0.5 cm) dengan suhu 185°C. Suhu sekitar lubang penyuntikan contoh (*injector port*) 150°C. Gas pembawa materi yang dipergunakan adalah nitrogen dan hidrogen dengan perbandingan 1 : 2 dan tekanan udara diatur 0.7 kg/cm<sup>2</sup>. Hasil analisis dicetak oleh Hitachi D-2500 Chromato-Integrator.



## 5. Analisis Parameter Kinetika Fermentasi

Menurut Fond *et al.* (1986), pertumbuhan mikroorganisme pada kultur curah dapat didekati dengan model tidak berstruktur yang mengasumsikan laju pertumbuhan sel hanya merupakan fungsi dari massa selular. Laju pertumbuhan sel, penggunaan gula, pembentukan pelarut dan asam dinyatakan dalam gram/l.jam, digambarkan dalam bentuk kurva berdasarkan keragaman konsentrasi biomassa, gula, asam dan pelarut sesuai dengan lama waktu fermentasi.

Laju spesifik pertumbuhan sel ( $\mu$ ) ditetapkan dari massa sel ( $X$ ) untuk setiap satuan waktu. Laju spesifik penggunaan substrat ( $\sigma_G$ ) didefinisikan sebagai gram substrat (gula,  $G$ ) untuk setiap gram sel ( $X$ ) perjam dan laju spesifik pembentukan produk ( $\pi$ ) didefinisikan sebagai gram produk (asam,  $a$  dan pelarut,  $p$ ) untuk setiap gram sel ( $X$ ) perjam yang diperhitungkan sebagai nisbah laju penggunaan substrat dan pembentukan produk terhadap konsentrasi sel di dalam medium. Parameter-parameter kinetika fermentasi dapat diturunkan dalam rumusan sebagai berikut.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (\mu, \text{jam}^{-1})$$

$$\sigma_G = \frac{1}{X} \frac{dp}{dt} \quad (\sigma_G, \text{g gula/g biomassa.jam})$$

$$\pi_p = \frac{1}{X} \frac{dp}{dt}$$

( $\pi_p$ , g pelarut/g biomassa.jam)

$$\pi_a = \frac{1}{X} \frac{da}{dt}$$

( $\pi_a$ , g asam/g biomassa.jam)

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. HIDROLISIS ENZIMATIK TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

#### 1. Analisis Proksimat Tandan Kosong Kelapa Sawit

Sebagian besar komponen tandan kosong kelapa sawit (TKKS) adalah selulosa dan hemiselulosa yang membentuk serat dan dilingkupi oleh lapisan lignin yang kuat. Adanya hemiselulosa mengakibatkan tandan kosong kelapa sawit bersifat liat dan mudah menyerap air.

Hasil analisa terhadap komposisi kimiawi TKKS ditujukan untuk mengetahui besarnya kuantitas komponen selulosa dan hemiselulosa. Hidrolisis hemiselulosa diharapkan dapat menghasilkan gula-gula sederhana yang dapat difermentasikan oleh *C. acetobutylicum* P 262. Hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan xilosa, sedangkan hidrolisis selulosa akan menghasilkan glukosa dan selobiosa. Pada Tabel 6 disajikan hasil analisa kimiawi komposisi TKKS yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 6. Komposisi Tandan Kosong Kelapa Sawit yang digunakan dalam penelitian <sup>a)</sup>

Komponen TKKS	persen bahan kering
Lignin	28.24
Selulosa	42.24
Hemiselulosa	22.39
Abu	6.90

<sup>a)</sup> Wibowo (1994)

Berdasarkan hasil analisis proksimat diketahui bahwa selulosa merupakan komponen terbesar (42.24 persen). Perbedaan hasil analisis dengan yang dilakukan oleh Anis *et al.* (1994) dan Pratiwi (1988) hanya terletak pada komposisi ligninnya. Perbedaan ini disebabkan terutama oleh umur tandan buah segar yang dipanen, kematangan buah dan varietas kelapa sawit itu sendiri.

Kadar lignin yang tinggi (24.14 persen) menurut Haigler *di dalam* Nevel dan Zeronian (1985) akan menghambat proses hidrolisis, karena lignin bersifat mengikat selulosa dan hemiselulosa. Adanya lignin selain mengakibatkan serbuk TKKS sukar larut (menyerap air), juga menutupi permukaan selulosa dan hemiselulosa yang mengakibatkan kerja enzim menjadi terhalang.

Penghilangan lignin sebelum proses hidrolisis adalah hal yang harus dilakukan agar proses perolehan gula-gula sederhana terfermentasi menjadi mudah dan efisien serta memberikan kadar gula yang tinggi. Anis *et al.* (1994) menggunakan alkali (NaOH) untuk menghilangkan lignin yang terdapat pada TKKS. Penelitian yang dilakukan diatas telah berhasil menunjang konversi TKKS menjadi gula-gula sederhana sampai pada tingkat sakarifikasi 90 persen.

## 2. Delignifikasi TKKS Menggunakan Basa Kuat

Hidrolisis TKKS dilakukan dalam dua tahapan yaitu penghilangan lignin (delignifikasi) dan dilanjutkan proses sakarifikasi TKKS bebas lignin dengan proses enzimatis. Proses penghilangan lignin yang dilakukan juga mengakibatkan adanya selulosa dan hemiselulosa yang terdegradasi.

Secara idealnya proses proses delignifikasi menurut Fengel dan Wegener (1989) haruslah memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- lignin yang tersisa sedikit,





### 3. Hidrolisis Enzimatis Tandan Kosong Kelapa Sawit

Kinerja bioreaktor volume 20 liter untuk hidrolisis tandan kosong kelapa sawit dipelajari pada penelitian ini. Volume kerja bioreaktor tersebut adalah 17 liter dengan suhu operasi 48 - 50°C selama 72 jam. Pemanasan dilakukan dengan menggunakan pemanas berdaya 1000 watt dan pengadukan dilakukan dengan motor induksi 25 watt pada kecepatan 100 rpm. Pada Gambar 11 disajikan bioreaktor baja tahan karat volume 20 liter untuk hidrolisis enzimatis TKKS.



Gambar 11. Bioreaktor baja tahan karat volume 20 liter yang digunakan untuk hidrolisis TKKS.

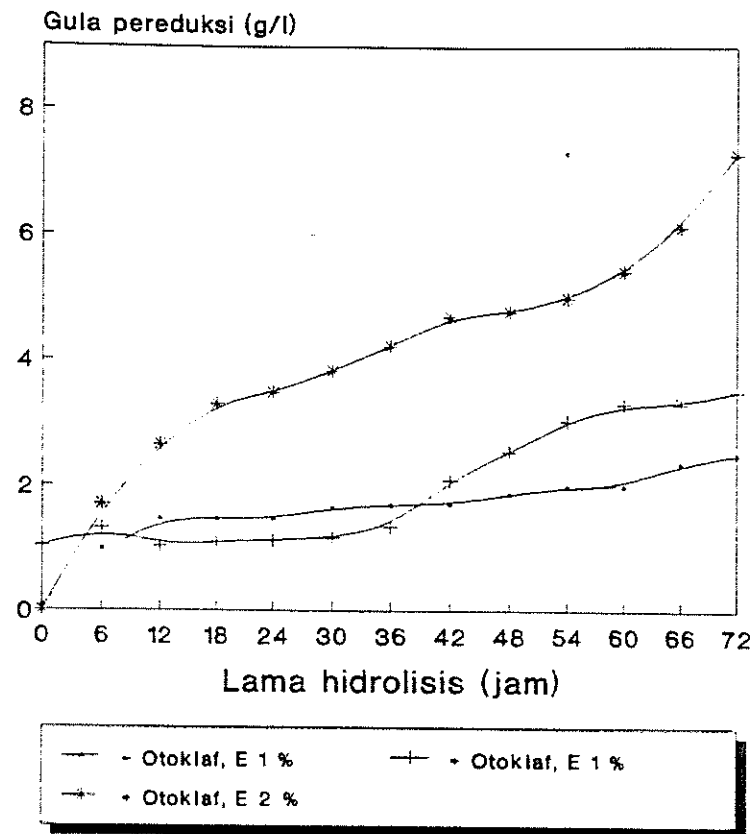
Pada hidrolisis dengan menggunakan serbuk TKKS yang didelignifikasi dengan NaOH 1 N selama dua jam, tanpa perlakuan otoklaf dengan konsentrasi enzim selulase 1 persen (v/b) dan selobiase 0.2 persen (v/b), serta padatan TKKS 3 persen (b/v) menghasilkan gula pereduksi 2.59 g/l setelah 72 jam sakarifikasi. Pada hidrolisis tersebut tingkat sakarifikasi yang berhasil dicapai adalah 17.60 persen.

Apabila dibandingkan dengan penelitian *Anis et al.* (1994) maka tingkat sakarifikasi yang berhasil dicapai masih sangat rendah. Hal ini diduga karena adanya penghambatan kerja enzim yang diakibatkan sempitnya luas daerah permukaan selulosa pada serbuk TKKS yang tidak mengalami perlakuan pemanasan dan tekanan tinggi (otoklaf).

Pada hidrolisis menggunakan serbuk TKKS bebas lignin yang didelignifikasi dan dilanjutkan dengan otoklaf 121°C selama 15 menit, tekanan 1.5 atm memberikan hasil yang lebih baik dari pada perlakuan pertama. Kadar gula setelah 72 jam waktu sakarifikasi adalah sebesar 3.50 g/l. Tingkat sakarifikasi yang diperoleh mengalami kenaikan menjadi sebesar 23.80 persen. Peningkatan kadar gula pada hidrolisis kedua diduga diakibatkan oleh penambahan luas permukaan daerah selulosa akibat perlakuan panas dan tekanan tinggi sehingga kerja enzim semakin efektif.

Hidrolisis dengan menggunakan serbuk TKKS yang didelignifikasi dan diotoklaf dengan menggunakan dosis enzim selulase dan selobiase sebanyak dua kali lipat, ternyata mengakibatkan peningkatan kadar gula pereduksi menjadi dua kali lipat pula. Kadar gula pereduksi setelah 72 jam sakarifikasi adalah sebesar 7.50 g/l serta tingkat sakarifikasi meningkat menjadi 50.97 persen. Pada Gambar 12 disajikan kurva peningkatan kadar gula selama proses hidrolisis yang diukur setiap enam jam sekali.





Gambar 12. Peningkatan kadar gula pereduksi pada sakarifikasi TKKS dengan perlakuan dan konsentrasi enzim berbeda.

## B. FERMENTASI ASETON - BUTANOL - ETANOL

Fermentasi curah adalah sistem yang paling banyak digunakan karena tingkat keberhasilannya lebih tinggi dibandingkan dengan tipe fermentasi lainnya. Pada fermentasi curah, substrat yang ada diinokulasikan dengan inokulum mikroorganisme tertentu dan produk dipanen setelah mencapai waktu tertentu, yakni saat jumlah produk yang ada pada waktu tersebut maksimum.



Fermentasi aseton-butanol-etanol pada kultur curah merupakan jenis fermentasi yang telah diterapkan pada skala industri. Penelitian fermentasi ABE pada kultur curah dengan menggunakan berbagai jenis gula yaitu glukosa dan xilosa serta gula campurannya dilakukan oleh *Fond et al.*, (1986). Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa glukosa dan xilosa dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan *Clostridium acetobutylicum* tetapi memberikan karakteristik yang berbeda. Pertumbuhan pada medium glukosa lebih cepat dibandingkan dengan medium xilosa murni. Hasil penelitian ini menyatakan bahwa campuran glukosa dan xilosa memberikan rendemen pelarut yang tinggi yaitu 33 persen, dengan pelarut yang dihasilkan mencapai 15 g/l.

Berbagai penelitian dilakukan untuk mendapatkan sumber karbon yang murah untuk fermentasi ABE. Maddox dan Murray (1983) melakukan fermentasi aseton-butanol-etanol dengan menggunakan hidrolisat *Pinus radiata* menghasilkan butanol mencapai 5.7 g/l atau rendemen 17 persen. Shah *et al.* (1990) menggunakan kayu keras sebagai medium pertumbuhan *C. acetobutylicum*, hasil pelarut yang diperoleh mencapai 15 g ABE/100 g kayu yang digunakan. Pada fermentasi ini hidrolisis kayu langsung dilanjutkan dengan fermentasi.

Soni *et al.* (1983) menggunakan hidrolisat ampas tebu dan jerami padi sebagai sumber karbon untuk produksi pelarut dengan menggunakan *C. saccharoperbutylacetonicum*, dengan pelarut yang dihasilkan mencapai 16 g/l dengan kadar gula pereduksi 60 g/l. Pada fermentasi ini penghilangan bahan-bahan pengganggu dalam hidrolisat memberikan efek peningkatan jumlah pelarut yang dihasilkan.

Mes-Hartree dan Saddler (1983), menggunakan medium hidrolisat kayu untuk fermentasi ABE. Lima jenis gula dari hidrolisat kayu yang digunakan pada fermentasi ini adalah selobiosa, mannosa, arabinosa, xilosa dan galaktosa. Dari penelitian diketahui bahwa selobiosa adalah gula yang baik untuk pertumbuhan *C.*

*acetobutylicum* selain glukosa dan memberikan butanol yang tinggi. Xylosa yang merupakan gula terbanyak pada hidrolisat kayu lunak dapat ditingkatkan penggunaannya dengan memberikan  $\text{CaCO}_3$  sehingga meningkatkan konsumsi xilosa oleh *C. acetobutylicum*. Butanol yang dihasilkan pada medium xilosa yang diberi  $\text{CaCO}_3$  0.4 persen adalah 5.5 g/l dengan produksi mencapai 37 persen dari gula yang digunakan.

Fermentasi aseton-butanol-etanol dari hidrolisat tandan kosong kelapa sawit memberikan hasil seperti yang disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Rekapitulasi hasil fermentasi ABE dengan hidrolisat TKKS

Parameter	Kadar Gula (g/l)		
	40	60	80
$\mu_{maks}$	0.041	0.281	0.297
pH awal	6.62	6.78	6.42
Lama fermentasi (jam)	80	80	80
pH akhir	5.50	5.38	5.75
Butanol (g/l)	4.12	9.35	7.80
Etanol (g/l)	0.95	2.95	1.60
Aseton (g/l)	0.72	1.93	-
Total asam (g/l)	11.92	13.73	-
Gula digunakan (g/l)	25.92	52.80	63.31
$Y_{p/s}$	0.165	0.272	0.188
$Y_{p/s}$	3.870	1.937	1.571

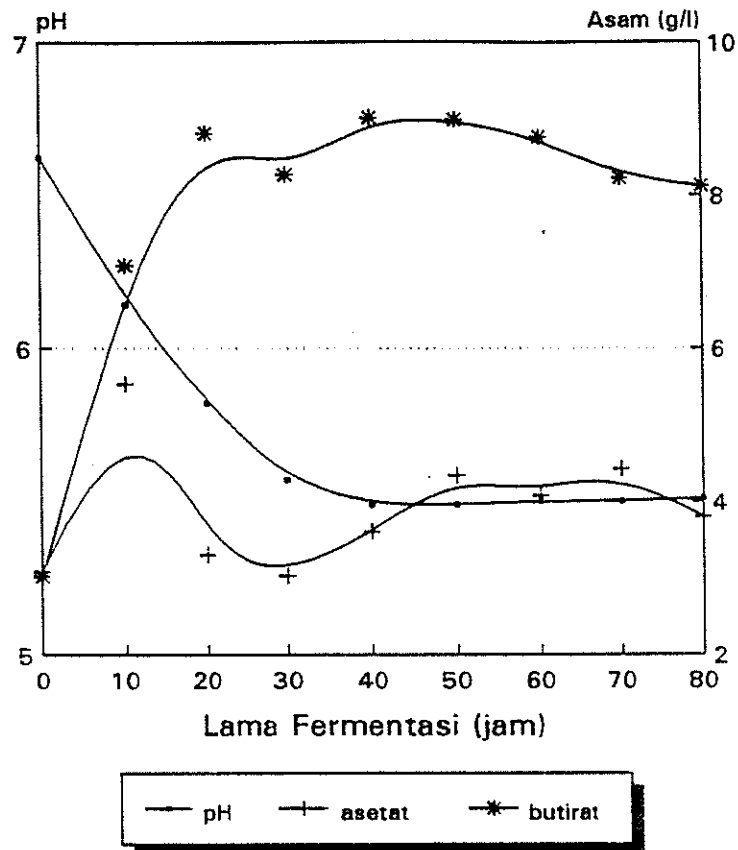


Tabel 8 memperlihatkan bahwa fermentasi dengan menggunakan kadar gula awal 60 g/l, memberikan total pelarut yang tertinggi yaitu 14.23 g/l atau  $Y_{p/s} = 0.272$ , didasarkan pada gula yang dikonsumsi. Pada fermentasi dengan menggunakan kadar gula awal 44 g/l memberikan  $Y_{p/s} = 0.165$ . Fermentasi dengan kadar gula awal 80 g/l memberikan  $Y_{p/s} = 0.188$ .

Pemilihan substrat yang murah dan tersedia kelimpahannya diharapkan dapat menjadikan industri fermentasi ABE layak secara ekonomi. Tandan kosong kelapa sawit merupakan pilihan, karena ketersediaannya di Indonesia sangat melimpah. Penelitian Azemi *et al.*, (1994) membuktikan bahwa hidrolisat TKKS dapat digunakan untuk produksi asam glutamat dan silitol.

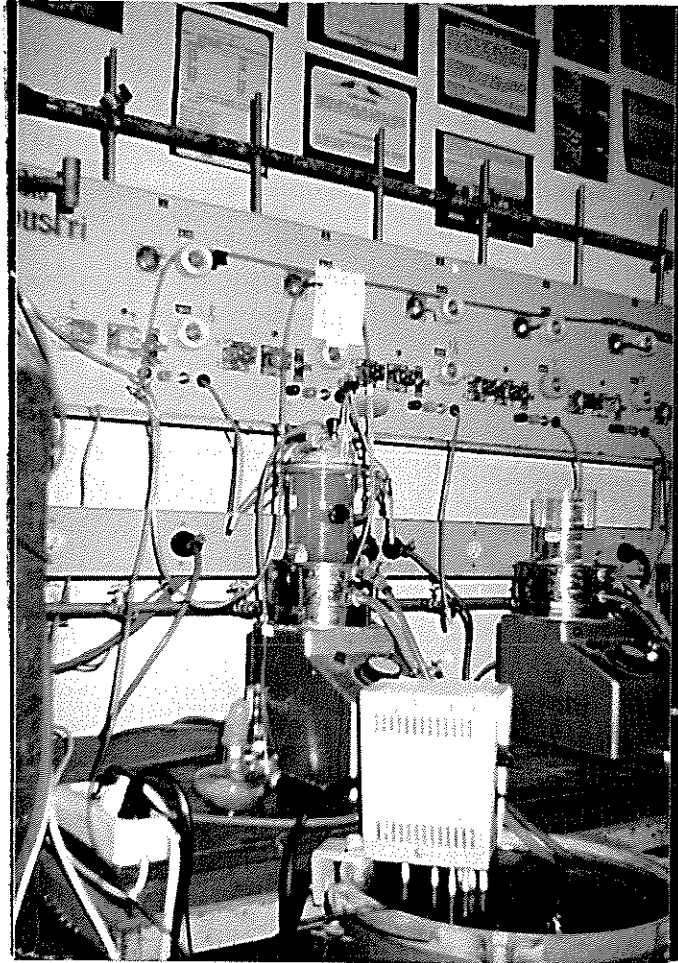
#### 1. Fermentasi Dengan Kadar Gula Awal 44 g/l.

Pada fermentasi dengan kadar gula awal 44 g/l, pH awal fermentasi (6.62) menurun menjadi 5.57 setelah 30 jam. Hal ini menandakan fase asidogenik terjadi selama 30 jam pertama. Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) adalah  $0.041 \text{ jam}^{-1}$  dengan bobot kering sel tertinggi sebesar 1.52 g/l. Nilai pH pada akhir fermentasi adalah 5.50. Pada Gambar 13 disajikan grafik hubungan antara nilai pH dengan jumlah asam yang dihasilkan.



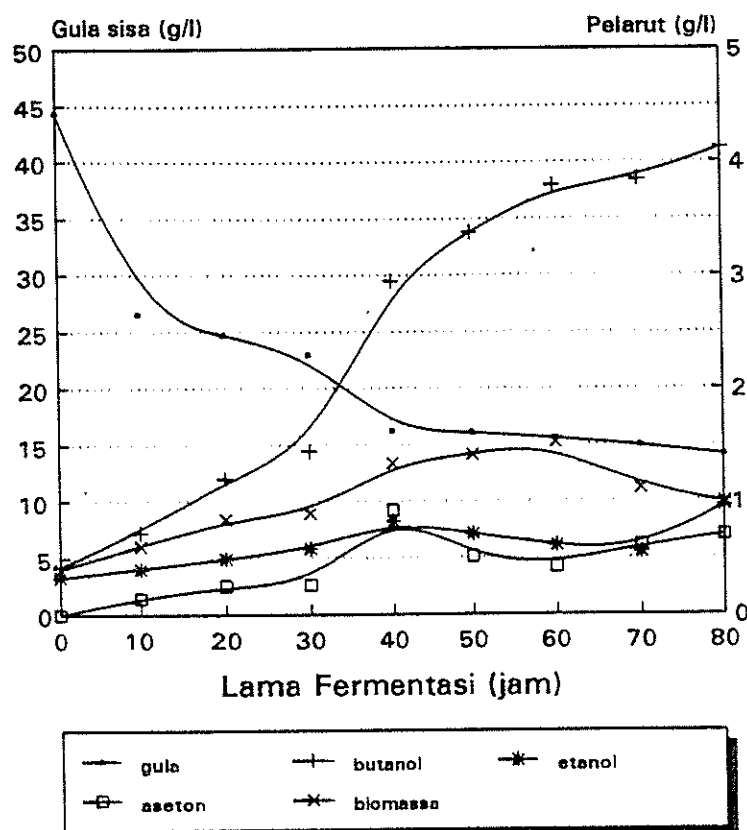
Gambar 13. Grafik hubungan antara pH dengan jumlah asam yang dihasilkan selama fermentasi ABE dengan kadar gula awal 44 g/l.

Penurunan pH dari 6.62 menjadi 5.57 pada jam ke 30 menandakan sejumlah asam telah dihasilkan. Jumlah asam butirat dan asetat maksimal adalah 6.34 dan 8.92 g/l. Tingginya jumlah asam yang dihasilkan bersifat menghambat pertumbuhan sel (Linden, 1992) ditandai dengan kecilnya bobot kering sel yang dihasilkan selama proses fermentasi (Monot dan Enggaser, 1983). Pada Gambar 14 disajikan ilustrasi proses fermentasi pada bioreaktor Fuji Elektrik "Okura" bervolume satu liter.



Gambar 14. Ilustrasi proses fermentasi aseton-butanol-etanol pada bioreaktor satu liter dengan substrat hidrolisat TKKS.

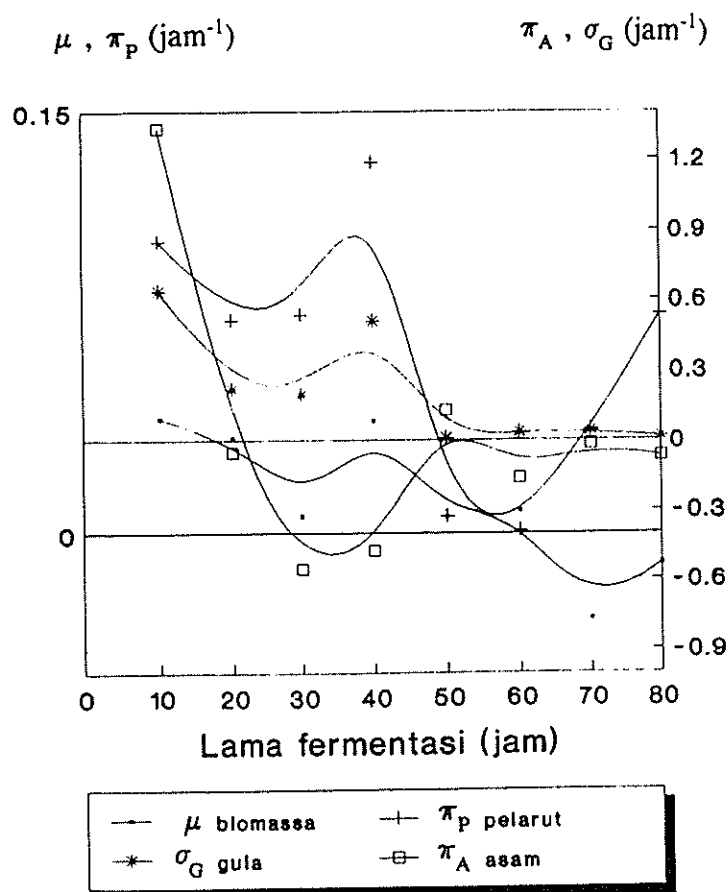
Pada fermentasi dengan kadar gula awal 44 g/l, gula yang dikonsumsi adalah sebesar 25.92 g/l dan total pelarut yang dihasilkan sebesar 5.77 g/l dan 11.92 g/l asam. Pada Gambar 15 disajikan grafik hubungan antara kadar gula, biomassa dan jumlah pelarut ABE yang dihasilkan. Rendahnya kadar gula yang dikonsumsi dan tingginya pH diperkirakan menjadi penyebab pelarut yang dihasilkan sangat rendah (Monot dan Enggaser, 1983). Pertumbuhan sel yang terhambat diperkirakan menjadi penyebab asam yang ada tidak berhasil diubah menjadi pelarut. Menurut Gootschalk dan Gruppe (1992) asetat dan butirat dapat masuk kembali ke dalam siklus biokimia pembentukan pelarut. Asetat diubah menjadi butiril CoA dan butirat menjadi asetil CoA.



Gambar 15. Grafik hubungan antara jumlah gula yang digunakan dengan pelarut dan biomassa pada fermentasi ABE dengan kadar gula awal 44 g/l

Fermentasi aseton-butanol-etanol akan berhasil secara baik bila fase asidogenik dan solventogenik terjadi secara simultan. Pada kebanyakan fermentasi ABE setelah fase asidogenik tercapai, pertumbuhan sel bakteri telah mengalami penghambatan oleh adanya asam. Hal ini yang mengakibatkan asam yang ada tidak berhasil masuk ke siklus pembentukan pelarut disebabkan lisisnya sejumlah sel dan diduga inaktifnya enzim butiraldehida dehidrogenase dan aseto asetil-CoA tranferase. Kadar gula awal dan pH yang rendah akan sangat mempengaruhi keberhasilan pengubahan asam menjadi pelarut (Monot dan Enggaser, 1983).

Pada Gambar 16 disajikan perubahan parameter kinetika fermentasi yang meliputi laju penggunaan gula spesifik, pertumbuhan spesifik, pembentukan asam spesifik dan pembentukan pelarut spesifik. Laju pembentukan pelarut maksimum terjadi pada jam ke 40 yaitu 0.132 g pelarut/g sel.jam. Laju pembentukan asam tertinggi dicapai pada jam ke 10 yaitu 1.327 g asam / g sel.jam. Laju pembentukan pelarut maksimum merupakan saat terjadinya fase solventogenik pada fermentasi ABE.

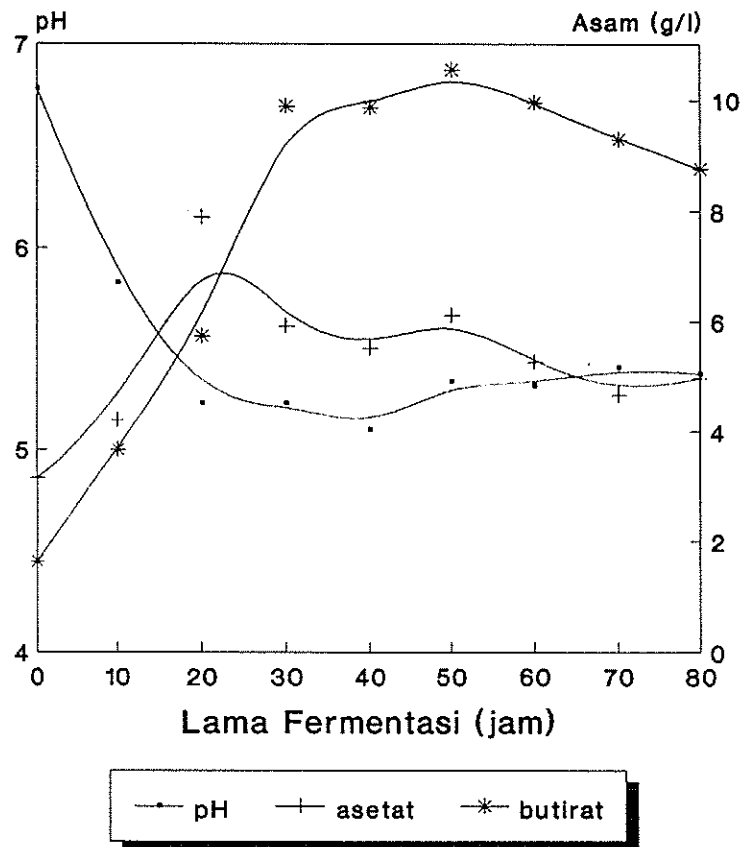


Gambar 16. Grafik perubahan parameter kinetika fermentasi ABE dengan kadar gula 44 g/l.



## 2. Fermentasi Dengan Kadar Gula 60 g/l

Pada fermentasi dengan kadar gula awal hidrolisat TKKS 60 g/l, jumlah gula yang berhasil dikonsumsi pada fermentasi tersebut mencapai 88 persen (52.80 g/l). Bobot kering sel maksimum yang dihasilkan adalah 2.54 g/l pada jam ke 30. Laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu_{maks}$ ) adalah 0.281 jam<sup>-1</sup> dan dicapai pada saat 10 jam setelah inokulasi. Dibandingkan dengan fermentasi dengan kadar gula 44 g/l maka biomassa yang dihasilkan mencapai dua kali lipat. Wang *et al* (1984) menyatakan bahwa *C. acetobutylicum* mempunyai pola pertumbuhan campuran, dimana sebagian pembentukan pelarut berasosiasi dengan peningkatan jumlah sel tetapi bagian yang lain tidak berasosiasi.



Gambar 17. Grafik hubungan antara jumlah asam dan nilai pH selama proses fermentasi ABE dengan kadar gula 60 g/l.

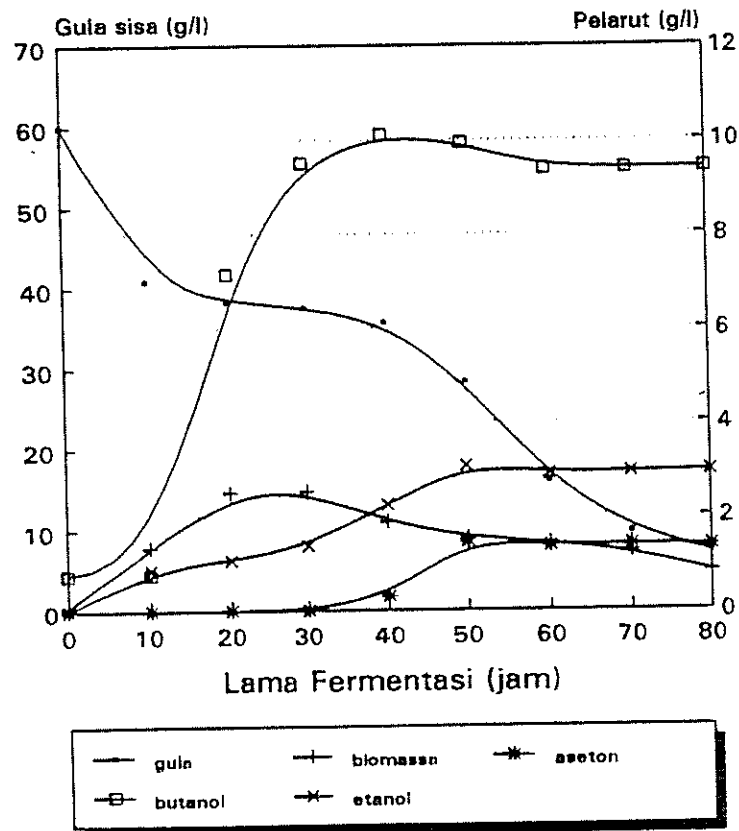


Fase asidogenik terjadi pada 30 jam pertama waktu fermentasi. Pada Gambar 17 disajikan grafik hubungan antara nilai pH dan jumlah asam yang dihasilkan selama 80 jam. Pada fase asidogenik jumlah asam butirat yang dihasilkan terus meningkat sampai pada jam ke 50 (10.53 g/l), sedangkan asam asetat maksimal dihasilkan pada jam ke 20 (7.89 g/l). Nilai pH terendah dicapai pada jam ke 40 (5.10) yang disebabkan oleh jumlah asam yang maksimum. Bahl *et al.* (1982) menyatakan bahwa penurunan nilai pH dari 6.0 menjadi 4.5 akan memancing proses solventogenik. Fenomena yang menarik pada penggunaan kadar gula 60 g/l adalah nilai pH setelah fase asidogenik mengalami kenaikan yang disebabkan sejumlah asam asetat dan butirat memasuki kembali jalur kimiawi pembentukan pelarut (Gottschalk dan Gruppe, 1990).

Pembentukan pelarut berkaitan dengan pH proses fermentasi dan kadar gula yang digunakan. Ennis dan Maddox (1987) menyatakan adanya hubungan yang kuat antara jumlah pelarut yang dihasilkan dengan jumlah gula yang dikonsumsi. Pada kisaran nilai pH yang tinggi (6.0) jumlah gula yang dikonsumsi tinggi tetapi pelarut yang dihasilkan rendah. Fermentasi dengan menggunakan kadar gula awal 60 g/l dengan pH awal yang tinggi (6.78) mengakibatkan persentase gula yang dikonsumsi tinggi yakni 88 persen. Pembentukan pelarut tetap tinggi pada fermentasi kadar gula awal 60 g/l disebabkan pH pada jam ke 40 mencapai 5.10, yang memancing proses pembentukan pelarut.

Pada Gambar 18 disajikan hubungan antara kadar gula, jumlah pelarut dan biomassa yang dihasilkan selama proses fermentasi. Jumlah pelarut meningkat secara drastis dari jam ke 10 (1.63 g/l) hingga jam ke 40 (12.63 g/l). Walaupun fase asidogenik terjadi pada jam ke 10 sampai ke 40 tetapi di

lain pihak ke dua fase terjadi secara simultan. Fase solventogenik pada umumnya lebih banyak membutuhkan peran enzim *butiral dehidra dehidrogenase* dibandingkan sel itu sendiri, sebab sel yang ada telah terhambat pertumbuhannya oleh asam dan pelarut.



Gambar 18. Grafik hubungan antara kadar gula, jumlah pelarut dan biomassa selama fermentasi ABE dengan kadar gula awal 60 g/l.

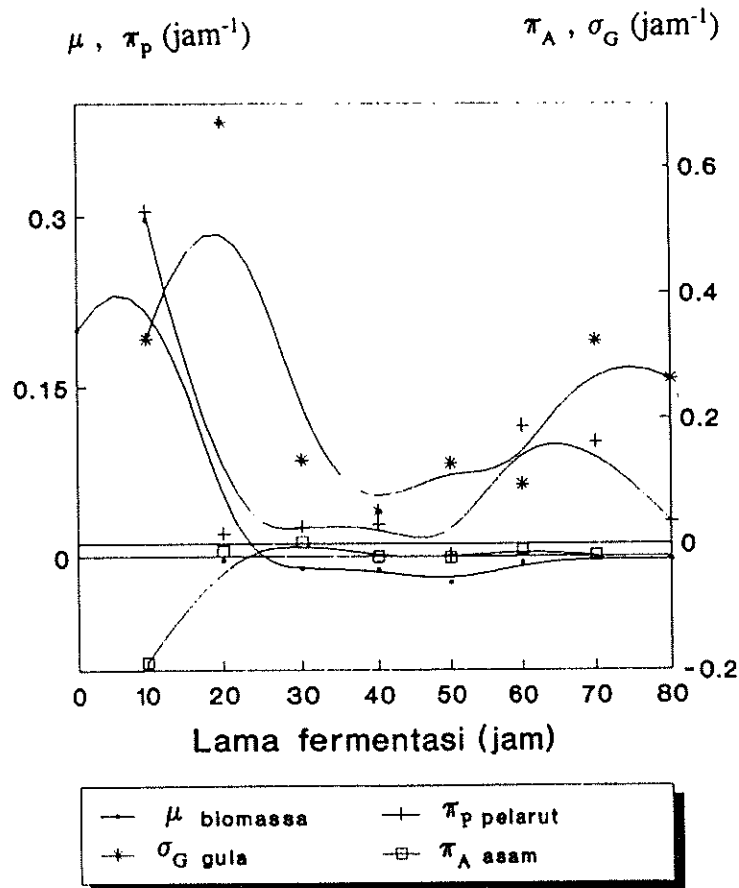
Menurut Fond *et al.*, (1986) fase solventogenik terjadi apabila kadar asam dalam medium fermentasi berada antara 4 - 5 g/l, tetapi Monot dan Enggasser (1983) menyatakan bahwa apabila kadar asam telah mencapai 0.5 - 1.5

g/l telah berakibat buruk pada pertumbuhan *C. acetobutylicum*. Menurut Martin dan Petitdamange (1984) bahwa penambahan jumlah asam asetat dan butirrat dapat mempercepat fase pembentukan pelarut.

Fenomena lain yang menarik pada fermentasi ABE dengan hidrolisat TKKS adalah perbandingan antara butanol, aseton dan etanol adalah 6.73 : 1 : 2.12 tidak mengikuti pola umum yang selama ini terjadi pada substrat pati, limbah industri keju yaitu 6 : 3 : 1. Hal ini menurut Crueger dan Crueger (1984) diakibatkan oleh perbedaan sumber karbon yang digunakan.

Laju spesifik penggunaan gula maksimum ( $\sigma_G$ ) terjadi pada jam ke 10 yaitu 1.419 g gula/g biomassa.jam. Laju spesifik penggunaan gula ( $\sigma_G$ ) menurun pada jam ke 30 yaitu 0.028 g gula/g biomassa.jam dan meningkat kembali sebesar 0.860 g gula/g biomassa.jam pada jam ke 60. Pada Gambar 19 disajikan grafik perubahan parameter kinetika fermentasi yang meliputi laju spesifik pertumbuhan, laju spesifik penggunaan gula, laju spesifik pembentukan pelarut dan asam.

Pada Gambar 19 dapat dilihat bahwa laju spesifik pembentukan pelarut setelah tahap asidogenik akan mengikuti pola penggunaan gula dimana pada saat laju penggunaan gula meningkat maka laju pembentukan pelarut juga meningkat. Kejadian ini memberikan dugaan bahwa gula selain digunakan untuk pertumbuhan juga digunakan untuk aktivitas sel dan kerja enzim yang berperan dalam pembentukan pelarut. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) terjadi pada jam ke 20 yaitu 0.263 g pelarut/g biomassa.jam, sedangkan laju pembentukan asam maksimum ( $\pi_A$ ) terjadi pada jam ke 10 yaitu 0.231 g asam/g biomassa.jam.

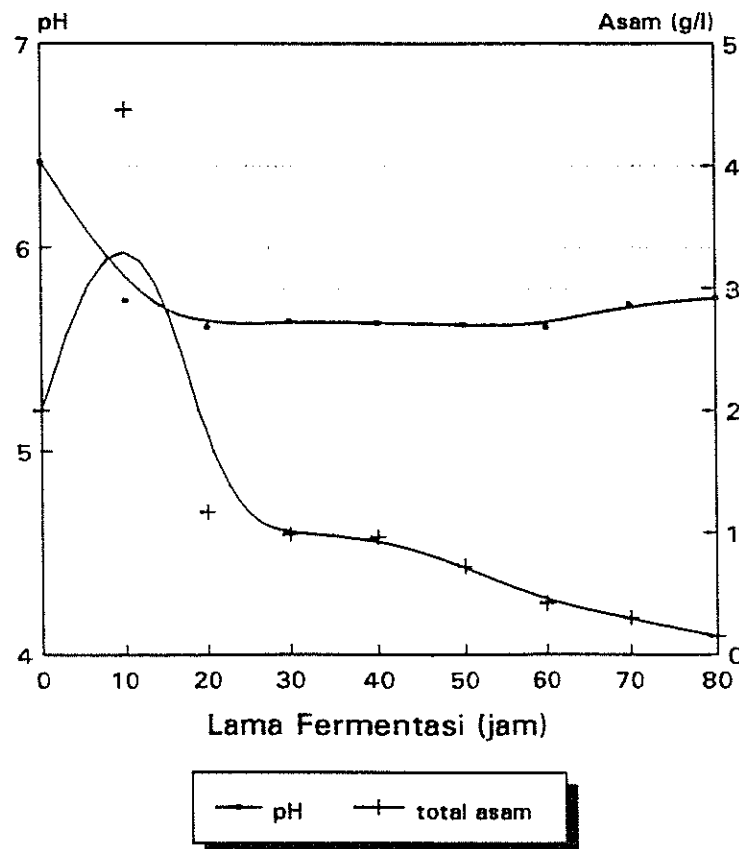


Gambar 19. Grafik perubahan parameter kinetika selama fermentasi ABE dengan kadar gula awal 60 g/l.

### 3. Fermentasi Dengan Kadar Gula 80 g/l

Pada fermentasi ketiga, kadar gula awal yang digunakan adalah 80 g/l gula pereduksi. Secara umum hasil yang diperoleh pada fermentasi ketiga jauh lebih buruk dibandingkan dengan fermentasi dengan kadar gula awal 44 g/l dan fermentasi dengan kadar gula awal 60 g/l. Hal ini diduga karena adanya

sejumlah zat-zat pengotor (produk terdekomposisi) dalam medium fermentasi karena lamanya proses pemekatan gula. Fengel dan Wegener (1989) menyatakan bahwa hidrolisis selulosa akan menghasilkan gula pentosa dan hexosa yang dapat difermentasi dan produk terdekomposisi yang meliputi asam-asam heksuronat dan asam-asam glukoronat. Pada Gambar 20 disajikan grafik hubungan antara nilai pH dan total asam yang dihasilkan selama proses fermentasi.



Gambar 20. Grafik hubungan antara nilai pH dan jumlah asam selama proses fermentasi ABE dengan kadar gula awal 80 g/l.

Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) adalah  $0.297 \text{ jam}^{-1}$ . Sel mengalami lisis yang ditandai dengan laju pertumbuhan spesifik yang negatif setelah jam ke 25. Total pelarut yang dihasilkan adalah  $9.4 \text{ g/l}$  atau 18.8 persen didasarkan pada gula yang dikonsumsi. Jumlah asam maksimal yang dihasilkan adalah  $4.46 \text{ g/l}$  pada jam ke 10. Adanya sejumlah asam mengakibatkan perubahan pH medium dari 6.62 menjadi 5.73.

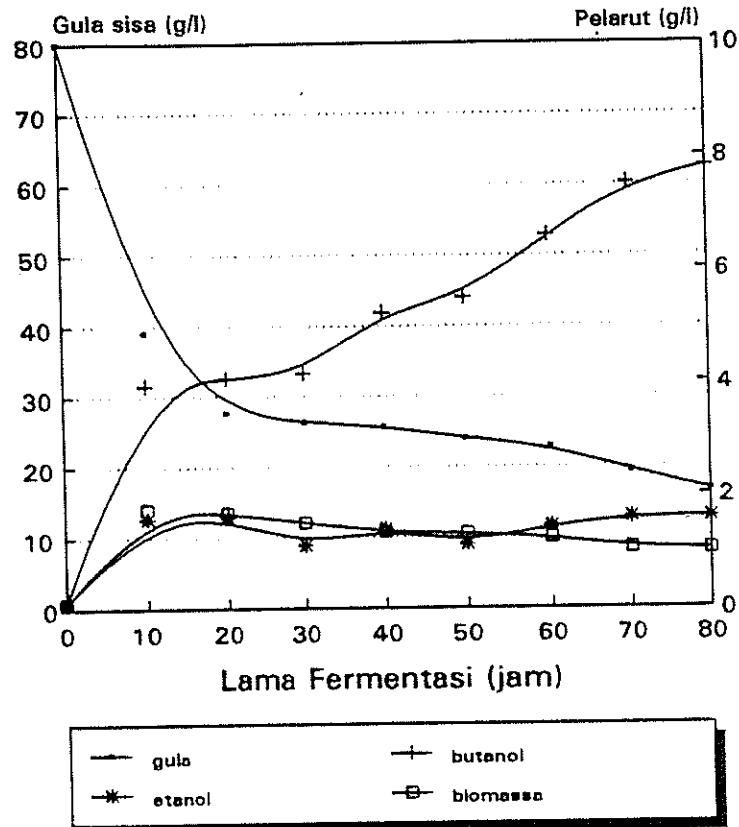
Pada fermentasi dengan kadar gula awal  $80 \text{ g/l}$  aseton dan asetat tidak dihasilkan (tidak terdeteksi). Inaktifnya enzim *CoA transferase* yang mengubah aseto asetil CoA menjadi aseto asetat berakibat aseton tidak terbentuk. Aseton dan butanol menurut Gottschalk dan Gruppe (1992), walaupun terbentuk dalam satu jalur namun salah satu enzim inaktif mengakibatkan adanya produk antara yang tidak diproduksi.

Perubahan nilai pH pada medium fermentasi dengan kadar gula awal  $80 \text{ g/l}$  dari nilai pH terendah 5.61 menjadi 5.75 mengindikasikan terbentuknya sejumlah pelarut, disebabkan pengurangan asam yang dihasilkan. Pada fermentasi ke dua terjadi perubahan nilai pH dari 5.10 menjadi 5.38. Hal ini tidak dijumpai pada fermentasi ke satu sehingga jumlah pelarut (*yield*) yang dihasilkan rendah.

Pada Gambar 21 disajikan grafik hubungan antara kadar gula, jumlah pelarut dan jumlah biomassa yang dihasilkan. Gula yang dikonsumsi adalah  $63.31 \text{ g/l}$ . Biomassa maksimum dihasilkan pada jam ke 10 yaitu  $1.76 \text{ g/l}$ . Produksi pelarut yang dicapai adalah 18.8 persen didasarkan atas gula yang dikonsumsi. Rendahnya bobot kering sel yang dihasilkan disebabkan oleh adanya sejumlah zat pengotor (produk terdekomposisi dari gula). Jumlah biomassa yang ada seharusnya lebih tinggi pada fermentasi kedua mengingat



asam yang dihasilkan sangat sedikit. Jumlah asam yang ada belum sampai pada taraf menghambat pertumbuhan sel yaitu 4.16 g/l (Fond *et al.*, 1992).

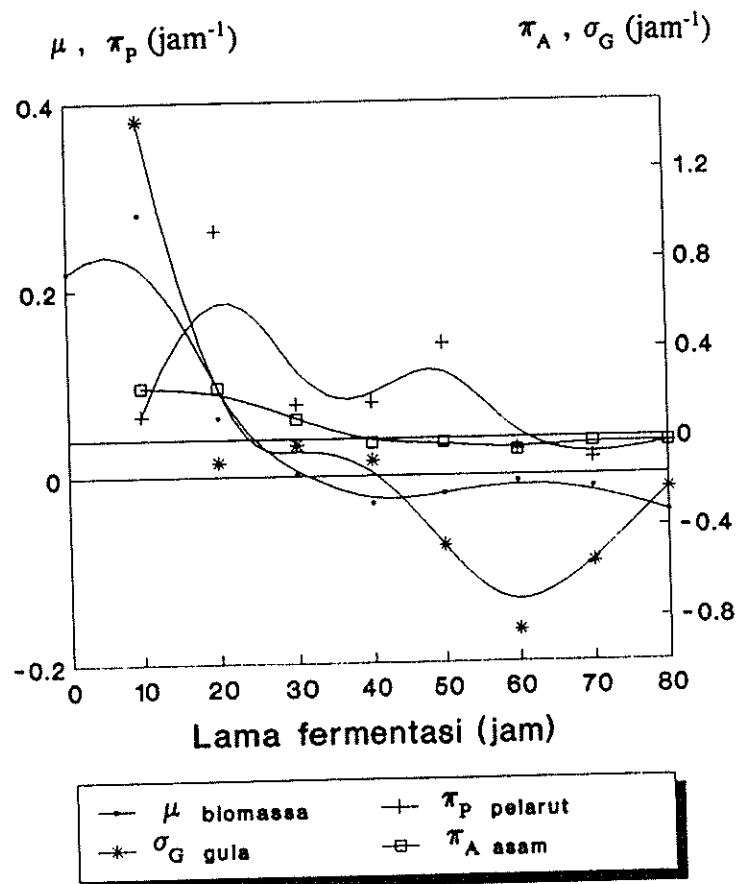


Gambar 21. Grafik hubungan kadar gula, jumlah pelarut dan biomassa selama proses fermentasi ABE dengan kadar gula awal 80 g/l.

Laju spesifik penggunaan gula, laju spesifik pertumbuhan sel, pembentukan pelarut dan asam disajikan pada Gambar 22. Laju pembentukan pelarut cenderung berubah-ubah, tidak mengikuti suatu pola tertentu. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum  $\pi_p$  pada jam ke 10 dan jam ke 60 yaitu sebesar 0.305 dan 0.115 g pelarut/g biomassa.jam. Laju spesifik penggunaan gula

maksimum  $\sigma_G$  yaitu sebesar 2.326 g gula/g biomassa.jam terjadi pada jam ke 10. Sedangkan laju spesifik pembentukan asam maksimum  $\pi_A$  adalah 0.002 g asam/g biomassa.jam terjadi pada jam ke 30.

Pada fermentasi ABE selain dihasilkan sejumlah asam dan pelarut juga dihasilkan gas  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2$  yang menandakan bahwa *C. acetobutylicum* P 262 dapat tumbuh baik pada medium TKKS. Berbagai kendala perlu dipecahkan untuk mengoptimalkan penggunaan gula TKKS, sehingga pelarut yang dihasilkan menjadi lebih tinggi mengingat sisa asam yang ada pada medium fermentasi masih sangat tinggi.



Gambar 22. Grafik perubahan parameter kinetika fermentasi ABE dengan kadar gula awal 80 g/l.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Hidrolisis tandan kosong kelapa sawit menghasilkan gula sederhana yang dapat difermentasi untuk produksi aseton, butanol dan etanol oleh *Clostridium acetobutylicum* P 262. Hidrolisis dengan perlakuan delignifikasi NaOH 1 N dilanjutkan dengan otoklaf 121°C selama 15 menit memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan tanpa perlakuan otoklaf. Hidrolisis tanpa perlakuan otoklaf menghasilkan kadar gula tertinggi 2.59 g/l dengan tingkat sakarifikasi 17.60 persen. Hidrolisis dengan perlakuan otoklaf menghasilkan kadar gula 3.50 g/l dengan tingkat sakarifikasi 23.80 persen. Hidrolisis TKKS dengan perlakuan otoklaf dan penambahan enzim dua kali lipat (enzim selulase 2 persen dan selobiose 0.4 persen) mengakibatkan kadar gula pereduksi yang dihasilkan mengalami peningkatan menjadi sebesar 7.50 g/l. Tingkat sakarifikasi yang berhasil dicapai adalah 50.97 persen.

Penggunaan hidrolisat TKKS untuk fermentasi ABE dengan menggunakan kadar gula awal 40 g/l memberikan total pelarut sebanyak 5.79 g/l atau  $Yield = 0.165$  didasarkan pada gula yang dikonsumsi. Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) pada fermentasi kadar gula awal 40 g/l adalah 0.041 jam<sup>-1</sup> dengan total asam yang dihasilkan 11.92 g/l. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah 0.132 g pelarut/ g biomassa.jam.

Fermentasi ABE dengan menggunakan kadar gula awal 60 g/l memberikan total pelarut tertinggi sebanyak 14.23 g/l dengan  $Yield = 0.272$  didasarkan atas gula yang dikonsumsi. Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) pada fermentasi kadar gula awal 60 g/l adalah 0.281 jam<sup>-1</sup>. Total asam yang dihasilkan

adalah 13.73 g/l. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah 0.263 g pelarut/g biomassa.jam.

Fermentasi ABE dengan menggunakan kadar gula awal 80 g/l memberikan total pelarut sebanyak 9.40 g/l atau  $Yield = 0.188$  didasarkan atas gula yang dikonsumsi. Laju spesifik pertumbuhan maksimum ( $\mu_{maks}$ ) adalah 0.297 jam<sup>-1</sup>. Laju spesifik pembentukan pelarut maksimum ( $\pi_p$ ) adalah 0.305 g pelarut/ g biomassa.jam.

## B. SARAN

Kadar gula yang dihasilkan selama proses hidrolisis masih sangat rendah. Pencarian metoda hidrolisis yang tepat untuk mendapatkan kadar gula yang tinggi secara biokonversi perlu terus dilakukan agar proses fermentasi dapat layak secara ekonomis.

Penelitian fermentasi aseton-butanol-etanol dari hidrolisat tandan kosong kelapa sawit perlu dikaji secara lebih lanjut mengingat sisa asam yang dihasilkan pada medium fermentasi masih sangat tinggi. Hidrolisis dengan menggunakan enzim yang diisolasi dari mikroorganisme yang tumbuh pada TKKS perlu diteliti, untuk memperoleh kadar gula pada hidrolisat yang lebih tinggi.







- Enari, T.M. 1983. *Microbial Cellulose di dalam* W.F. Fogarty (ed.). 1983 *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publ. New York. *Di dalam* Judoamidjojo, M., L. Hartoto dan E. Gumbira-Sa'id. 1987. *Biokonversi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ennis, B.M. and I.S. Maddox. 1987. The effect of pH and Lactose concentrations on Solvent Productions from Whey Permeate Using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol and Bioeng.* 29:329-334 John Wiley & Sons, New York.
- Fajarini, K. 1991: Hidrolisis Enzimatik Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Perlakuan Pendahuluan Perendaman Dalam Larutan Bessi (III) Natrium Tartrat . Skripsi. FATETA IPB, Bogor.
- Fardiaz, S. 1982. *Mikrobiologi Pangan*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fengel, D. dan Wegener, G. 1989. *Wood Chemistry Ultra Structure Reactions*. Walter De Grueter. Berlin, New York.
- Fond, O., J.M. Enggasser, G.M. El Mouri-El-Amouri, G. & H. Petitdemange. 1986. The Acetone Butanol Fermentation On Glucose dan Xylose. I. Regulation and Kinetics in Fed-Batch Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVIII, Pp. 160-166 (1986). John Wiley and Sons, Inc.
- Fond, O., J.M. Enggasser, G.M. El Mouri-El-Amouri, G. & H. Petitdemange. 1986. The Acetone Butanol Fermentation On Glucose dan Xylose. II. Regulation and Kinetics in Fed Batch Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVIII, Pp. 167-175 (1986). John Wiley and Sons, Inc.
- Gaden, E. L. 1972. Fermentations Process Kinetics. *Biochemical. Microbiology. Tech. Eng.* 1: 413-429.
- Gharpuray, M.M., L.T. Fan dan Yong-Hyun Lee. 1982. Caustic Pretreatment Study for Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw. *Di dalam* Soltes. 1983. *Wood and Agricultural Residus*. Academic Press. New York.
- Gottschalk, G. & H. Grupe. 1992. Physiological Improvements in Aceton-Butanol Fermentation. *American Chemical Society.* 102-115.
- Gumbira-Sa'id, E. 1994a. Pemanfaatan Limbah Agroindustri Untuk Produksi Aseton-Butanol-Etanol. *Majalah Agrotek* 2(1) : 47 - 53, IPB, Bogor.
- Gumbira-Sa'id, E. 1994b. Panduan Kerja Visual untuk Bioproses dan Bioreaktor. *Laboratorium Bioindustri, Jurusan TIN - FATETA IPB, Bogor.*
- Gumbira-Sa'id, E. 1994c. Penanganan dan Pemanfaatan Limbah Padat Industri Kelapa sawit. *Badan Kerja Sama Pusat Studi Lingkungan, Riset Unggulan Terpadu (RUT I 93/94), Bogor.*



- Gumbira-Sa'id, E., D. Mangunwidjaja, E. Subakti, B. Kusarpoko dan S. Nurcahyo. 1994a. Teknik Pengembangan Fermentasi Anaerobik. Jurusan Teknologi Industr Pertanian, FATETA IPB, Bogor.
- Gutierrez, N. A and I.S. Maddox. 1987. Role of Chemotaxis in Solvent Productions by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. and Environ. Microbiology. 1924-1927. American Society for Microbiology, US.
- Hadikusuma, U. 1994. Kajian Awal Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol dari Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit Pada Kultur Curah. Skripsi. FATETA IPB, Bogor.
- Haggstrom, L. and N. Molin. 1983. Calcium Alginate Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum* for Solvent Productions. Biotechnology Letters 2: 241-246.
- Haigler, C.H. 1985. The Functions and Biogenesis of Native Cellulose. *di dalam* Nevel dan Zeronian, S.H. (eds.) Cellulose Chemistry and Its Applications. Ellis Harwood United, Chicester.
- Hartley, C.W.S. 1967. The Oil Palm. Longman Group Limited, London.
- Hastings, J.J.H. 1978. In "Enconomic Microbiology" Vol 2. "Primary Products of Metabolism" pp: 31-45 eds. *Di dalam* Calam, C.T. 1983. Isolation of *Clostridium acetobutylicum* Strains Producing Butanol And Acetone. Biotechnology Letters 2: 111-116
- Higgins, I.J., D.J. Best & J. Jones. 1992. Biotechnology Priciples and Its Applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Janes. R.L. 1969. the Chemistryof Wood and Fibers. *di Dalam* Mc Donald (ed.) Pulp and Paper Manufacture. Vol. 1. Mc Graw Hill Book Co., New York.
- Juanbaro, J. and L Puigjaner. 1986. Saccharifications of Concentrated Brewing Bagasse Slurries With Dilute Sulfuric Acid for Producing Aceetone butanol by *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology and Bioengineering Vol. XXVIII pp. 1544-1554. John Wiley and Son, Inc. New York.
- Judoamidjojo, M., L. Hartoto & E. Gumbira-Sa'id. 1987. Biokonversi. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kanchanatawee, S. & I.S. Maddox. 1985. The effect of Selected Nutrients on Solvent Productions by *Clostridium acetobutylicum*. Biotech. Dept. Publ., Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Linden, J.C., A.R. Moreira and T.G. Lenz. 1991. Acetone and Butanol. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol:28-29.
- Lubis, A. 1992. Kelapa sawit di Indonesia. Pusat Penelitian Perkebunan Marihat, Pematang Siantar.



- Maddox, I.S and E. Murray. 1983. Productions of n-Butanol by Fermentations of Wood Hydrolysate. *Biotechnology Letters* 5: 175-178.
- Martin, J.R. dan H. Petitdemange, 1984. Effect of Acetic Acid and Butyric Acid on Solvent Productions by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* 5 : 89 - 94. *di Dalam* Bu'lock, J.D. dan Bu'lock, A.J. 1984 The Acetone-Butanol Fermentation and Related Topics. Science and Technology Letters, London.
- MCCuthen, W.N. and Hickey, R.J. (1954) in "Industrial Fermentation" *Di dalam* Calam, C.T. 1983. Isolation of *Clostridium acetobutylicum* Strains Producing Butanol And Acetone. *Biotechnology Letters* 2: 111-116
- Mes-Hartree, M. and J.N. Saddler 1983. Butanol Productions of *Clostridium acetobutylicum* grown on Sugars found in Hemicellulose Hydrolysate. *Biotechnology Letters* 4: 247-252.
- Mikosari, 1990. Optimasi Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Menggunakan Asam Sulfat Encer. Skripsi, FATETA IPB, Bogor.
- Monot, F. and J. M. Enggasser. 1983. Productions of Acetone And Butanol by Batch and Continous Culture of *Clostridium acetobutylicum* Unde Nitrogen Limitation. *Biotechnology Letters* 5: 213-218.
- Montenecourt, B.S & D.E. Eveleigh. 1979. *Di dalam* W.F. Fogarty (ed.). 1983 *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publ. New York. *Di dalam* Judoamidjojo, M., L. Hartoto & E. Gumbira-Sa'id. 1987. Biokonversi. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Murdiyatmo, U. 1985. Pra perlakuan Pith dengan Natrium Hidroksida (NaOH) dan Konevrsinya menjadi gula reduksi oleh Enzim selulase. *Di dalam* Darnoko. 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa kelapa Sawit melalui biokonversi. *Berita Perkebunan* 2:85-97.
- Nevel, T.P. & S.H. Zeronian. 1985. *Cellulose Chemistry and Its Applications*. Ellis Harwood United, Chicester.
- Okazaki dan M. Moo-Yong. 1978. Chemical and Enzyme Pretreatment of Corn Stover to Produce Soluble Fermentations Substrate. *Biotechnology and Bioengineering* Vol XV : 362-368. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Parisi, F. 1989. Advances in Lignocellulosics Hydrolysis and in the Utilization of Hydrolyzates. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Vol 38:54 - 63. Springer, Verlag, Berlin dan Heidelberg.
- Paturau, J.M. 1989. *By-Product of The Cane Sugars Industry*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Pratiwi, W., A. Oskari & S.P. Rahdi. 1988. Pembuatan Pulp Kertas dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Proses Antrakinson. *Menara Perkebunan*. 6(2):49-52.



- Reese, E.T., R.G.H. Siu & H.S. Levinson. 1950. *Di dalam* W.F. Fogarty (ed.). 1983 *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publ. New York. *Di dalam* Judoamidjojo, M., L. Hartoto & E. Gumbira-Sa'id. 1987. *Biokonversi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ross, J.W., J.K. McLaughlin dan E.T. Papoutsakis. 1984. The Effect of pH on Nitrogen Supply, Cell lysis and Solvent Production in Fermentations of *Clostridium acetobutylicum* *Biotechnology and Bioengineering* 27 : 681 - 694. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Sasaran. 1994. *Potensi Ekspor Minyak Kelapa Sawit dan Produk Olahannya*, Jakarta.
- Sivalingan. 1983. Problem in Palm Oil Waste Treatment. Regional Symposium in Plantations Environment, Medan.
- Shah, M.M., S.K. Song, Y.Y. Lee and Robert Torget. 1991. Effect of Pretreatment on Simultaneous Saccharifications and Fermentations of Hardwood into Acetone-Butanol. *Applied Biochemistry and Biotech.* Vol 28-29 : 99 - 109.
- Soni, B., K. Das and T.K. Ghose. 1983. Bionconversion of Agro-Wastes Into Aceton-Butanol. *Biotechnology Letters* 4: 19-22.
- Spivey, M. J. 1978. *Process Biochemistry*, 13 (11) 2-4, 13 *Di dalam* Calam, C.T. 1983. Isolation of *Clostridium acetobutylicum* Strains Producing Butanol And Acetone. *Biotechnology Letters* 2: 111-116.
- Thomson, R.N. 1991. Quantifications of the End Product of the Acetone-Butanol - Ethanol Fermentations by Gas Chromatography. *Enzyme Microbiology Technol* 13 : 722 - 726.
- Tjokroadikoesoemo, P.S. 1986. *HFS dan Ubi Kayu*. Gramedia, Jakarta.
- Tsao, G.T., M. Ladisch, C. Ladish, T.A. Hsu, B. Dale & T. Chou. 1978. Fermentations Substrates from Cellulosic Material: Productions of Fermentable sugar from Cellulose Material. *Annual Report on Fermentations Processes* 2:1-21.
- Walton, M.T. dan J.L. Martin. 1979. Productions of Butanol-Acetone by Fermentation. *J. Microbiology Technology* Vol 2 : 187 - 209. Academic Press Inc. New York.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humprey, and M. D. Lily. 1984. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley and Sons., Inc. New York.
- Wibowo, E. 1994. *Kajian Awal Produksi Aseton-Butanol-Etanol dari Substrat Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (Elaeis guineensis JACQ) Menggunakan Bioreaktor Unggun Diam*. Skripsi. FATETA IPB, Bogor.
- Yu, E.C.K. and J.N. Saddler. 1983. Power Solvent Productions *Kleibseilla pneumoniae* Grown on Sugars Present in Wood Hemicellulose. *Biotechnolgy Let-*





## Alat

Tabung reaksi  
 Tabung reaksi berulir  
 Kuvet  
 Spektrofotometer  
 Otoklaf  
 Refrigerator  
 Gelas piala  
 Pompa Vakum  
 Tabung gas nitrogen  
 Tabung gas elpiji  
 Bioreaktor  
 Selang silikon  
 Penyaring gas  
 Buret  
 Penangas air  
*Clean bench*  
 Bioreaktor baja tahan karat 20 liter  
 Bioreaktor baja tahan karat 2 liter  
 Neraca analisa  
 Kertas saring  
 Sentrifusi  
 Karet penghisap  
 Kotak inokulasi anaerobik  
 Jarum ose  
 Tabung kawat tembaga  
 Bunsen  
*Injektor* 1 ml, 2 ml, 5 ml dan 10 ml  
 Jar anaerobik  
 Inkubator anaerobik  
 Penangas air  
 Enzim selulase dan selobiase



## Lampiran 2. Prosedur Analisis Gula Pereduksi (Miller, 1959).

Kadar Gula pereduksi sisa hidrolisat tandan kosong kelapa sawit dianalisa dengan menggunakan metoda *Dinitro Salsilic Acid* (DNS) dan digunakan untuk menentukan kadar gula sebelum fermentasi.

### a. Penyiapan Pereaksi Dinitro Salsilic Acid (DNS).

Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 10.6 g asam 3,5 dinitrosalisilat dengan 19.8 g NaOH ke dalam 1416 ml air. Setelah itu ditambahkan 306 g Na-K tartrat, 7.6 g fenol yang dicairkan pada suhu 50°C dan 8.3 g Na-*metabisulfit*. Larutan yang ada diaduk secara merata. Setelah itu tiga ml larutan DNS yang ada dititrasi dengan menggunakan HCl 0.1 N. Titrasi diduga membutuhkan 5 - 6 ml HCl 0.1 N. Jika kurang dari nilai tersebut, harus ditambahkan 2 g NaOH untuk setiap kekurangan 0.1 ml HCl 0.1 N.

### b. Penyiapan Contoh

Untuk menentukan kadar gula sisa hidrolisat (glukosa dan xylosa) tandan kosong kelapa sawit, contoh yang akan dianalisa harus berupa cairan jernih. Contoh dalam bentuk cair dibuat netral atau basa dengan penambahan  $\text{CaCO}_3$ . Penambahan tersebut bertujuan untuk menghilangkan asam agar tidak menghidrolisa gula sewaktu pemanasan. Pemucatan dilakukan dengan menggunakan arang aktif 2.5 persen selama 15 menit pada suhu 80 - 90°C. Larutan disaring dan diambil yang berwarna jernih. Untuk menghilangkan zat warna seperti pigmen dan koloid, maka ke dalam contoh ditambahkan Pb-asetat setengah basa. Kelebihan Pb-asetat dihilangkan dengan menggunakan natrium atau kalium oksalat dan fosfat. Penambahan Pb-asetat sedikit demi sedikit sampai larutan menjadi jernih. Volume labu takar ditepatkan sampai tera.



### Lampiran 3. Prosedur Analisa Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa

#### 1. Kadar Lignin dan Selulosa Sisaan (Goering dan Van Soest, 1970).

##### A. Pereksi A

##### (1) Larutan Kalium Permanganat Jenuh:

Kalium permanganat	50.00 g
Perak sulfat	0.05 g
Air Suling	1000.00 ml

Kalium permanganat dan perak sulfat dilarutkan dalam air dan dijauhkan dari sinar matahari.

##### (2) Larutan Bufer Lignin

Besi (III) nitrat nonahidrat	6.00 g
Perak nitrat	0.15 g
Asam asetat glasial	500.00 ml
Kalium asetat	5.00 g
Butil alkohol tertier	400.00 ml
Air Suling	100.00 ml

Besi (II) nitrat dan perak nitrat dilarutkan dalam air, kemudian dicampur dengan asam asetat dan kalium asetat, ditambah butil alkohol kemudian diaduk. Pada saat akan dipakai larutan (1) dan larutan (2) dengan perbandingan 2 : 1 (v/v) dicampur, kemudian disimpan dalam lemari es maksimum seminggu tanpa ada cahaya. Larutan dapat dipakai jika berwarna ungu dan tidak terdapat endapan pada pereaksi B.

## B. Pereaksi B

Asam oksalat dihidrat	50.00 g
Etanol 95 %	700.00 ml
HCl Pekat (12N)	50.00 ml
Air Suling	250.00 ml

Asam oksalat dilarutkan dalam etanol kemudian ditambahkan asam klorida dan air.

## C. Prosedur Kerja

Contoh yang berukuran 20 - 30 mesh sebanyak 1.0 g (S) disiapkan dan dilakukan analisa ADF ( $W_1$ ), lalu ditempatkan dalam cawan gooch pada talam yang berisi air suling setinggi 1 cm (serat tidak basah). Sebanyak 25 ml pereaksi A ditambahkan. Ke dalam talam ditambahkan air sampai 2 - 3 cm dan dididuk, lalu dibiarkan selama 90 menit. Jika perlu penambahan pereaksi A sampai berwarna ungu. Dilakukan penyaringan vakum dimana cawan gooch ditempatkan dalam talam yang bersih. Kedalam cawan gooch ditambahkan pereaksi B sampai setengahnya dan setelah 5 menit dilakukan penyaringan sampai serat berwarna putih. Cawan gooch dicuci dengan etanol 80% , disaring (diulangi 2 kali) , lalu dicuci kembali dengan aseton dengan cara yang sama. Padatan yang tersisa dikeringkan pada suhu 100°C selama satu hari dan ditimbang pada saat bobot konstan ( $W_2$ ).

$$\text{Kadar lignin} = \frac{W_1 - W_2}{(S)} \times 100 \%$$

Setelah dilakukan pengabuan pada suhu 500°C selama 3 jam, didinginkan dan ditimbang ( $W_3$ ) pada saat bobot konstan.

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{W_1 - W_3}{(S)} \times 100 \%$$

## 2. Kadar Hemiselulosa Sisaan (Goering dan Van Soest, 1970).

### A. Pembuatan Pereaksi

#### (1) Pereaksi NDF

Natrium dedosil sulfat	30.00 g
EDTA	18.61 g
Natrium borat dekahidrat	6.81 g
Dinatrium hidrogen fospat	4.56 g
Etilen glikol monoetil eter	10.00 ml
Air suling	1000.00 ml

EDTA dan natrium borat dekahidrat dimasukkan dalam *breaker*, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan sampai larut. Larutan yang dihasilkan ditambahkan ke SDS dan etilen glikol monoetil eter. Dinatrium hidrogen fospat dimasukkan ke dalam *breaker* dan dipanaskan sampai larut. Setelah itu dicampur dengan larutan sebelumnya sampai pH 6.9 - 7.1.

#### (2) Pereaksi ADF

Asam Sulfat	49.04 g
Setil trimetilamonium bromida	20.00 g
Air suling	1000.00 ml

Larutan asam sulfat dibuat dengan cara titrasi pembakuan normalitas (1N). Setelah itu ditambahkan dengan setil trimetilamonium bromida.

## B. Prosedur Kerja

Kadar hemiselulosa dihitung berdasarkan perbedaan antara NDF - ADF.

### (1) Serat Detergen Netral (NDF)

Contoh kering berukuran 20 - 30 mesh sebanyak 0.5 - 1.0 gram didalam labu refluks dan ditambah 100 ml pereaksi NDF, 2 ml dekahidronaphtalena dan 0.5 g natrium sulfit. Kemudian dididihkan selama 5 - 10 menit, dan direfluks selama 60 menit. Setelah itu disaring dengan cawan gooch (telah diketahui bobotnya) secara vakum. Contoh dicuci dengan air panas dengan cara menuangkan air panas kedalam cawan gooch lalu disaring kembali (diulang beberapa kali). Terakhir dicuci dengan aseton sebanyak dua kali dan disaring kembali. Cawan gooch kemudian dikeringkan pada suhu 100°C selama satu malam.

$$\text{NDF} = \frac{W_1 - W_3}{(S)} \times 100 \%$$

Dimana :

$W_1$  = bobot cawan gooch isi

$W_0$  = bobot cawan gooch kosong

$S$  = bobot contoh kering

### (2) Serat Detergen Asam (ADF)

Contoh kering berukuran 20 - 30 mesh ditimbang sebanyak 1.0 g didalam labu refluks dan ditambah 100 ml pereaksi ADF dan 2 ml dekahi-



dronaptalena, kemudian dididihkan 5 - 10 menit. Setelah mendidih direfluks selama 60 menit dan disaring dengan cawan gooch (telah diketahui bobotnya) secara vakum. Contoh didalam di dalam labu dicuci dengan air panas dan disaring kembali. Terakhir dicuci denganm aseton sampai filtrat tidak berwarna. Bila perlu dilakukan pencucian dengan heksan. Cawan gooch dikeringkan pada suhu 100°C selama satu malam sampai berat konstan dan ditimbang.

$$\text{ADF} = \frac{W_1 - W_0}{(S)} \times 100 \%$$

Lampiran 4. Hasil Perhitungan Kadar Gula Hidrolisis TKKS dengan menggunakan Bioreaktor Hidrolisis Volume 20 Liter.

Hidrolisis Kesatu

Perlakuan : tanpa *swelling*  
 Volume : 17 000 ml  
 TKKS : 3 persen  
 Enzim : Selulase 1 persen (v/b)  
           Selobiase 0.2 persen (v/b)

waktu (jam)	kadar gula (g/l)
0	0.08
6	0.98
12	1.46
18	1.46
24	1.49
30	1.64
36	1.69
42	1.71
48	1.86
54	1.99
60	1.99
66	2.36
72	2.59

Hidrolisis Kedua

Perlakuan : *swelling*  
 Volume : 17 000 ml  
 TKKS : 3 persen  
 Enzim : Selulase 1 persen (v/b)  
           Selobiase 0.2 persen (v/b)

waktu (jam)	kadar gula (g/l)
0	1.03
6	1.32
12	1.02
18	1.09
24	1.12
30	1.17
36	1.34
42	2.08
48	2.54
54	3.04
60	3.31
66	3.31
72	3.50



### Hidrolisis Ketiga

Perlakuan : *swelling*  
 Volume : 17 000 ml  
 TKKS : 3 persen  
 Enzim : Selulase 2 persen (v/b)  
           Selobiase 0.4 persen (v/b)

waktu (jam)	kadar gula (g/l)
0	0.00
6	2.14
12	2.65
18	3.29
24	3.47
30	3.82
36	4.22
42	4.68
48	4.76
54	4.99
60	5.41
66	6.13
72	7.29

Lampiran 5. Data Hasil Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol Dari Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa sawit. *PHD*

Fermentasi dengan kadar gula : 44 g/l  
 pH awal : 6.62

Waktu (jam)	pH	Biomassa (g/l)	Gula (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Total pelarut	Asetat (g/l)	Butirat (g/l)	Total Asam
0	6.45	0.40	44.34	0.0	0.42	0.33	0.75	3.08	3.02	6.10
10	6.14	0.60	26.52	0.14	0.72	0.40	1.36	5.53	7.07	12.60
20	5.83	0.84	24.67	0.25	1.20	0.45	1.94	3.31	8.82	12.13
30	5.57	0.89	22.93	0.26	1.44	0.49	2.19	3.03	7.14	10.17
40	5.47	1.33	16.17	0.92	2.95	0.58	4.45	3.61	8.92	12.53
50	5.49	1.42	16.06	0.51	3.38	0.82	4.71	6.34	8.79	15.13
60	5.50	1.52	15.56	0.42	3.69	0.61	4.72	4.07	8.76	12.83
70	5.50	1.11	14.93	0.61	3.84	0.55	5.00	4.42	8.22	12.64
80	5.50	0.99	14.08	0.72	4.12	0.95	5.79	3.80	8.12	11.92

Fermentasi dengan kadar gula : 60 g/l  
 pH awal : 6.78

Waktu (jam)	pH	Biomassa (g/l)	Gula (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Total pelarut	Asetat (g/l)	Butirat (g/l)	Total Asam
0	6.78	0.08	60.00	0.0	0.76	0.00	0.76	3.15	1.63	4.78
10	5.83	1.34	40.90	0.00	0.76	0.87	1.63	4.21	3.67	7.88
20	5.23	1.51	38.30	0.00	7.15	1.07	8.22	7.89	5.74	13.63
30	5.23	2.54	37.60	0.00	9.50	1.37	10.87	5.93	9.88	15.81
40	5.10	1.89	35.70	0.29	10.10	2.24	12.63	5.53	9.86	15.39
50	5.34	1.54	28.30	1.46	9.93	3.06	14.45	6.12	10.53	16.65
60	5.32	1.43	16.00	1.36	9.38	2.90	13.63	5.27	9.95	15.22
70	5.41	1.24	9.60	1.39	9.08	2.93	13.40	4.66	9.28	13.94
80	5.38	0.81	7.20	1.93	9.35	2.95	14.23	4.97	8.76	13.73

Fermentasi dengan kadar Gula : 80 g/l

pH awal : 6.42

Waktu (jam)	pH	Biomassa (g/l)	Gula (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Total pelarut	Butirat (g/l)	Total Asam
0	6.30	0.09	80.00	0.10	0.08	0.90	4.46	4.46
10	5.74	1.76	39.07	3.95	1.59	5.54	1.17	1.17
20	5.61	1.69	27.73	4.07	1.81	5.88	1.88	1.88
30	5.64	1.51	26.40	4.16	1.11	5.27	0.96	0.96
40	5.63	1.34	25.70	5.24	1.40	6.64	0.99	0.99
50	5.62	1.24	24.02	5.51	1.12	6.63	0.19	0.19
60	5.61	1.06	22.84	6.60	1.45	8.05	0.20	0.20
70	5.72	1.03	19.40	7.52	1.60	9.12	0.30	0.30
80	5.75	0.96	16.69	7.80	1.60	9.40	0.00	0.00

## Lampiran 6. Data Parameter Kinetika Fermentasi ABE pada substrat Hidrolisat TKKS

Fermentasi dengan kadar Gula awal : 40 g/l

pH awal : 6.62

waktu (jam)	$\mu$ (jam <sup>-1</sup> )	$\sigma_G$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_P$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_A$ (jam <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-
10	0.041	3.637	0.104	1.327
20	0.034	0.220	0.076	- 0.056
30	0.006	0.196	0.033	- 0.557
40	0.040	0.508	0.132	- 0.478
50	0.006	0.008	0.006	0.128
60	0.008	0.033	0.001	- 0.164
70	- 0.031	0.037	0.037	- 0.019
80	- 0.011	0.012	0.078	- 0.070

Fermentasi dengan Kadar Gula awal : 60 g/l

pH awal : 6.78

waktu (jam)	$\mu$ (jam <sup>-1</sup> )	$\sigma_G$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_P$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_A$ (jam <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-
10	0.281	1.419	0.065	0.231
20	0.063	0.107	0.263	0.229
30	0.001	0.028	0.077	0.086
40	- 0.030	0.101	0.078	- 0.022
50	- 0.020	0.481	0.141	- 0.022
60	- 0.007	0.860	0.027	- 0.058
70	- 0.014	0.556	0.017	- 0.023
80	- 0.041	0.232	0.033	- 0.026



Fermentasi dengan Kadar Gula awal : 80 g/l  
 pH awal : 6.42

waktu (jam)	$\mu$ (jam <sup>-1</sup> )	$\sigma_G$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_P$ (jam <sup>-1</sup> )	$\pi_A$ (jam <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-
10	0.297	2.326	0.305	- 0.188
20	-0.004	0.671	0.020	- 0.012
30	-0.011	0.133	0.026	0.002
40	-0.012	0.052	0.028	- 0.021
50	-0.023	0.128	0.001	- 0.022
60	-0.006	0.095	0.115	- 0.010
70	-0.002	0.323	0.101	- 0.019
80	-0.003	0.263	0.031	