

.....  
*Maka ni' mat Fuhanmu yang manakah yang kamu diutakan  
(Ar-Rahman)*



*Untuk bapak, ibu, dan adik-adikku tercinta.  
Mas Poer, Ihsan, my brothers and sisters fillak  
dan orang-orang yang bersamaku menqauk khazanah ilmu pengetahuan*

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University  
Bogor Indonesia

Perpustakaan IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**KAJIAN AWAL PRODUKSI ASETON - BUTANOL - ETANOL  
SECARA SINAMBUNG DARI SUBSTRAT HIDROLISAT  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guinensis* JACQ.)  
MENGUNAKAN BIOREAKTOR UNGGUN DIAM**



Oleh  
**EDY WIBOWO**  
F 26. 0945



1 9 9 4  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
B O G O R

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**Edy Wibowo, F 26.0945.** Kajian Awal Produksi Aseton Butanol Etanol Secara Sinambung dari Substrat Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guinensis* JACO) Menggunakan Bioreaktor Unggun Diam. Di bawah bimbingan Djumali Mangunwidjaja dan E. Gumbira-Said.

## RINGKASAN

Peningkatan jumlah limbah padat pabrik kelapa sawit menuntut penanganan dan pemanfaatan secara efektif. Salah satu pemanfaatan yang efektif adalah menjadikan tandan kosong kelapa sawit (TKKS) sebagai bahan dasar fermentasi untuk produksi pelarut organik aseton-butanol-etanol (ABE). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses fermentasi ABE dari substrat hidrolisat TKKS dalam bioreaktor ungun diam (*packed bed bioreactor*).

Berdasarkan hasil analisis, TKKS tersusun sebagian besar oleh selulosa (36,26%). dan lignin (24,14 %) . Delignifikasi dengan NaOH 1 N dapat menghilangkan sebagian lignin. Hal ini sangat membantu keefektifan hidrolisis enzimatik. Sebagian besar komponen gula dalam hidrolisat TKKS adalah gula yang dapat difermentasi (*fermentable sugars*), seperti glukosa, xilosa, dan selobiosa.

Fermentasi curah ABE dilaksanakan dengan memanfaatkan aktivitas *C. acetobutylicum* yang bersifat anaerobik obligat. Fermentasi dilaksanakan pada kondisi anaerobik dengan suhu. 34°C selama 60 jam tanpa disertai pengadukan. Substrat fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran hidrolisat TKKS (kadar gula terfermentasi 13,89 g/l) dengan glukosa (7,11 g/l) serta substrat sukrosa (60 g/l). Beberapa parameter kinetika yang diperoleh antara lain laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu$  maks) sebesar 0,2 jam<sup>-1</sup> pada substrat campuran hidrolisat TKKS dengan glukosa dan sebesar 0,08

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.



jam<sup>-1</sup> pada substrat sukrosa. Konsentrasi butanol maksimal yang dihasilkan sebesar 4,4 g/l pada substrat campuran dan 14,68 g/l pada substrat sukrosa. Nilai rendemen (g pelarut/g substrat) yang dihasilkan adalah 0,34 pada substrat campuran dan 0,33 pada substrat sukrosa

Fermentasi sinambung dalam bioreaktor unggun diam menggunakan matriks silika gel dilakukan pada tiga taraf laju dilusi (0,05; 0,10; dan 0,15 jam<sup>-1</sup>). Substrat yang digunakan dalam fermentasi sinambung adalah hidrolisat TKKS dengan penambahan sejumlah kecil glukosa hingga diperoleh kadar gula 40 g/l. Produktivitas fermentasi terbaik adalah sebesar 1,57 g/l jam yang diperoleh pada fermentasi sinambung dengan laju dilusi 0,15 jam<sup>-1</sup>

#### Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



**KAJIAN AWAL PRODUKSI ASETON-BUTANOL-ETANOL  
SECARA SINAMBUNG DARI SUBSTRAT HIDROLISAT  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guinensis* JACQ)  
MENGUNAKAN BIOREAKTOR UNGGUN DIAM**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**  
pada Jurusan TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN,  
Fakultas Teknologi Pertanian,  
Institut Pertanian Bogor

Oleh  
**EDY WIBOWO**  
F 26. 0945

**1994**  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**  
**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**  
**BOGOR**



FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

@Hak cipta milik IPB University

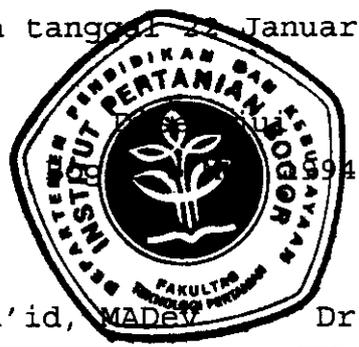
**KAJIAN AWAL PRODUKSI ASETON-BUTANOL-ETANOL  
SECARA SINAMBUNG DARI SUBSTRAT HIDROLISAT  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guinensis* JACQ)  
MENGUNAKAN BIOREAKTOR UNGGUN DIAM**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN  
pada Jurusan TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN,  
Fakultas Teknologi Pertanian,  
Institut Pertanian Bogor

Oleh  
EDY WIBOWO  
F 26. 0945

Dilahirkan di Jakarta  
pada tanggal 22 Januari 1971



Dr. Ir. E. Gumbira Sa'id, M.Agr.S.

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Djumali M., DEA

Dosen Pembimbing I

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala kehendak dan takdir-Nya, maka tugas ini dapat dikerjakan dengan baik. Salam ta'zim kepada Rosulullah SAW yang banyak memberi tauladan bagaimana bersikap, bertindak dalam menyelesaikan segala permasalahan hidup.

Skripsi ini disusun sebagai pertanggungjawaban ilmiah yang harus penulis berikan kepada masyarakat ilmu pengetahuan, sekaligus sebagai tugas akhir dalam menyelesaikan masa perkuliahan di Institut Pertanian Bogor.

Bersama ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr.Ir. Djumali Mangunwidjaja, DEA, selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk mengungkap salah satu kekayaan ilmu pengetahuan.
2. Dr.Ir. E. Gumbira Sa'id, MAdev, selaku dosen pembimbing kedua yang telah mendorong penulis untuk tetap optimis menatap masa depan.
3. Teman-teman di HIJAB, BIOINDUSTRI, TIN dan di AL HURRIYYAH yang banyak memberi semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi.

Sudah tentu skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Dengan penuh harap, penulis menanti kritik dan saran yang membangun demi peningkatan kualitas karya ini. Semoga karya sederhana ini dapat menjadi amal soleh bagi penulis.

Wassalam,

Penulis

Bogor, Mei 1994



## DAFTAR ISI

© Hak cipta milik IPB University

	Halaman
Kata Pengantar . . . . .	iii
Daftar Isi . . . . .	iv
Daftar Tabel . . . . .	vii
Daftar Gambar . . . . .	viii
Daftar Lampiran . . . . .	x
I. PENDAHULUAN . . . . .	1
A. LATAR BELAKANG . . . . .	1
B. TUJUAN PENELITIAN . . . . .	5
II. TINJAUAN PUSTAKA . . . . .	6
A. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT . . . . .	6
B. SIFAT FISIK DAN KIMIAWI BAHAN LIGNOSELULOSA . . . . .	8
1. Selulosa . . . . .	8
2. Hemiselulosa . . . . .	10
3. Lignin . . . . .	11
C. HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT . . . . .	11
D. ASETON-BUTANOL-ETANOL . . . . .	12
E. <i>Clostridium acetobutylicum</i> . . . . .	14
F. FERMENTASI ASETON-BUTANOL-ETANOL . . . . .	16
1. Teknik Penanganan Bakteri Anaerobik . . . . .	16
2. Beberapa Faktor Penting Yang Mempengaruhi Fermentasi ABE . . . . .	19

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

  a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

  b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

3. Perkembangan Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol . . . . .	19
G. BIOREAKTOR SINAMBUNG UNGGUN DIAM (PACKED BED BIOREACTOR) . . . . .	21
H. PARAMETER KINETIKA FERMENTASI . . . . .	23
III. BAHAN DAN METODE . . . . .	26
A. BAHAN-BAHAN PENELITIAN . . . . .	26
B. ALAT-ALAT PENELITIAN . . . . .	27
C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN . . . . .	28
D. METODE PENELITIAN . . . . .	28
1. Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit . . . . .	28
2. Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol . . . . .	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN . . . . .	39
A. PENELITIAN PENDAHULUAN . . . . .	39
1. Analisis Proksimat Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) . . . . .	39
2. Hidrolisis TKKS . . . . .	41
3. Penanganan Bakteri Anaerobik . . . . .	45
4. Perancangan Sistem Fermentasi Anaerobik . . . . .	47
B. PENELITIAN UTAMA . . . . .	51
1. Fermentasi Curah Aseton-Butanol-Etanol . . . . .	51
2. Pengaruh Perbedaan Jenis dan Konsentrasi Substrat Pada Fermentasi ABE . . . . .	57
3. Fermentasi Sinambung Aseton-Butanol-Etanol . . . . .	61
4. Pengaruh Perbedaan Laju Dilusi . . . . .	65
V. KESIMPULAN DAN SARAN . . . . .	69

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



A. KESIMPULAN .....	69
B. SARAN .....	69
DAFTAR PUSTAKA .....	71
LAMPIRAN .....	75

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 1.	Luas areal dan produksi kelapa sawit Indonesia . . . . .	2
Tabel 2.	Kebutuhan butanol yang diimpor Indonesia . . . . .	4
Tabel 3.	Komposisi tandan kosong kelapa sawit . . . . .	8
Tabel 4.	Medium yang diperoleh untuk penanganan <i>C. acetobutylicum</i>	32
Tabel 5.	Komposisi tandan kosong kelapa sawit . . . . .	40
Tabel 6.	Kadar gula pereduksi dari hidrolisat TKKS . . . . .	44
Tabel 7.	Parameter kinetika fermentasi curah . . . . .	58
Tabel 8.	Beberapa parameter kinetika fermentasi curah ABE pada berbagai jenis substrat . . . . .	60
Tabel 9.	Parameter fermentasi sinambung ABE menggunakan substrat hidrolisat TKKS pada beberapa taraf laju dilusi . . . . .	68

© Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Neraca massa tandan buah segar kelapa sawit . . . . .	7
Gambar 2. Rumus bangun selulosa . . . . .	9
Gambar 3. Lintasan biokimiawi pembentukan aseton-butanol-etanol oleh <i>C. acetobutylicum</i> . . . . .	16
Gambar 4. Teknik pengkondisian anaerobik pada medium cair . . . . .	18
Gambar 5. Bioreaktor yang digunakan untuk fermentasi curah ABE . . . . .	33
Gambar 6. Tahapan hidrolisis TKKS . . . . .	37
Gambar 7. Tahapan penanganan bakteri <i>C. acetobutylicum</i> . . . . .	38
Gambar 8. Tahapan fermentasi ABE . . . . .	38
Gambar 9. Sistem proses hidrolisis enzimatik TKKS dalam bufer Na-Sitrat, suhu 48 °C selama 72 jam . . . . .	43
Gambar 10. Kultur aktif <i>C. acetobutylicum</i> . . . . .	46
Gambar 11. Sistem fermentasi curah produksi ABE . . . . .	48
Gambar 12. Skema sistem fermentasi curah produksi ABE . . . . .	49
Gambar 13. Sistem fermentasi sinambung produksi ABE dalam bioreaktor unggun diam . . . . .	49
Gambar 14. Skema sistem fermentasi sinambung produksi ABE dalam bioreaktor unggun diam . . . . .	50
Gambar 15. Kinetika fermentasi curah ABE pada substrat campuran hidrolisat TKKS dan glukosa . . . . .	53
Gambar 16. Kinetika fermentasi curah ABE pada medium sukrosa . . . . .	54

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Gambar 17. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut dalam fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0.05 \text{ jam}^{-1}$  . . . . . 63

Gambar 18. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut dalam fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0.10 \text{ jam}^{-1}$  . . . . . 64

Gambar 19. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut dalam fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0.15 \text{ jam}^{-1}$  . . . . . 64

Gambar 20. Hubungan laju dilusi dengan konsentrasi substrat, biomassa dan pelarut pada fermentasi sinambung ABE menggunakan hidrolisat TKKS . . . . . 67

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Parameter kinetika fermentasi curah ABE pada medium hidrolisat TKKS . . . . .	75
Lampiran 2.	Parameter kinetika fermentasi curah ABE pada medium hidrolisat sukrosa . . . . .	76
Lampiran 3.	Parameter kinetika fermentasi sinambung ABE pada medium hidrolisat TKKS . . . . .	77
Lampiran 4.	Contoh komposisi substrat hidrolisat TKKS yang digunakan dalam fermentasi sinambung ABE pada sampel jam ke-10, laju dilusi $0,15 \text{ jam}^{-1}$ , yang ditentukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi . . . . .	78
Lampiran 5.	Contoh hasil kromatografi gas terhadap pelarut ABE yang dihasilkan pada fermentasi sinambung ABE . . . . .	79
Lampiran 6.	Prosedur penentuan komposisi tandan kosong kelapa sawit . . . . .	80
Lampiran 7.	Kadar gula pereduksi . . . . .	88

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Semenjak diterapkannya konsep pembangunan berwawasan lingkungan, segenap sektor pembangunan memulai kebijakan baru dalam pemanfaatan sumber daya dan pengaruhnya terhadap ekosistem. Salah satu sektor pembangunan yang banyak disorot dalam kasus ini adalah sektor industri. Hal ini disebabkan karena besarnya keterlibatan sektor industri dalam mempengaruhi terjadinya perubahan lingkungan.

Agroindustri sebagai salah satu sub sektor industri yang terus dipacu pertumbuhannya pada Pembangunan Jangka Panjang ke dua (PJP II), juga tak lepas dari konsep pembangunan berwawasan lingkungan. Di satu sisi, perkembangan agroindustri yang senantiasa berpijak pada pemanfaatan hasil-hasil pertanian menjamin terlaksananya industri yang berkesinambungan. Namun, di sisi lain potensi agroindustri sebagai penghasil limbah ternyata cukup tinggi.

Salah satu industri pengolahan hasil pertanian yang belakangan ini banyak disoroti adalah industri kelapa sawit. Sorotan yang cukup tajam tersebut disebabkan karena limbah yang dihasilkan cukup besar. Padahal industri kelapa sawit cukup potensial sebagai penghasil devisa bagi Indonesia.

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. Produksi sebesar itu ditunjang oleh keberadaan areal perkebunan kelapa sawit yang semakin luas, seperti terlihat pada Tabel 1.

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

Tahun	Luas Areal (Ha)	Produksi (ton)
1987	728 562	1 506 055
1988	862 859	1 713 335
1989	973 528	1 964 454
1990	1 126 677	2 412 612
1991	1 310 996	2 657 600

<sup>a</sup> Direktorat Jenderal Perkebunan (1991)

Peningkatan luas areal perkebunan dan produksi kelapa sawit terus dilakukan sampai saat ini. Hal yang sama dilakukan pula terhadap volume produksi minyak sawit nasional. Peningkatan produksi minyak sawit tersebut turut menyebabkan terjadinya peningkatan kuantitas limbah industri minyak kelapa sawit. Beberapa jenis limbah yang dihasilkan antara lain air buangan (palm oil mill effluent) dan limbah padat berupa tandan kosong, sabut dan cangkang kelapa sawit. Limbah cair industri kelapa sawit adalah limbah yang memiliki kualitas pencemar cukup tinggi (nilai BOD di atas 25 000 mg/l). Proporsi terbesar limbah padat industri kelapa sawit adalah tandan kosong, yaitu sekitar 27 persen dari tandan buah segar (Sivalingan, 1983). Pada tahun 1988 jumlah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang dihasilkan di Indonesia mencapai 151 ribu ton (Darwis *et al.*, 1987). Dengan

meningkatnya produksi minyak sawit, saat ini kuantitas TKKS diduga jauh lebih besar dari nilai tersebut.

Salah satu bentuk pemanfaatan bahan lignoselulosik seperti TKKS adalah menjadikannya sebagai hidrolisat yang banyak mengandung gula (hasil hidrolisis selulosa dan hemiselulosa). Hidrolisat tersebut dapat digunakan untuk berbagai fermentasi produksi senyawa-senyawa organik yang potensial dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme. Penerapan teknologi fermentasi selain mampu menekan kebutuhan biaya bahan baku, juga dapat menjadi alternatif terbaik untuk menggantikan proses kimiawi yang banyak mengkonsumsi energi.

Produk fermentasi yang cukup banyak diperlukan sebagai bahan penunjang dalam industri adalah pelarut organik, salah satunya adalah etanol. Pada tahun 1991, lebih dari 79 ribu ton etanol dibutuhkan oleh industri-industri di Indonesia (CIC, 1992).

Selain etanol, pelarut organik lain yang banyak diperlukan adalah butanol. Di Indonesia, butanol banyak dikonsumsi oleh industri pembuat resin alkid yang merupakan pelarut dasar pada produk cat, zat pewarna tekstil, kulit dan kertas. Kebutuhan butanol yang selama ini di impor oleh Indonesia mencapai lebih dari 17 000 ton pada tahun 1991. Tabel 2 menggambarkan fluktuasi kebutuhan butanol bagi industri-industri di Indonesia. Mengingat kebutuhan industri-industri di Indonesia terhadap butanol yang cukup besar, maka keberadaan



industri butanol di Indonesia sangat diperlukan untuk mengurangi keluarnya devisa ke luar negeri.

Tabel 2. Kebutuhan butanol yang diimport Indonesia<sup>a</sup>

Tahun	Volume (Ton)	Nilai (dolar AS)
1987	1 729	1 152 000
1988	3 259	2 408 000
1989	2 587	1 824 000
1990	5 767	3 744 000
1991	17 664	2 942 000

<sup>a</sup>Biro Pusat Statistik (1991)

Butanol merupakan pelarut organik yang dapat diproduksi dengan cara kimiawi maupun fermentasi. Selama ini produksi butanol dilakukan dengan cara kimiawi. Tersedianya bahan baku berupa TKKS yang cukup besar jumlahnya, menjadikan produksi butanol secara fermentasi sebagai satu alternatif proses produksi yang lebih baik.

Di dalam fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE), butanol dihasilkan sebagai pelarut campuran bersama aseton dan etanol dengan komponen terbesar butanol. Fermentasi tersebut dilakukan secara anaerobik dengan memanfaatkan aktivitas bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Fermentasi butanol sebenarnya sudah lama di kembangkan di dunia, tepatnya sejak tahun 1936 dengan didirikannya pusat-pusat fermentasi ABE di Amerika dan Jepang (Walton dan Martin, 1979).

Untuk menunjang terwujudnya industri ABE di Indonesia diperlukan penelitian yang seksama. Sebagaimana lazimnya sebelum diterapkan di dalam industri, rancang bangun proses produksi ABE perlu



dilakukan di laboratorium dengan melibatkan pihak-pihak yang terkait. Penelitian ini dilakukan dalam rangka melakukan rancang bangun proses produksi ABE dari hidrolisat TKKS.

## B. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari produksi aseton-butanol-etanol dengan sistem fermentasi sinambung menggunakan bioreaktor unggun diam (packed bed bioreactor) dari substrat hidrolisat tandan kosong kelapa sawit. Parameter kinetika yang diperoleh, diharapkan dapat menjadi data dasar untuk penggandaan skala, dan penerapan proses fermentasi produksi ABE skala industri.





## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

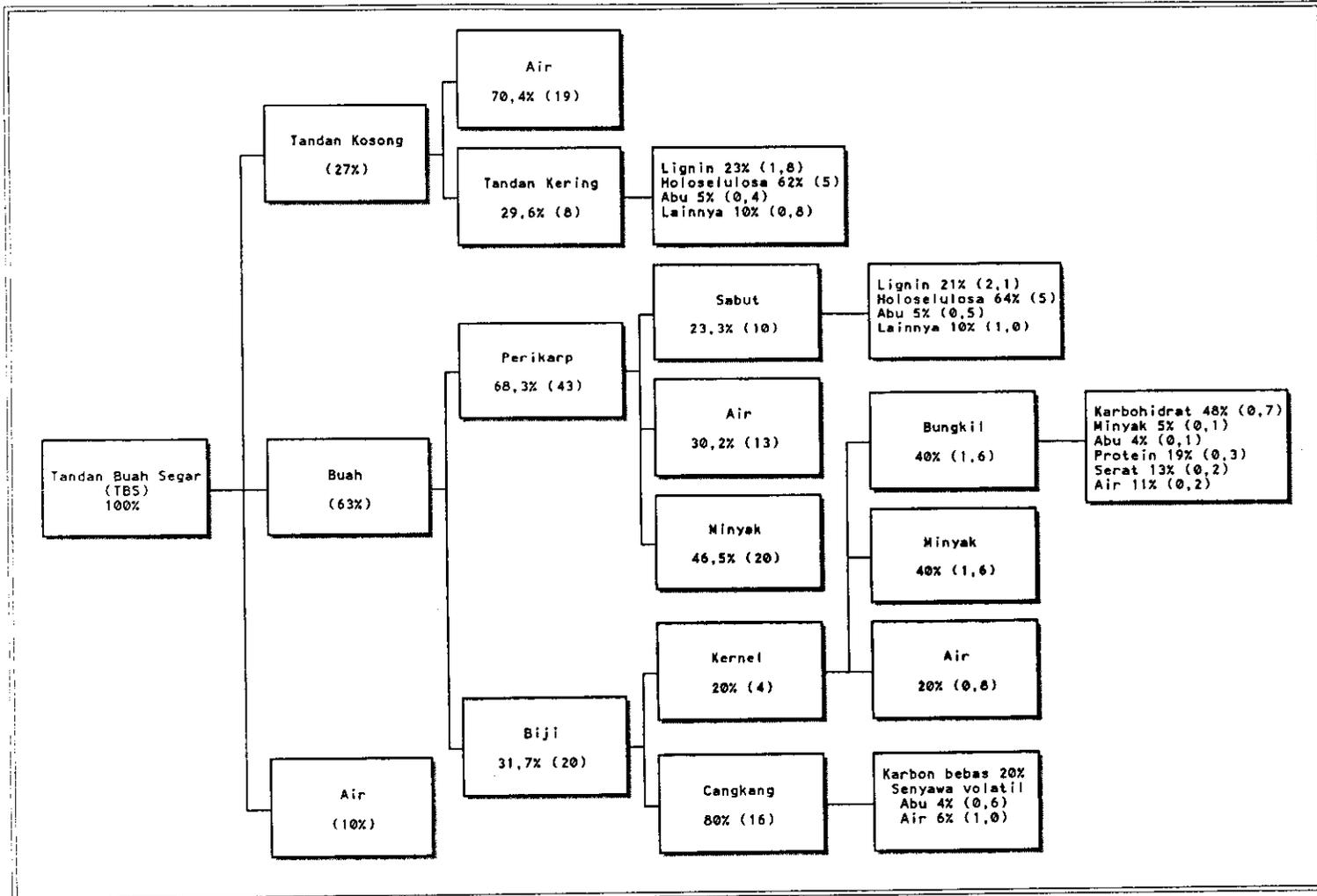
Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* JACQ), termasuk ke dalam keluarga *Palmae*, subkelas *Monocotyledonae*, kelas *Angiospermae*, subdivisi *Pterospida* dan divisi *Tracheophyta* (Hartley, 1967). Tanaman yang berasal dari Afrika Barat tersebut adalah termasuk tanaman berumah satu (bunga jantan dan bunga betina terangkai dalam satu tandan) yang mulai berbunga pada umur sekitar dua tahun (Satyawibawa dan Widyastuti, 1992). Tanaman kelapa sawit mulai dipanen pada umur 3,5 sampai 4 tahun. Tiap pohon dapat menghasilkan sampai enam tandan buah dengan bobot tiap tandan berkisar antara 5 sampai 30 kg (Aritonang, 1986).

Menurut Hartley (1967) setiap tandan buah segar kelapa sawit mengandung 65 sampai 70 persen buah segar dan sisanya, yaitu sebesar 30 sampai 35 persen berupa tandan kosong yang belum dimanfaatkan. Hal ini didukung juga oleh Sivalingan (1983) yang merinci sekitar 63 persen saja dari tandan buah segar yang dapat dimanfaatkan. Sebanyak 27 persen bagian tandan buah segar adalah berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Neraca massa kelapa sawit secara dapat dilihat pada Gambar 1.

Sebagian besar komponen yang menyusun TKKS adalah lignin, selulosa dan hemiselulosa. Selulosa merupakan komponen yang paling besar dalam TKKS. Namun selulosa tidak mudah untuk diperoleh, karena membentuk struktur serat yang liat bersama hemiselulosa dan lignin. Komposisi TKKS secara rinci dikemukakan pada Tabel 3.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 1. Neraca massa Tandan Buah Segar Kelapa Sawit (Sivalingan, 1983)

Tabel 3. Komposisi Tandan kosong kelapa sawit<sup>a</sup>

Komponen	Komposisi (% bk)
Selulosa	36,81
Hemiselulosa	27,01
Lignin	15,70
A b u	6,04

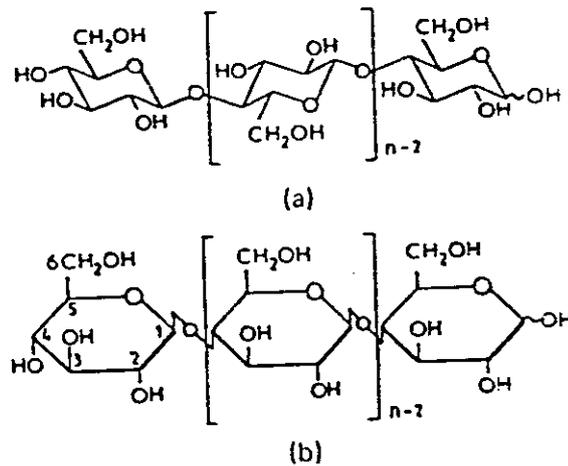
<sup>a</sup>Pratiwi *et al.* (1988)

## B. SIFAT FISIK DAN KIMIAWI BAHAN LIGNOSELULOSA

Selulosa adalah senyawa yang umumnya tidak berada dalam keadaan murni. Di alam, selulosa berikatan dengan lignin dan hemiselulosa membentuk bagian-bagian tanaman seperti kayu, batang, daun dan sebagainya. Tanaman yang berasal dari subkelas *Monocotyledonae* mengandung 25 - 40 persen selulosa, 25 -50 persen hemiselulosa dan 10 - 30 persen lignin (Cowling, 1975).

### 1. Selulosa

Selulosa termasuk homopolimer linier dengan monomer berupa D-anhidroglukosa yang saling berikatan dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Rumus empirik selulosa adalah  $(C_6H_{10}O_5)_n$  dengan n adalah jumlah satuan glukosa yang berikatan dan berarti juga derajat polimerisasi selulosa. Selulosa murni memiliki derajat polimerisasi sekitar 14 000, namun dengan pemurnian biasanya akan berkurang menjadi sekitar 2 500 (Nevell dan Zeronian, 1985). Rumus bangun selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.



- a: rumus bangun selulosa bentuk kursi (*chairformation*)  
 b: rumus bangun selulosa menurut Hawort

Gambar 2. Rumus Bangun Selulosa (Nevel dan Zeronian, 1985)

Molekul-molekul selulosa berikatan secara paralel dengan jembatan hidrogen membentuk *mikrofibril*. Beberapa mikrofibril saling berikatan membentuk komponen makrofibril (Haigler di dalam Nevel dan Zeronian, 1985). Bagian mikrofibril yang banyak mengandung jembatan hidrogen antar molekul selulosa bersifat sangat kuat dan tidak dapat ditembus dengan air. Bagian ini disebut sebagai bagian berkristal dari selulosa, sedangkan bagian lainnya yang sedikit atau sama sekali tidak mengandung jembatan hidrogen disebut bagian amorf. Menurut Tsao *et al.* (1978) perbandingan bagian kristal dan bagian amorf adalah 85 persen dan 15 persen. Struktur berkristal dari selulosa merupakan hambatan utama dalam proses hidrolisis. Menurut

Girindra (1990), hidrolisis selulosa dengan menggunakan asam kuat dapat menghasilkan campuran glukosa dan selobiosa ( $\beta$ -(1,4)-G-G). Hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim dapat menghasilkan lebih banyak glukosa dan sedikit selobiosa. Hidrolisis enzimatis tersebut melibatkan dua enzim yaitu kelompok enzim selulase (endoglukanase dan selobiohidrolase) dan enzim selobiose ( $\beta$ -glukosidase).

## 2. Hemiselulosa

Polisakarida yang berikatan dengan selulosa pada tanaman adalah hemiselulosa. Hemiselulosa dapat diperoleh dari tanaman setelah melalui proses pengambilan lignin (delignifikasi). Ikatan antara hemiselulosa, selulosa dan lignin mempengaruhi sifat kaku dan lenturnya dinding sel (Gong *et al.*, 1981).

Secara kimiawi, hemiselulosa merupakan homopolimer bercabang dari glukosa, xilosa, galaktosa, mannanosa, arabinosa dan asam-asam urat (*uric acids*) dari glukosa, serta dari galaktosa yang saling berikatan dengan ikatan 1-3, 1-4 dan 1-6 glikosidik. Derajat polimerisasi hemiselulosa dapat mencapai 200 (Cowling, 1975). Komponen gula terbesar yang menyusun hemiselulosa adalah xilosa dan mannanosa (Haigler di dalam Nevell dan Zeronian, 1985).

Perbedaan hemiselulosa dan selulosa adalah hemiselulosa mempunyai derajat polimerisasi lebih rendah dan mudah larut dalam alkali tetapi sukar larut dalam asam, sedangkan selulosa bersifat sebaliknya. Hemiselulosa dapat dihidrolisa dengan asam kuat encer seperti  $H_2SO_4$  dan HCl menghasilkan gula-gula pentosa dan heksosa. Hidrolisis lebih lanjut akan menghasilkan furfural dan produk terdekomposisi lainnya (Gong *et al.*, 1981). Hidrolisat yang dihasilkan



merupakan substrat bagi beberapa mikroorganisme terutama yang mampu menggunakan pentosa.

Hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan campuran beberapa gula sederhana yang sebagian besar berupa gula pentosa, sedangkan hidrolisis terhadap selulosa dapat menghasilkan rendemen (hidrolisat) yang tinggi. Oleh karena itu dalam praktek lebih diinginkan perolehan hidrolisat selulosa dari pada hidrolisat hemiselulosa.

### 3. Lignin

Lignin adalah polimer aromatik kompleks yang terbentuk melalui polimerisasi tiga dimensi dari *sinamil alkohol* yang juga merupakan turunan fenilpropana. Bobot molekul lignin menurut Haigler di dalam Novel dan Zeronian (1985) dapat mencapai 11 000 gram/mol.

Lignin membungkus mikrofibril selulosa dalam suatu matriks dan terikat secara kovalen pada selulosa maupun hemiselulosa. Adanya penumpukan lignin pada dinding sel tanaman menyebabkan dinding sel tanaman kaku, tidak mudah ditembus oleh air (Haigler *di dalam* Nevell dan Zeronian, 1985). Lignin yang bersifat hidrofobik dapat dioksidasi oleh larutan alkali atau bahan oksidator lain dan mudah larut dalam larutan sulfit pada keadaan biasa. Namun lignin tahan terhadap proses hidrolisis oleh asam-asam mineral (Tsao *et al.*, 1978).

## C. HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

Dalam rangka memperoleh hidrolisat yang kaya akan gula, hidrolisis terhadap TKKS memerlukan beberapa tahap pra-hidrolisis. Berdasarkan penelitian yang



dilakukan oleh Fajarrini (1991), tahap-tahap pra hidrolisis yang dilakukan antara lain pengecilan ukuran serta pencucian TKKS dengan air panas (80°C) untuk menghilangkan tanin dan lemak. Hidrolisis TKKS dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu hidrolisis hemiselulosa dengan menggunakan asam sulfat encer selama sembilan jam. Tahap selanjutnya adalah penghilangan lignin yang dilakukan dengan perendaman TKKS bebas hemiselulosa dalam larutan besi (III) tartrat selama sembilan jam. Hidrolisis enzimatik dilakukan setelahnya dengan menggunakan enzim selulase 0,9 % (w/v) dan enzim selobiase 0,2 % (w/v) dalam larutan bufer Na-sitrat pada pH 4,8. Kadar gula pereduksi (glukosa, xilosa dan selobiosa) tertinggi yang dapat dicapai dalam penelitian di atas adalah lebih dari 500 ppm dan tingkat konversi lebih dari 10 persen.

Metoda hidrolisis lain yang dikembangkan oleh Anis *et al.* (1994) dapat mencapai nilai konversi 90 persen. Tahap-tahap hidrolisis yang dilakukan meliputi perendaman serbuk TKKS dalam NaOH 1 N selama dua jam pada suhu ruang disertai dengan pengadukan, kemudian dilanjutkan dengan mengotoklaf bahan selama 15 menit pada 121°C. Setelah dilakukan pencucian dan pengeringan terhadap bahan, proses dilanjutkan dengan hidrolisis enzimatik menggunakan enzim selulase dan selobiase selama 48 jam. Hasil akhir dari hidrolisis ini adalah gula yang dapat digunakan untuk fermentasi (*fermentable sugar*).

#### D. ASETON-BUTANOL-ETANOL

Aseton-butanol-etanol adalah produk yang digunakan sebagai bahan kimia dan bahan bakar. Selama ini, ABE dihasilkan melalui proses petrokimiawi terhadap minyak bumi. Selain dapat dihasilkan melalui proses petrokimiawi, ABE juga dapat

dihasilkan melalui biokonversi bahan-bahan terbarukan (*renewable resources*) oleh bakteri *Clostridium acetobutylicum* (Qureshi dan Maddox, 1991).

Aseton adalah bahan kimia berwujud cair yang memiliki sifat tidak berwarna, berbau amis yang menusuk hidung, mudah menguap dan mudah terbakar. Salah satu kegunaan aseton adalah sebagai bahan pelarut organik (Tjokroadikoesoemo, 1986). Menurut Guenther (1949), pada tekanan 760 mmHg, aseton memiliki titik didih sebesar 56,48°C.

Menurut Tjokroadikoesoemo (1986), butanol adalah cairan yang digunakan sebagai bahan pelarut, sebagai resin detergen dan melamin, bahan pewarna, dan sebagai *plastisizer*. Butanol yang disebut juga 1-butanol adalah nama perdagangan dari n-butyl-alkohol. Senyawa ini memiliki bau yang menusuk hidung dan mendidih pada suhu 117,42°C. Menurut Buchta dalam Prave *et al.* (1987) butanol merupakan bahan dasar untuk membentuk butadien, pada produksi karet sintesis.

Etanol atau etil alkohol merupakan bahan cair yang banyak digunakan sebagai pelarut organik. Etanol dapat dibuat dari berbagai bahan hasil pertanian. Etanol merupakan produk yang lazim dihasilkan dalam setiap proses fermentasi terhadap bahan-bahan yang mengandung monosakarida, disakarida atau polimernya (Gumbira-Sa'id, 1987). Menurut Guenther (1949), etanol memiliki titik didih sebesar 78,30°C pada tekanan 760 mmHg.

Dari ketiga jenis pelarut di atas, hanya etanol saja yang sudah diproduksi dengan menggunakan teknik fermentasi. Aseton selama ini diproduksi dengan cara dehidrogenasi isopropanol dengan katalis Cu dan Zn pada suhu 450°C atau dengan katalis ZnO pada suhu 380°C (Chang dan Tikkanen, 1988). Adapun butanol diproduksi dengan hidrogenasi butiraldehid atau asetaldehid. Butiraldehid



dan asetaldehid yang selama ini digunakan berasal dari pemecahan (*cracking*) terhadap propilen, salah satu turunan minyak bumi. Proses tersebut tidak dapat berlangsung terus-menerus karena persediaan minyak bumi semakin lama semakin sedikit.

#### E. *Clostridium acetobutylicum*

Bakteri *Clostridium acetobutylicum* termasuk ke dalam kelas Endosporae, famili Bacillaceae, genera *Clostridium* dengan bentuk bulat (kokus). Bakteri tersebut termasuk golongan Gram negatif dan anaerobik obligat, bersifat heterotrof dan termofilik (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Wang *et al.* (1978), berdasarkan pola pertumbuhannya, *C. acetobutylicum* termasuk mikroorganisme yang memiliki pola pertumbuhan campuran. Pola pertumbuhannya berupa sebagian pembentukan produk berasosiasi dengan pembentukan biomassa, dan pada fasa lain pembentukan produk tidak berasosiasi dengan pertumbuhan biomassa. Sifat pertumbuhan seperti ini menjelaskan bahwa pembentukan produk mencapai maksimum pada saat pertumbuhan minimum.

Bakteri *C. acetobutylicum* dapat membentuk suatu struktur di dalam sel pada tempat-tempat yang khas, struktur ini disebut *endospora*. Endospora merupakan bentuk kehidupan yang paling resisten. Endospora dapat bertahan hidup dalam keadaan kekurangan nutrien, tahan terhadap panas dan unsur-unsur fisik lainnya seperti pembekuan, kekeringan, radiasi ultra violet serta tahan terhadap bahan-bahan kimia yang dapat menghancurkan bakteri yang tidak membentuk spora (Hadioetoemo, 1985). Menurut Dwidjoseputro (1978), spora bakteri ialah bentuk

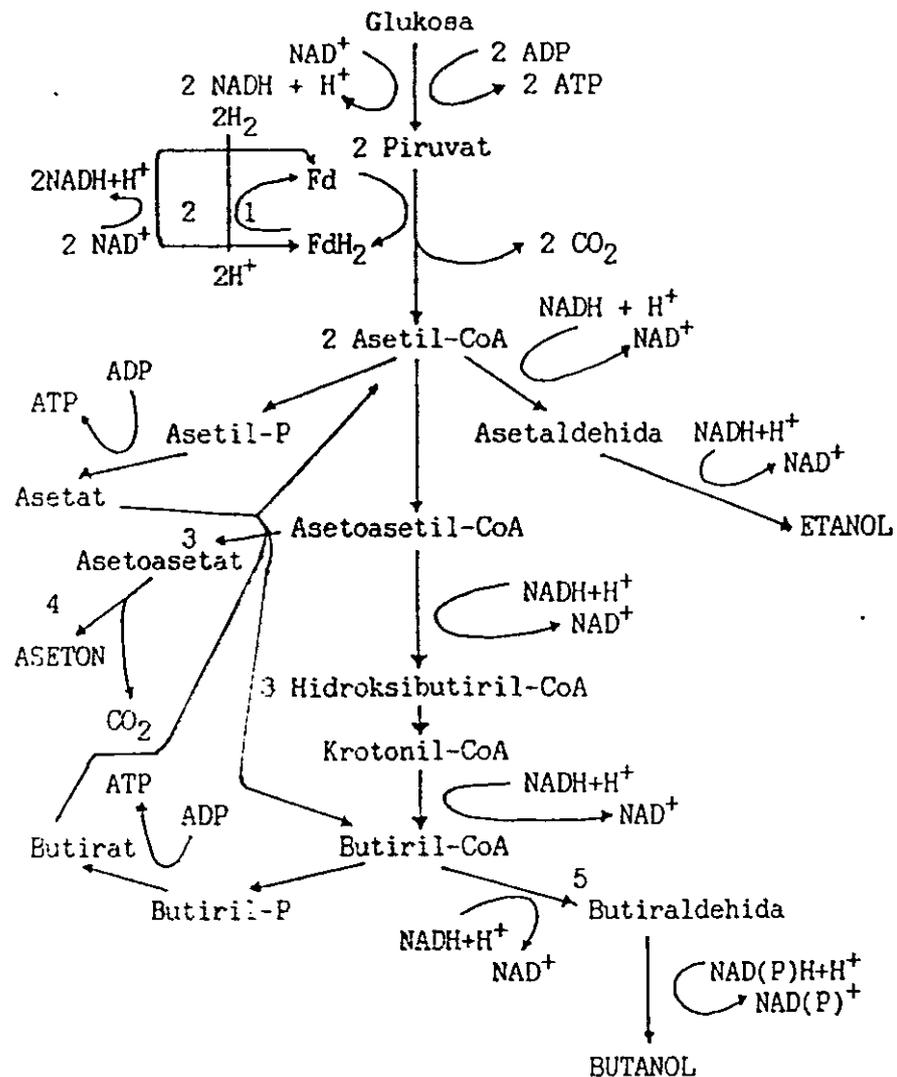


bakteri yang sedang dalam usaha mengamankan diri terhadap pengaruh buruk dari luar. Dinding spora akan pecah segera setelah keadaan di luar kembali normal. Mekanisme pembentukan spora (*sporulasi*) dapat dibagi menjadi empat tahap, yaitu (a) diawali dengan pertumbuhan koloni yang lambat, (b) terlihat adanya bahan-bahan lipoprotein yang mengumpul ke salah satu ujung sel, sehingga ujung itu tampak padat, (c) muncul selubung yang membungkus calon spora yang *impermeable* bagi zat-zat pengganggu dan (d) calon spora berubah bentuk dan volumenya menjadi spora. Jika spora itu berupa endospora, maka tetap berada di dalam sel. Sel dapat pecah karena perkembangan endospora. Pecahan tersebut kemudian luluh menjadi satu dengan medium.

Dalam proses fermentasi, *C. acetobutylicum* menghasilkan butanol sebagai produk utama. Menurut Roffler *et al.* (1987) butanol dapat menghambat proses fermentasi di atas apabila konsentrasinya melebihi 10 - 15 g/l. Jalur biokimiawi fermentasi ABE disajikan dalam Gambar 3.

Menurut Gottschalk dan Grupe (1992), proses fermentasi ABE terdiri dari dua tahap yaitu tahap asidogenesis dan tahap solventogenesis. Pada tahapan asidogenesis dihasilkan asam asetat dan asam butirat. Pada tahap ini terjadi penurunan pH dari 6 menjadi 4,5. Pada tahap solventogenesis terjadi konversi gula menjadi bahan pelarut, bersamaan dengan itu terjadi juga konsumsi sejumlah asam asam butirat dan asam asetat (Fond *et al.*, 1986). Mekanisme masuknya asam yang terbentuk ke dalam jalur biokimia pembentukan aseton-butanol-etanol adalah melalui perubahan asam asetat menjadi butiril CoA dan butirat menjadi asetil CoA (Gottschalk dan Gruppe, 1992).





Keterangan :

- |                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| 1. Hidrogenase               | 4. Asetoasetat dekarboksilase  |
| 2. $NADH:Fd$ oksidoreduktase | 5. Butiraldehida dehidrogenase |
| 3. CoA transferase           | 6. Butanol dehidrogenase       |

Gambar 3. Lintasan biokimiawi pembentukan aseton-butanol-etanol oleh *C. acetobutylicum* (Gottschalk dan Grupe, 1992)

## F. FERMENTASI ASETON-BUTANOL-ETANOL

### 1. Teknik Penanganan Bakteri Anaerobik

Mikroorganisme, seperti halnya makhluk hidup yang lain, membutuhkan energi bagi kehidupannya. Siklus pembentukan dan penggunaan energi

melibatkan dua proses, yaitu anabolisma dan katabolisma. Anabolisma dibedakan menjadi asimilasi dan biosintesa. Asimilasi adalah proses pembentukan komponen bahan makanan menjadi substansi sel untuk pertumbuhannya. Biosintesa adalah proses pembentukan senyawa kompleks yang cukup banyak, lebih dari sekedar yang dibutuhkan. Pada tahap ini dibutuhkan energi. Energi tersebut diperoleh dari proses katabolisma yang berupa disimilasi, yaitu penguraian senyawa substrat atau substansi sel menjadi senyawa yang lebih sederhana dan energi (Gumbira Sa'id, 1987)

Perbedaan proses anaerobik dan aerobik terletak pada digunakannya oksigen bebas sebagai oksidator pada proses disimilasi. Jika oksigen bebas tidak digunakan sebagai oksidator, namun diganti oleh senyawa antara atau senyawa substrat yang dapat direduksi, maka proses dikatakan anaerobik. Menurut Bailey dan Ollis (1977), disimilasi anaerobik adalah jalur katabolik yang paling sederhana di antara sekian banyak jalur reaksi katabolik yang berlangsung di alam.

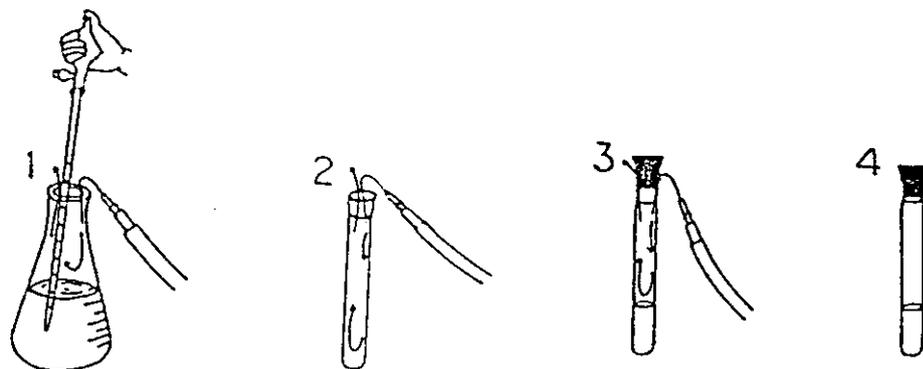
Pada prakteknya, untuk menumbuhkan bakteri anaerobik di dalam suatu medium dapat dilakukan dalam dua cara. Cara pertama adalah peniadaan oksigen dari medium atau lingkungan tempat hidup bakteri. Cara kedua adalah dengan mengusahakan agar tegangan oksidasi-reduksi (O-R) di dalam sistem pembiakannya terjaga rendah sehingga biakan terlindungi dari pengaruh toksik  $O_2$  (Hadioetoemo, 1985).

Salah satu cara yang cukup populer untuk menghilangkan oksigen adalah dengan menggunakan gas  $CO_2$ ,  $H_2$  dan  $N_2$  atau campuran ketiganya. Menurut Hungate (1969) untuk menurunkan tegangan oksidasi-reduksi suatu



medium dapat dilakukan dengan menambahkan bahan pereduksi. Bahan pereduksi yang cukup banyak digunakan adalah natrium tioglikolat atau gabungan pirogalol dan natrium hidroksida. Untuk memelihara kultur, Hungate (1969) juga menerapkan penggunaan tabung dengan tutup karet.

Penanganan medium cair untuk menumbuhkan mikroorganisme anaerobik dapat dilakukan dengan menghembuskan aliran gas ke dalam medium ketika dipanaskan untuk kemudian ditutup dengan segera. Hal yang sama dilakukan juga ketika memindahkan medium ke dalam tabung. Teknik penanganan medium cair untuk bakteri anaerobik dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Teknik Pengondisian anaerobik pada medium cair (Bryant, 1972).

Metoda umum yang diterapkan untuk menyimpan biakan bakteri anaerobik adalah dengan menambahkan gliserol pada medium cair untuk selanjutnya disimpan di dalam pembeku (*freezer*) suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gliserol tersebut biasanya diinjeksikan ke dalam tabung anaerobik pada saat laju



pertumbuhan bakteri mencapai pertengahan fase logaritmik. Tahap selanjutnya adalah meratakan isi tabung dengan mengocoknya. Dengan penambahan gliserol, penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  tidak menyebabkan isi tabung membeku. Menurut Hippe (1984), dengan cara ini kultur dapat disimpan selama lima tahun.

## 2. Beberapa Faktor Penting Pada Fermentasi ABE

Peristiwa yang umum terjadi pada banyak fermentasi adalah penghambatan oleh produk akhir, demikian halnya dengan fermentasi ABE. Butanol yang merupakan produk akhir utama dapat menghambat berlangsungnya fermentasi. Gutierrez dan Maddox (1992), menyatakan bahwa butanol dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50 persen pada konsentrasi 7 sampai 13 g/l. Penghambatan sempurna terjadi jika konsentrasi butanol mencapai 12 sampai 16 g/l.

Faktor lain yang mempengaruhi fermentasi ABE adalah konsentrasi sumber nitrogen. Kanchanatawee *et al.* (1992) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa peningkatan kadar amonium sulfat cenderung meningkatkan produktivitas pembentukan pelarut. Pada konsentrasi amonium sulfat 3 g/l dapat diperoleh produktivitas pembentukan pelarut sebesar 0,49 g/l jam.

## 3. Perkembangan Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol

Fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) dilakukan dengan menggunakan bakteri anaerobik *Clostridium acetobutylicum* pada substrat yang mengandung gula pentosa (xilosa dan arabinosa) dan atau heksosa (glukosa dan



fruktosa). Kedua bahan di atas dapat diperoleh dari hasil hidrolisis selulosa dan hemiselulosa (Fond *et al.*, 1986).

Fermentasi ABE pertama kali dilakukan pada tahun 1940 dengan menggunakan tetes sebagai substrat. Fermentasi dilakukan secara curah dengan konsentrasi awal substrat 45 - 50 g/l selama 40 - 45 jam. Komposisi hasil yang diperoleh adalah 60 persen butanol, 30 persen aseton dan 5 - 10 persen etanol (Higgins *et al.*, 1985).

Fermentasi ABE memerlukan kondisi anaerobik dan termofilik. Fond *et al.* (1986) melakukan penelitian fermentasi ABE secara curah pada suhu 35°C dan pH 4,8. Sedangkan Kanchanatawee dan Maddox (1992) melakukan penelitian fermentasi ABE secara curah pada suhu 34°C dan pH yang dipertahankan pada nilai 5,0 - 5,5.

Menurut Fond *et al.* (1986), fermentasi ABE dengan sistem curah dapat mengkonversi gula sampai 68 g/l dengan rendemen pelarut terhadap gula sebesar 32,5 persen, dan menghasilkan 20 g/l campuran pelarut. Fermentasi tersebut dilakukan dengan substrat campuran 35 g/l glukosa dan 39 g/l xilosa. Kanchanatawee *et al.* (1992) melaporkan bahwa pada umumnya produktivitas fermentasi ABE dengan sistem curah berkisar antara 0,1 - 0,5 g/l jam. Proses fermentasi sinambung menggunakan sel bebas untuk produksi ABE seperti dilaporkan Kanchanatawee *et al.* (1992) dapat meningkatkan produktivitas sampai 1 g/l jam. Beberapa metoda fermentasi terus dikembangkan untuk dapat meningkatkan produktivitas tersebut. Salah satunya adalah metoda *crossflow microfiltration* untuk mendaur ulang sel. Namun



ternyata cara tersebut belum stabil dan bahkan menyebabkan degenerasi kultur (Kanchanatawee *et al.*, 1992).

Cara lain yang juga telah dilakukan untuk tujuan di atas adalah dengan metoda *in situ extractive fermentation* (Roffler *et al.*, 1988). Fermentasi dengan cara ini dilakukan dengan sistem curah terumpani (fed batch). Dalam metoda di atas kultur dan biomassa dipisahkan dari produk dalam suatu kolom pemisah. Pada satu tahap tertentu dari proses, kultur dan biomassa didaurulang kembali ke dalam bioreaktor. Tujuan metoda ini adalah menghindari bertemunya mikroorganisme dengan produk, dalam hal ini butanol, yang merupakan penghambat proses. Cara di atas cukup berhasil meningkatkan produktivitas menjadi 1 g/l. jam. Namun demikian metoda *in situ* bersifat mahal karena diperlukan peralatan dan rancang bangun yang sulit.

Metoda yang lebih memungkinkan untuk dilaksanakan dalam penelitian laboratorium adalah amobilisasi sel dengan metode penjeratan menggunakan alginat. Menurut Kanchanatawee *et al.* (1992) cara ini pernah dicoba dan berhasil meningkatkan produktivitas sampai 1,7 g/l. jam. Fermentasi sinambung lainnya yang dilakukan dalam bioreaktor unggun diam (*packed bed bioreactor*) dengan sel teradsorpsi pada arang aktif dari tulang (*bone char*) dan substrat *whey permeat* dapat menaikkan produktivitas sampai 6,5 g/l jam (Kanchanatawee *et al.*, 1992)

## G. BIOREAKTOR UNGGUN DIAM (PACKED BED BIOREACTOR)

Berdasarkan jenis aliran substrat yang masuk ke dalam bioreaktor, terdapat tiga jenis bioreaktor unggun diam, yaitu *downward flow bioreactor*, *upward flow*



*bioreactor* dan *recycle bioreactor* (Chibata, 1978). Jenis bioreaktor yang umum digunakan dalam industri adalah jenis *upward flow bioreactor*, karena tidak menyebabkan pemampatan dalam kolom. Di dalam prakteknya, penggunaan bioreaktor unggun diam memerlukan suatu matriks untuk menjerat sel bebas (Schugerl dan Sittig, 1987).

Dalam beberapa hal, penggunaan bioreaktor unggun diam lebih menguntungkan daripada penggunaan bioreaktor sinambung berpengaduk (Continue Steered Tank Reactor). Menurut Van't Riet dan Tramper (1987), pada keadaan yang sama, volume kerja bioreaktor unggun diam lebih kecil dibanding volume kerja CSTR. Menurut Mangunwidjaja (1990), pada keadaan kinetika umum, produktivitas bioreaktor unggun diam lebih tinggi daripada CSTR pada volume yang sama.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam merancang bioreaktor unggun diam terutama adalah faktor dimensi kolom, terutama perbandingan antara tinggi kolom dengan diameternya. Menurut Kim dan Byun (1982), dari hasil penelitiannya menggunakan tiga macam perbandingan tinggi dan diameter sebesar 3,9, 10,3 dan 21,3 disimpulkan bahwa perbandingan sebesar 10,3 memberikan hasil yang optimal. Faktor yang kedua adalah faktor laju alir substrat yang mempengaruhi laju penurunan aktivitas sel. Penurunan aktivitas sel bergantung pada waktu alir bukan pada volume alir, sebab volume alir bersifat seragam pada setiap bagian kolom. Faktor yang terakhir adalah faktor ukuran partikel matriks (Chibata, 1979). Di dalam penelitiannya, Kanchanatawee *et al.* (1992) menggunakan partikel berukuran diameter 0,355 - 0,6 mm sebagai matriks untuk bioreaktor unggun diam berukuran tinggi 24 cm dan diameter kolom 3,9 cm. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa produktivitas dapat mencapai nilai sebesar 6,5 g/l jam.



## H. PARAMETER KINETIKA FERMENTASI

Menurut Stanbury dan Whitaker (1984), di dalam fermentasi curah, mikroorganisme tumbuh mengikuti pola tertentu. Pada periode pertama mikroorganisme mengalami adaptasi untuk selanjutnya tumbuh dengan cepat pada fasa logaritma. Setelah beberapa waktu, mikroorganisme akan mengalami fasa pertumbuhan yang minimum dan diikuti oleh fasa pertumbuhan stasioner. Pada fase eksponensial, laju pertumbuhan biomassa, digambarkan pada persamaan 1.

$$\frac{d_x}{d_t} = \mu X \quad (\text{persamaan 1})$$

Dengan  $\mu$  : laju pertumbuhan spesifik ( $\text{jam}^{-1}$ )  
 $X$  : konsentrasi biomassa  
 $t$  : waktu (jam)

Hasil integrasi dan bentuk logaritma persamaan 1 menghasilkan persamaan seperti terlihat pada persamaan 2 dan persamaan 3.

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{persamaan 2})$$

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (\text{persamaan 3})$$

Berdasarkan persamaan 3 dapat diketahui nilai  $\mu$  adalah koefisien arah (gradien) kurva hubungan  $\ln X$  dengan  $t$ . Menurut Wang *et al.* (1978), untuk mengetahui nilai rendemen (yields) dari suatu fermentasi digunakan persamaan seperti pada persamaan-persamaan 4, 5 dan 6.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (\text{persamaan 4})$$

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{persamaan 5})$$

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (\text{persamaan 6})$$

Dengan P : konsentrasi produk  
S : konsentrasi substrat  
X : konsentrasi biomassa

Menurut Luedeking dan Piret *di dalam* Gumbira-Said, (1987), laju penggunaan substrat dan laju pembentukan produk yang dilakukan oleh mikroorganisme dengan pola pertumbuhan campuran adalah seperti persamaan 7 dan 8.

$$\Pi = \alpha \mu + \beta \quad (\text{persamaan 7})$$

$$\sigma = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \quad (\text{persamaan 8})$$

Dengan  $\alpha$  :  $Y_{(p/s)}/Y_{(x/s)}$   
 $\beta$  :  $Y_{(p/s)}$  m  
 $\pi$  : laju spesifik pembentukan produk (g/l jam)  
 $\sigma$  : laju spesifik penggunaan substrat (g/l jam)  
m : laju spesifik pemeliharaan kultur (jam<sup>-1</sup>)

Menurut Primorse (1987), jika sejumlah medium segar ditambahkan ke dalam sebuah fermentor dengan debit alir F (l/jam) dan V (l) sebagai volume kerja fermentor, maka laju kehilangan mikroorganisme di dalam fermentor disebut laju



dilusi (D). Persamaan laju dilusi dapat dilihat pada persamaan 9. Waktu tinggal fermentasi sinambung dapat dilihat pada persamaan 10.

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{persamaan 9})$$

$$\tau = \frac{1}{D} \quad (\text{persamaan 10})$$

Dengan D : laju dilusi ( $\text{jam}^{-1}$ )  
 F : debit alir substrat (l/jam)  
 $\tau$  : waktu tinggal (jam)

Pendekatan untuk menentukan nilai D, menurut Stanbury dan Whitaker (1984) dapat dilakukan berdasarkan nilai  $\mu_{maks}$ . Dalam praktek, nilai-nilai D ditetapkan di bawah nilai  $\mu_{maks}$ . Jika nilai D ditetapkan lebih besar dari nilai  $\mu_{maks}$ , maka akan terjadi *wash out* atau mikroorganisme tercuci keluar.

Produktivitas fermentasi sinambung menurut Wang *et al.* (1978) dapat ditentukan dengan persamaan matematik seperti pada persamaan 11.

$$P = DX \quad (\text{persamaan 11})$$

Dengan P : produktivitas fermentasi sinambung (g/l jam)  
 D : laju dilusi ( $\text{jam}^{-1}$ )  
 X : konsentrasi produk (g/l)



### III. BAHAN DAN METODA

#### A. BAHAN-BAHAN PENELITIAN

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang merupakan limbah padat industri minyak kelapa sawit. Bahan baku tersebut diperoleh dari Pabrik Kelapa Sawit (PKS) PT. Perkebunan (PTP) IX Kertajaya, Kabupaten Lebak, Jawa Barat. Bahan kimia yang dipergunakan dalam penelitian ini dibagi dalam tiga kelompok yaitu bahan-bahan yang dipergunakan untuk menghidrolisa TKKS dan bahan-bahan yang digunakan untuk fermentasi produksi aseton-butanol-etanol (ABE) dan bahan-bahan yang digunakan untuk analisa.

Bahan-bahan untuk hidrolisis adalah air destilata, Na-hidroksida 1 N, Na-sitrat, asam sitrat, enzim selulase (celluclast) dan selobiase (Novozym) yang diperoleh dari PT. Supra Incomer perwakilan NOVO di Jakarta, resin (kation dan anion), arang aktif. Bahan-bahan yang digunakan untuk fermentasi terdiri atas biakan *Clostridium acetobutylicum* P-262 yang diperoleh dari Prof. Ian Maddox dari Jurusan Teknologi Proses dan Lingkungan Universitas Massey, Selandia Baru; etanol 95 persen; medium aktivasi yang berupa *cooked meat medium* (CMM) dan D-glukosa (khusus untuk mikrobiologi); medium propagasi yang berupa D-glukosa (khusus untuk mikrobiologi), kalium dihidro posfat, natrium klorida, Na-asetat, L-sistein-HCl, mangan sulfat monohidrat, besi (II) sulfat heptahidrat, biotin, magnesium sulfat heptahidrat, tiamin-HCl, asam amino benzoat, ekstrak khamir dan amonium sulfat; dan HCl untuk mengatur pH.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Bahan-bahan yang digunakan untuk analisa adalah pereaksi DNS yang berupa asam dinitro salisilat, Na-hidroksida, Na-K-tartrat, fenol, Na-meta bisulfit dan asam klorida. Beberapa standar seperti glukosa, sukrosa, xylosa, selobiosa, asam asetat dan asam butirat; bahan untuk analisa kadar hemiselulosa yang terdiri atas pereaksi NDF (natrium dodesil sulfat, EDTA, natrium borat dekahidrat, dinatrium hidrogen fosfat, etilen glikol monoetil eter, dan pereaksi ADF (asam sulfat, cetil metil amonium bromida); dan bahan untuk menganalisa kadar lignin serta selulosa yang berupa pereaksi A (kalium permanganat, perak sulfat, besi nitrat nanohidrat, perak nitrat, asam asetat glasial, kalium asetat, butil alkohol tersier) dan pereaksi B (asam oksalat dihidrat, etanol 95 persen dan asam klorida pekat).

## B. ALAT-ALAT PENELITIAN

Alat-alat penelitian dibagi ke dalam empat kelompok yaitu alat-alat untuk penanganan bahan, alat-alat untuk hidrolisis, alat-alat untuk fermentasi dan alat-alat untuk analisa. Alat-alat penanganan bahan adalah golok, alat pengecil ukuran (*mill*). Alat-alat untuk hidrolisis TKKS berupa reaktor berpengaduk (*stirred reactor*), otoklaf, kain penyaring, gelas piala 2000 ml, oven pengering, erlenmeyer 2000 ml, timbangan analitik, labu takar 1000 ml, penangas air (*water bath*), pipet, kertas saring Whatman 40, penyaring vakum (*aspirator*), pemanas berpengaduk magnet (*hot plate steerer*), termometer, kolom resin, statip, selang plastik, sumbat kapas, dan aluminium foil.

Alat-alat yang digunakan untuk fermentasi meliputi sumbat karet yang dimodifikasi dengan penambahan selang silikon, erlenmeyer 125 ml, tabung reaksi dengan tutupnya, *clean bench*, kotak anaerobik, wadah anaerobik



(*candle jar*), sarung tangan karet, perangkat gas nitrogen, pembakar bunsen, reaktor curah (menggunakan botol khusus), reaktor sinambung dari bahan gelas (tinggi 38,5 cm, diameter 11,5 cm), matriks silika gel, pompa peristaltik, dan wadah termos.

Alat-alat yang digunakan untuk analisa meliputi kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi, spektrofotometer, perangkat pengujian selulosa, lignin dan hemiselulosa.

### C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama lebih kurang enam bulan. Penelitian di mulai pada bulan November 1993 sampai dengan Maret 1994. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Bioindustri, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

### D. METODA PENELITIAN

#### 1. Hidrolisis tandan kosong kelapa sawit

##### a. Penentuan komposisi kimia TKKS

Hidrolisis TKKS dilakukan untuk memperoleh hidrolisat yang mengandung gula yang akan dipergunakan dalam fermentasi ABE. Hidrolisis TKKS dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama adalah penanganan bahan yang bertujuan untuk mengurangi ukuran bahan. Kegiatan yang dilakukan dalam tahap ini meliputi perajangan tandan yang dilakukan dengan menggunakan golok. Serpihan tandan dibuat



kira-kira sebesar 10 - 15 cm. Serpihan yang berwujud serat-serat panjang kemudian dijemur dengan sinar matahari setelah sebelumnya dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat. Penjemuran dihentikan sampai bahan cukup kering untuk mempermudah proses penghancuran (*milling*). Serpihan TKKS selanjutnya dihancurkan dengan mesin penghancur bermata pisau dan memiliki saringan 60 mesh. Serbuk TKKS yang dihasilkan berwujud seperti serbuk gergaji yang cukup halus. Sampai dengan tahap ini dapat dilakukan analisis proksimat terhadap bahan, yaitu berupa analisis kadar selulosa, hemiselulosa, lignin, kadar abu.

#### b. Hidrolisis TKKS

Tahap berikutnya dari rangkaian hidrolisis TKKS adalah penghilangan lignin (*delignifikasi*) yang dilakukan dengan perendaman 100 gr serbuk TKKS kering dalam 2000 ml larutan NaOH 1 persen pada suhu ruang. Perendaman tersebut diikuti pula dengan pengadukan. Dalam penelitian ini, perendaman dan pengadukan dilakukan dalam reaktor berpengaduk (*stirred reactor*). Campuran serbuk dan larutan NaOH kemudian diotoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Hasil dari tahap ini kemudian disaring dengan menggunakan kain penyaring sambil dibersihkan dengan menggunakan air hangat. Setelah dibersihkan, serbuk hasil delignifikasi kemudian dikeringkan sampai kering untuk kemudian dihaluskan kembali dengan alat penghancur berupa *blender*.

Sebelum dilanjutkan ke tahap hidrolisis enzimatik, dilakukan persiapan pembuatan buffer sitrat pH 4,8 sebanyak 2 liter. Hidrolisis



enzimatik dilakukan dengan memasukkan 40 gram TKKS pasca delignifikasi ke dalam 2 liter buffer sitrat serta ditambah masing-masing 0,5 ml enzim selulase dan selobiase. Hidrolisis dilakukan di dalam reaktor berpengaduk yang ditempatkan pada penangas air. Proses tersebut berlangsung selama 72 jam pada suhu 48°C. Metode hidrolisis TKKS di atas dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Anis *et al.* (1994).

Hidrolisat yang dihasilkan berupa beningan (*filtrat*) yang agak keruh. Penghilangan kekeruhan dilakukan dengan penyaringan menggunakan pompa vakum yang dikombinasikan dengan pemucatan menggunakan arang aktif. Pemekatan untuk meningkatkan konsentrasi gula pada hidrolisat dapat dilakukan sebelum proses pemucatan. Tahap akhir proses perolehan hidrolisat adalah penyaringan menggunakan resin kation dan anion. Setelah tahap ini diperoleh beningan yang siap digunakan untuk fermentasi.

## 2. Fermentasi aseton-butanol-etanol

### a. Penanganan kultur *Clostridium acetobutylicum*

Penanganan kultur bakteri *Clostridium acetobutylicum* memerlukan teknik yang unik. Isolat *C. acetobutylicum* yang berupa spora dalam suspensi cair diaktifkan dengan memindahkan beberapa mililiter isolat ke dalam tabung bertutup yang berisi campuran *cooked meat medium* (CMM), 0,1 g D-glukosa dan 10 ml air. Pemindahan spora dilakukan dengan pipet dan tidak memerlukan kondisi anaerobik. Penyimpanan



tabung aktivasi dilakukan dalam jar anaerobik (*candle jar*) yang dapat divakumkan.

Untuk menguji keaktifan spora, dilakukan penumbuhan bakteri dalam agar miring. Agar yang digunakan adalah *reinforced clostridial agar* (RCA). Pemindahan dari tabung aktivasi ke dalam agar miring dilakukan dalam keadaan anaerobik. Seluruh pekerjaan dilakukan dalam kotak anaerobik yang dapat dihilangkan udara di dalamnya dengan gas nitrogen. Selanjutnya biakan disimpan dalam inkubator pada suhu 34°C

Pembuatan medium propagasi dilakukan dengan membuat medium sintesis lengkap yang disarankan oleh Kanchanatawee *et al.* (1992), seperti terlihat pada Tabel 4. Untuk mendapatkan kondisi anaerobik, sedapat mungkin oksigen di dalam wadah medium dihilangkan. Hal ini dilakukan dengan jalan mengalirkan gas nitrogen ke dalam wadah pada waktu pendidihan medium. Sebanyak 100 ml medium selanjutnya disterilkan untuk kemudian diinokulasikan spora aktif. Pekerjaan ini dilakukan di dalam kotak anaerobik. Sebelum diinokulasikan pada bioreaktor, spora dipropagasikan selama 24 jam.

Untuk memelihara ketersediaan kultur bakteri, dilakukan proses pengambilan spora. Secara teknis hal tersebut dilakukan dengan jalan menumbuhkan bakteri seperti dalam biakan propagasi selama lebih dari 24 jam. Spora yang terbentuk berwarna putih dan berkumpul di bagian bawah wadah. Spora diambil setelah dipisahkan dari medium dengan menggunakan sentrifus. Penyimpanan spora dilakukan dalam keadaan beku.

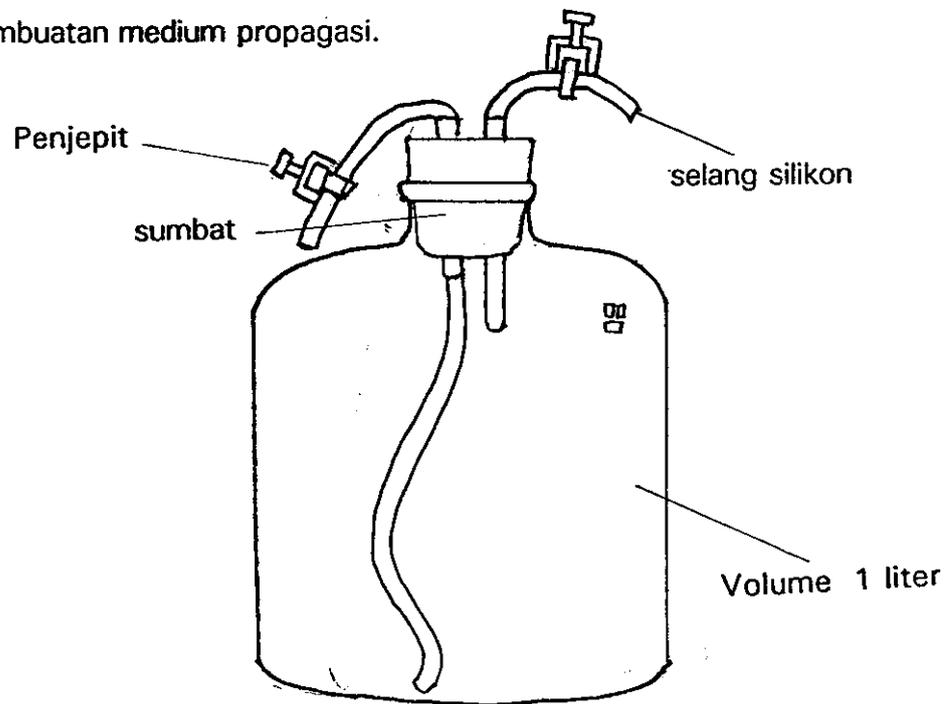


Tabel 4. Medium yang dipergunakan untuk penanganan *C. acetobutylicum*

Kegiatan	Komponen medium	Jumlah
Aktivasi	<i>Cooked meat medium</i>	1,5 g
	glukosa	0,1 g
	Air destilata	10 ml
Propagasi	Glukosa	5,0 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 g
	NaCl	0,1 g
	CH <sub>3</sub> COONa	0,1 g
	L-Sistein-HCl	0,05 g
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002 g
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,002 g
	Biotin	0,0004 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04 g
	Tiamin-HCl	0,0016 g
	Asam amino benzoat	0,004 g
	Ekstrak ragi	0,5 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3 g
	Air destilata	100 ml
Fermentasi	Substrat	40 - 60 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 g
	NaCl	1 g
	CH <sub>3</sub> COONa	1 g
	L-Sistein-HCl	0,5 g
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,02 g
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02 g
	Biotin	0,004 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g
	Tiamin-HCl	0,016 g
	Asam amino benzoat	0,04 g
	Ekstrak ragi	5 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
	Air destilata	1000 ml
Pemeliharaan kultur	<i>Reinforced Clostridial agar</i>	52,5 g
	Air destilata	1000 ml

## b. Fermentasi curah produksi ABE

Fermentasi curah dilakukan untuk dua buah substrat (hidrolisat TKKS dengan campuran glukosa dan substrat sukrosa murni). Fermentasi diawali dengan mempersiapkan bioreaktor fermentasi curah yang dilengkapi sumbat berselang silikon seperti pada Gambar 5. Persiapan yang dilakukan adalah pencucian dan sterilisasi di dalam otoklaf. Tata cara pembuatan substrat fermentasi hampir sama dengan pembuatan medium propagasi.



Gambar 5. Bioreaktor yang digunakan untuk fermentasi curah ABE

Untuk membuat substrat fermentasi, D-glukosa pada medium yang disarankan Kanchanatawee *et al.* (1992) disubstitusi dengan hidrolisat TKKS atau sukrosa. Fermentasi curah pertama dilakukan dengan

substrat hidrolisat TKKS (kadar gula terfermentasi 13,89 g/l) dan penambahan glukosa (6,11 g/l). Fermentasi curah kedua dilaksanakan dengan menggunakan substrat sukrosa murni 60 g/l. Substrat tersebut selanjutnya disterilkan dalam otoklaf. Segera setelah bioreaktor dan substrat fermentasi dikeluarkan dari otoklaf, dilakukan pemasukan substrat ke dalam bioreaktor. Cara memasukkannya adalah dengan mengalirkan gas nitrogen ke dalam wadah substrat (yang memiliki sumbat dengan dua lubang masukan dan keluaran). Gas nitrogen mendesak cairan substrat masuk ke dalam bioreaktor karena adanya pengaruh tekanan.

Penggunaan tekanan akibat aliran gas nitrogen diterapkan juga pada waktu inokulasi biakan propagasi ke dalam bioreaktor. Dengan cara tersebut dapat dipertahankan kondisi anaerobik pada bioreaktor. Fermentasi curah dilakukan pada suhu 34°C selama 60 jam dan pada jam-jam tertentu dilakukan pengambilan sampel. Pada fermentasi curah dengan substrat campuran hidrolisat TKKS dan glukosa, sampel diambil tiap 10 jam sekali, sedangkan pada fermentasi dengan substrat sukrosa, sampel diambil tiap 12 jam sekali. Sebelum sampel ditempatkan pada botol sampel, dilakukan sentrifusi pada 4000 RPM pada suhu -4°C. Sampel fermentasi kemudian dianalisa pH-nya dengan menggunakan pH meter elektronik, biomassa diukur dengan metode bobot kering sel, gula, asam dan pelarut yang dihasilkan dianalisa dengan menggunakan kromatografi gas model Hitachi 263-50 yang dilengkapi dengan (1) detektor ionisasi api (FID) dengan suhu 155°C, (2) kolom jejal Porafax



Q 100/200 mesh (0,7 m x 0,5 cm) dengan suhu 185°C (3) gas pembawa bahan sampel yang berupa gas nitrogen dan hidrogen (perbandingan 1 : 2) dan tekanan udara 0,7 kg/cm<sup>2</sup>, serta (4) alat pencetak model Hitachi D-2500 Chromatro-Integrator. Kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi (1) kolom Bondapak C-18 (30 cm x 3.9 mm) dengan suhu kerja 60°C dan laju alir 1 ml/menit, (2) detektor Refractive Index (RI), (3) detektor absorbansi model 440 dengan panjang gelombang 254 nm serta (4) pencetak model Waters 740 Data Modul.

c. Fermentasi sinambung produksi ABE

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari fermentasi curah, fermentasi sinambung dilakukan pada tiga tingkat laju dilusi yaitu 0,05, 0,10 dan 0,15 jam<sup>-1</sup>. Persiapan yang dilakukan berkenaan dengan hal ini adalah pembuatan medium fermentasi yang identik dengan medium fermentasi pada proses curah. Substrat yang digunakan untuk fermentasi sinambung adalah hidrolisat TKKS (kadar gula terfermentasi disesuaikan menjadi 40,0 g/l). Fermentasi pada laju dilusi 0,15 jam<sup>-1</sup> menggunakan campuran hidrolisat TKKS (kadar gula 32,89 g/l) dan glukosa (7,11 g/l). Fermentasi pada laju dilusi 0,10 jam<sup>-1</sup> menggunakan campuran hidrolisat TKKS dan glukosa dengan perbandingan kadar gula (36,21 g/l : 3,79 g/l) dan fermentasi pada laju dilusi 0,05 jam<sup>-1</sup> menggunakan hidrolisat TKKS sebanyak 40 g/l. Sterilisasi medium dilakukan bersamaan dengan sterilisasi matriks silika gel dan bioreaktor unggul diam. Pengisian matriks ke dalam bioreaktor di lakukan di dalam ruang steril (*clean bench*). Volume kerja bioreaktor setelah diisi matriks adalah 250 ml.



Tahap selanjutnya adalah menghilangkan oksigen di dalam bioreaktor dengan jalan mengalirkan gas nitrogen dari bagian bawah bioreaktor. Prosedur di atas dilakukan selama lebih kurang 15 menit. Pemasukkan medium fermentasi dan biakan propagasi ke dalam bioreaktor dilakukan dengan menggunakan pengaruh tekanan akibat aliran gas nitrogen.

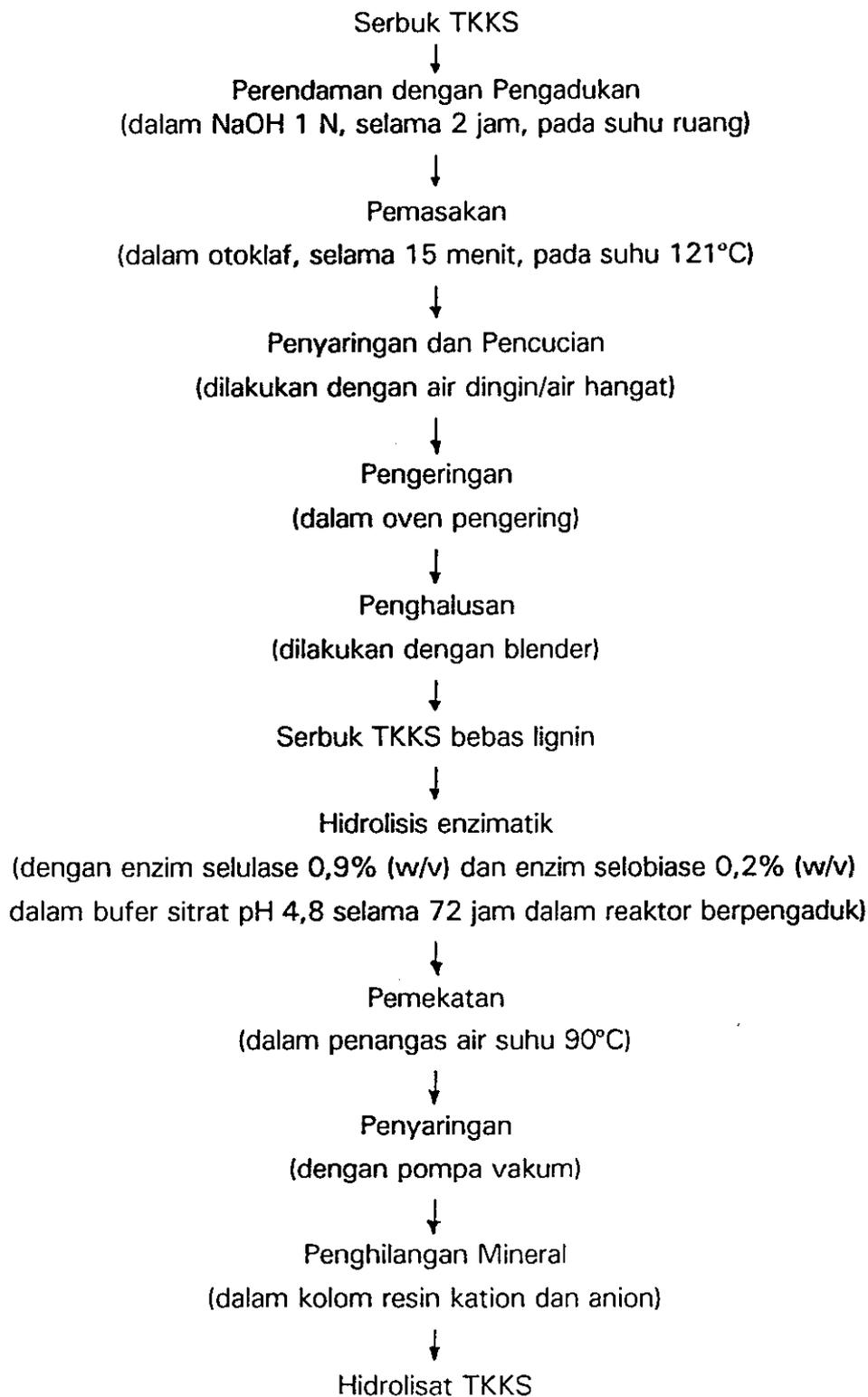
Sebelum fermentasi sinambung dimulai, dilakukan proses curah selama 24 jam untuk kemudian substrat dialirkan secara sinambung ke dalam bioreaktor dengan menggunakan pompa peristaltik. Debit alir substrat disesuaikan dengan laju dilusi yang ditetapkan. Fermentasi sinambung dilakukan selama tiga kali waktu tinggalnya (*retention time*).

Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke 0, 10, 20, 30, 45 dan 60 untuk fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,05 \text{ jam}^{-1}$ , jam ke 0, 10, 20, 25 dan 30 pada fermentasi dengan laju dilusi  $0,10 \text{ jam}^{-1}$ , serta jam ke 0; 10; 12,5; 15; 17,5 dan 20 untuk fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$ . Teknik pengambilan sampel dilakukan secara hati-hati sehingga kondisi anaerobik dan aseptik tetap terjaga.

Penanganan terhadap sampel dilakukan secara hati-hati karena komponen sampel terdiri dari bahan-bahan yang bersifat mudah menguap (*volatil*). Untuk itu diperlukan wadah yang ditempatkan dalam termos berisi es.

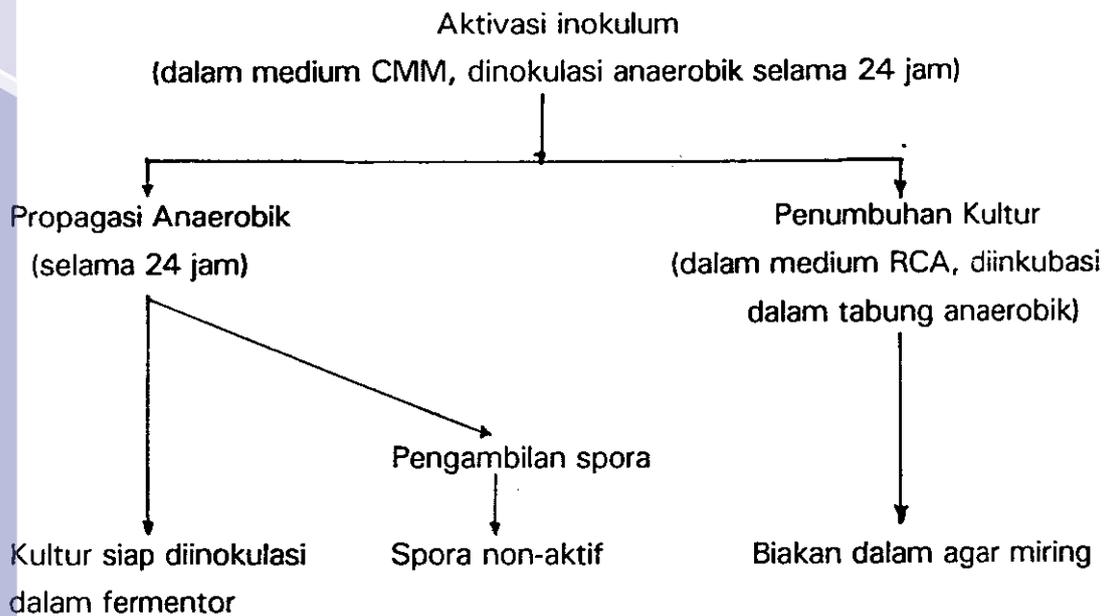
Diagram alir hidrolisis TKKS dapat dilihat pada Gambar 6. Tahap-tahap penanganan bakteri *C. acetobutylicum* dapat dilihat pada Gambar 7 sedangkan diagram alir fermentasi dapat dilihat pada Gambar 8.



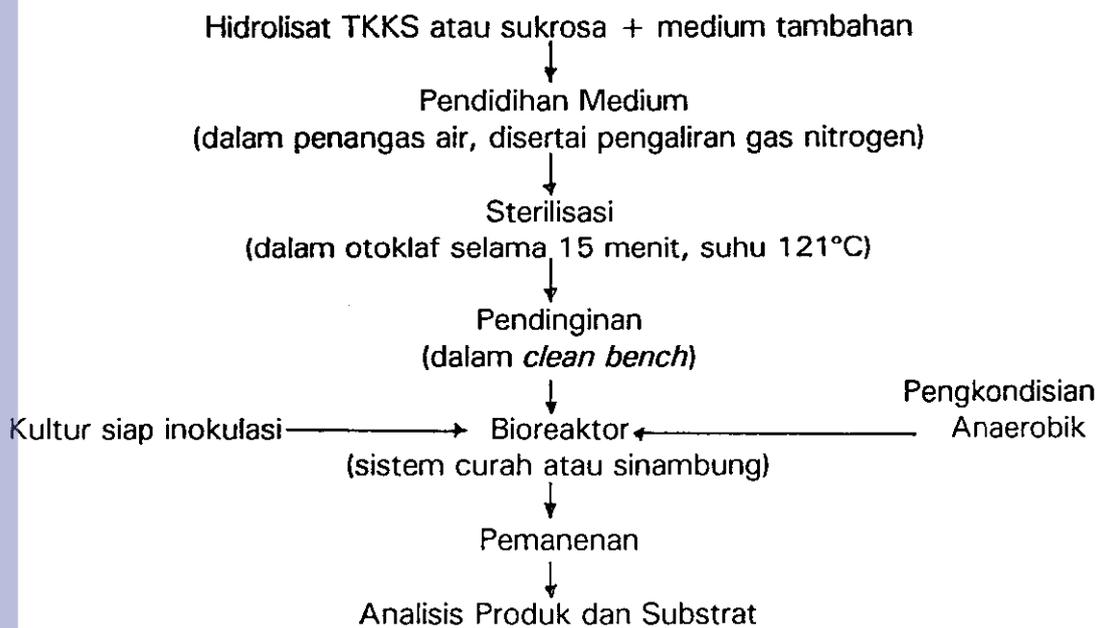


Gambar 6. Tahapan Hidrolisis TKKS





Gambar 7. Tahapan penanganan bakteri *C. acetobutylicum*



Gambar 8. Tahapan fermentasi ABE



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. PENELITIAN PENDAHULUAN

#### 1. Analisis Proksimat Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Sebagian besar komposisi Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) terdiri dari selulosa dan hemiselulosa yang membentuk serat dan dilingkupi oleh lapisan lignin yang kuat. Struktur seperti di atas adalah struktur yang umum terdapat pada kayu. Penampakan secara visual struktur tersebut pada TKKS, tidak persis seperti kayu, karena serat-serat TKKS lebih lunak dan liat.

Untuk keperluan analisis proksimat, ukuran TKKS dikurangi sampai menjadi serbuk halus berukuran 60 mesh. Pengecilan ukuran tersebut selain memudahkan penanganan, juga akan berpengaruh pada kemudahan hidrolisis. Komponen TKKS yang dianalisa adalah kadar selulosa, hemiselulosa, lignin dan abu.

Hasil analisis terhadap komposisi kimiawi TKKS ditujukan terutama untuk melihat besarnya kuantitas komponen selulosa dan hemiselulosa. Monomer-monomer dari polimer karbohidrat terstruktur ini sebagian besar adalah gula-gula yang dapat difermentasi (*fermentable sugar*). Hidrolisis terhadap bagian hemiselulosa terutama menghasilkan xilosa, sedangkan hidrolisis terhadap bagian selulosa akan menghasilkan glukosa dan selobiosa. Hasil analisis proksimat TKKS dapat di lihat pada Tabel 5.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel 5. Komposisi Tandan Kosong Kelapa Sawit yang digunakan dalam penelitian

Komposisi TKKS	Bahan awal (%) bk
Lignin	24,14
Selulosa	36,26
Hemiselulosa	19,14
Abu	5,92

Berdasarkan data hasil analisis proksimat, diketahui bahwa komponen selulosa merupakan komponen yang terbesar (36 persen). Perbedaan komposisi TKKS yang dipergunakan dalam penelitian ini dengan hasil analisis TKKS menurut Pratiwi *et al.* (1988) terletak pada komponen ligninnya. Komponen lignin pada TKKS yang dianalisa cukup besar (24,14 persen). Komponen lignin yang besar ini, menurut Haigler *di dalam* Nevell dan Zeronian (1985), akan menghambat proses hidrolisis. Hal ini disebabkan oleh fungsi lignin yang merupakan perekat yang menjalin selulosa dan hemiselulosa. Secara visual keberadaan lignin yang tinggi diketahui dari dinding sel yang kaku.

Namun demikian, lignin dapat dihidrolisa dengan menggunakan alkali. Basa atau alkali yang dipergunakan dalam hal ini haruslah basa kuat dengan konsentrasi tinggi. Penggunaan NaOH untuk menghilangkan lignin pada TKKS dilakukan oleh Anis *et al.* (1994). Penelitian tersebut telah dapat menunjang konversi serat TKKS menjadi glukosa sampai 90 persen konversi.



## 2. Hidrolisis TKKS

Hidrolisis TKKS terdiri atas dua tahap yaitu penghilangan lignin (delignifikasi) dan dilanjutkan dengan hidrolisis TKKS dengan menggunakan enzim. Tahap penghilangan lignin adalah tahap yang cukup menentukan. Semakin banyak lignin yang hilang, maka akan semakin mudah proses hidrolisis selulosa dilakukan.

Terdapat banyak metode yang digunakan untuk menghilangkan lignin yaitu secara termomekanis, semikimia dan kimia. Penggunaan bahan-bahan kimia untuk menghilangkan lignin sudah dilakukan sejak lama. Bahan-bahan kimia yang dapat digunakan untuk menghilangkan lignin antara lain senyawa hidroksida dari logam alkali, garam yang dilarutkan dalam basa kuat. Menurut Zeronian (1985), Natrium hidroksida (NaOH) adalah basa yang umum digunakan dalam industri untuk delignifikasi. Basa tersebut dapat menyebabkan mengembangnya struktur di dalam kristal (*intercrystalline swelling*) dan mengembangnya struktur antar kristal (*intracrystalline swelling*). Pengembangan ini terjadi sedemikian rupa sehingga menyebabkan ukuran serat bertambah dan kekuatan ikatan antar kristal menjadi berkurang. Menurut Tsao *et al.* (1978), penggunaan basa kuat juga dapat melarutkan lignin.

Penggunaan NaOH untuk penghilangan lignin yang dilakukan oleh Anis *et al.* (1994) memberikan hasil yang cukup baik. Metode penghilangan (delignifikasi) lignin yang diterapkan adalah perendaman dalam NaOH 0.5 N sampai 2.0 N (*soaking method*) dan pemasakan dengan NaOH 0.5



sampai 2.0 N (*boiling method*). Delignifikasi dengan metode perendaman dan pemasakan tersebut memberikan hasil yang berbeda. Berdasarkan hasil penelitiannya, Anis *et al.* (1994) menyimpulkan bahwa delignifikasi dengan perendaman dalam NaOH 1 N selama dua jam, memberikan hasil terbaik pada waktu sakarifikasi.

Delignifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini menghasilkan lignin yang berwarna hitam pekat. Untuk membersihkan serbuk TKKS dari lignin dilakukan penyaringan dan pencucian dengan air hangat. Pencucian dilakukan sampai serbuk benar-benar bersih dari lignin. Hasil dari tahap delignifikasi adalah serbuk TKKS dengan kadar lignin rendah dan kuantitas serbuk yang berkurang hampir 50 persen dari kuantitas awal.

Tahap selanjutnya setelah delignifikasi adalah hidrolisis enzimatik dengan menggunakan dua macam enzim, yaitu enzim selulase (endo glukonase dan selobiohidrolase) dan enzim selobiase ( $\beta$ -glukosidase). Kerja enzim-enzim tersebut adalah sinergis.

Hidrolisis enzimatik dilakukan di dalam bufer natrium sitrat pH 4,8. Penggunaan buffer sangat penting untuk proses-proses yang melibatkan enzim. Penggunaan buffer dimaksudkan agar tercapai kestabilan pH dalam sistem larutan. Menurut Girindra (1988), enzim yang merupakan katalisator di dalam setiap reaksi membutuhkan pH tertentu untuk aktivitas maksimumnya. Oleh karena itu sangat dibutuhkan sekali adanya kestabilan pH.



Hidrolisis enzimatis TKKS dilakukan dalam reaktor berpengaduk (*stirred reactor*) pada suhu 48°C selama 72 jam. Sistem perancangan (set up) hidrolisis enzimatis TKKS dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Sistem proses hidrolisis enzimatis TKKS dalam bufer Na-sitrat, suhu 48°C, selama 72 jam.

Faktor lain yang juga mempengaruhi hidrolisis adalah suhu. Kombinasi pH dan suhu yang tepat akan menyebabkan kerja enzim optimal. Suhu yang optimal untuk hidrolisis enzimatis TKKS adalah 48°C. Dalam penelitian ini, suhu dipertahankan konstan dengan cara merendam reaktor dalam penangas yang suhunya dapat dikontrol.



Hasil akhir hidrolisis enzimatis TKKS adalah beningan yang mengandung komponen gula terfermentasi. Gula-gula tersebut antara lain glukosa, selobiosa, xilosa dan arabinosa. Kuantitas komponen gula hasil hidrolisis selanjutnya diukur dengan metode Miller (1959). Hasil pengukuran kadar gula pereduksi pada hidrolisat yang diperoleh pada empat kali hidrolisis menunjukkan adanya peningkatan. Hal ini terjadi karena perbaikan teknik pelaksanaan hidrolisis termasuk pemekatan dan penyaringan. Kadar gula pereduksi pada hidrolisat yang diukur dengan menggunakan standar glukosa dapat dilihat pada Tabel 6 .

Tabel 6. Kadar gula pereduksi dari hidrolisat TKKS

Hidrolisis ke	Kadar gula pereduksi <sup>a</sup> (g/l)
1	4,63
2	10,94
3	12,07
4	22,35

<sup>a</sup> Standar gula pereduksi yang digunakan adalah glukosa  
Hasil ini dihitung setelah dilakukan pemekatan

Kadar gula pereduksi yang diukur dengan menggunakan standar glukosa tidak menunjukkan jumlah gula pereduksi sebenarnya. Penggunaan standar glukosa hanya menunjukkan kadar glukosa saja yang terukur, gula pereduksi yang lainnya tidak terukur. Padahal di dalam hidrolisat TKKS terdapat gula pereduksi lain yaitu selobiosa dan xilosa. Berdasarkan metode pengukuran gula pereduksi yang dikembangkan Miller *di dalam* Apriyantono *et al.* (1989), standar glukosa dapat digunakan untuk menentukan kadar



selobiosa dan xilosa. Jika glukosa digunakan sebagai standar, maka untuk menentukan selobiosa, nilai yang diperoleh 15 persen lebih rendah dari yang sebenarnya, sedangkan untuk silosa 15 persen lebih tinggi. Berdasarkan pendekatan tersebut, dapat diketahui jumlah gula pereduksi dalam tiap hidrolisat adalah 13,89; 32,82; 36,21 dan 67,05 g/l.

### 3. Penanganan Bakteri Anaerobik

Bakteri *Clostridium acetobutylicum* termasuk kelompok bakteri yang bersifat anaerobik obligat. Ciri ini dapat diketahui dari pola pertumbuhan biomassa yang menumpuk di bagian bawah tabung. Menurut Dwidjoseputro (1989), jika diinokulasikan dalam medium cair, bakteri anaerobik obligat akan tumbuh mengelompok di dasar tabung. Teknik yang digunakan untuk mengkondisikan suasana anaerobik dalam penelitian ini adalah pengusiran oksigen dengan menggunakan gas nitrogen. Secara teknis hal ini dilakukan dengan mengalirkan gas nitrogen ke dalam tabung atau ruang anaerobik.

Selama tahap aktivasi, aktifitas *C. acetobutylicum* dapat diketahui dari munculnya gelembung-gelembung gas yang menumpuk di bagian atas medium. Kultur yang sangat aktif bahkan dapat mengangkat padatan medium sampai ke bagian atas tabung. Kultur aktif *C. acetobutylicum* dapat dilihat pada Gambar 10. Ciri-ciri berhasilnya tahap propagasi diketahui dari bertumpuknya buih di bagian atas erlenmeyer, dan berkumpulnya biomassa pada bagian bawah medium.





Gambar 10. Kultur aktif *C. acetobutylicum*

Beberapa tahap yang menentukan dalam penanganan bakteri anaerobik antara lain (1) pembuatan medium, (2) sterilisasi dan (3) inokulasi. Medium pertumbuhan bagi *C. acetobutylicum* berbeda-beda untuk tiap tahap penanganan. Menurut Lundie dan Drake (1984), bakteri anaerobik selain membutuhkan sumber karbon dan energi, juga membutuhkan medium-medium yang mengandung ekstrak ragi, *tryptone*, vitamin, mineral dan bahan pereduksi. Medium pertumbuhan *C. acetobutylicum* yang digunakan oleh Kanchanatawee *et al.* (1992) cukup memenuhi persyaratan di atas. Sumber karbon dalam medium Kanchanatawee *et al.* (1992) diperoleh dari glukosa, kebutuhan vitamin dipenuhi oleh biotin, mineral dipenuhi dari garam-



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

garam sulfat dan posfat, sumber protein dipenuhi dari asam amino benzoat dan ekstrak ragi serta sistein sebagai bahan pereduksi.

Menurut Ljungdahl dan Wiegel (1983), terdapat beberapa cara yang dilakukan untuk mensterilkan medium anaerobik. Cara pertama adalah mensterilkan dalam otoklaf 121°C selama 15 menit setelah sebelumnya medium dibebaskan dari oksigen dengan cara seperti dijelaskan Bryant (1972). Cara lain adalah dengan mensterilkan beberapa kelompok medium secara terpisah untuk kemudian digabungkan secara anaerobik. Apabila dapat dihindari terjadinya kerusakan bahan akibat sterilisasi, misalnya karamelisasi (terjadi bila karbohidrat bersama dengan asam amino dipanaskan), maka sterilisasi medium sekaligus, lebih praktis.

Inokulasi bakteri anaerobik pada prinsipnya hampir sama dengan inokulasi bakteri aerobik. Hanya bedanya pekerjaan inokulasi bakteri anaerobik dilakukan dalam kondisi bebas oksigen. Untuk keperluan ini diperlukan alat bantu semacam kotak anaerobik dengan perangkat sarung tangan (*anaerobic box with gloves*). Untuk membuat kotak anaerobik ini bebas dari oksigen, maka sebelumnya dilakukan penghampaan ruangan untuk kemudian dialirkan gas nitrogen ke dalamnya. Dengan alat bantu ini pekerjaan inokulasi bisa dilakukan lebih leluasa.

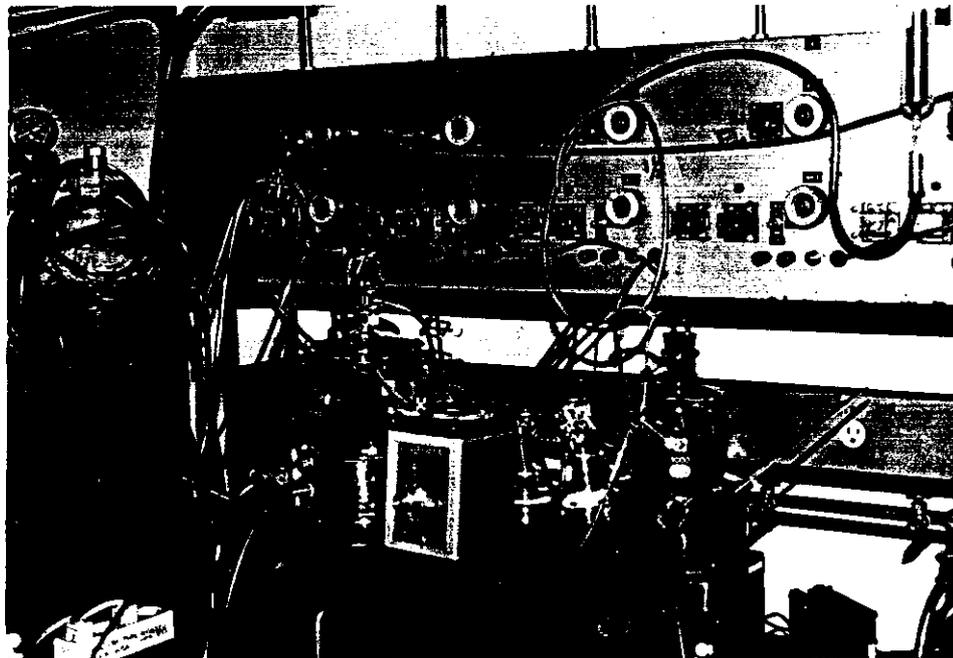
#### 4. Perancangan Sistem Fermentasi Anaerobik

Prinsip utama dari perancangan sistem fermentasi anaerobik adalah meniadakan oksigen pada tempat-tempat yang berhubungan langsung dengan



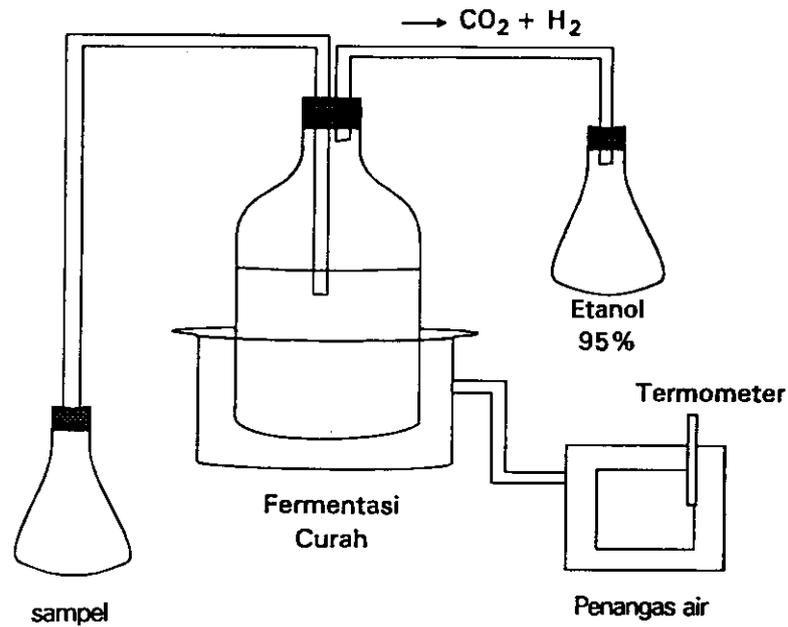
mikroorganisme. Alat-alat seperti bioreaktor (curah dan sinambung), tabung gas nitrogen, tabung-tabung pembantu (tabung substrat, penampung gas), pemanas air, serta sistem perpipaan disusun sedemikian rupa sehingga membentuk suatu sistem yang saling terkait. Perancangan sistem fermentasi ini dimaksudkan untuk memudahkan pelaksanaan fermentasi, sampling dan kegiatan-kegiatan lainnya.

Hal yang sangat penting dari sistem fermentasi anaerobik ini adalah menjaga kondisi fermentasi agar senantiasa bebas dari oksigen. Untuk itu setiap lubang perpipaan dibuat tertutup atau dicelupkan dalam alkohol dan tekanan di dalam reaktor dibuat lebih besar dari tekanan di luar. Skema sistem fermentasi anaerobik untuk proses curah dan sinambung dapat dilihat pada Gambar 11, 12, 13 dan Gambar 14.



Gambar 11. Sistem Fermentasi curah produksi ABE





Gambar 12. Skema sistem fermentasi curah produksi ABE

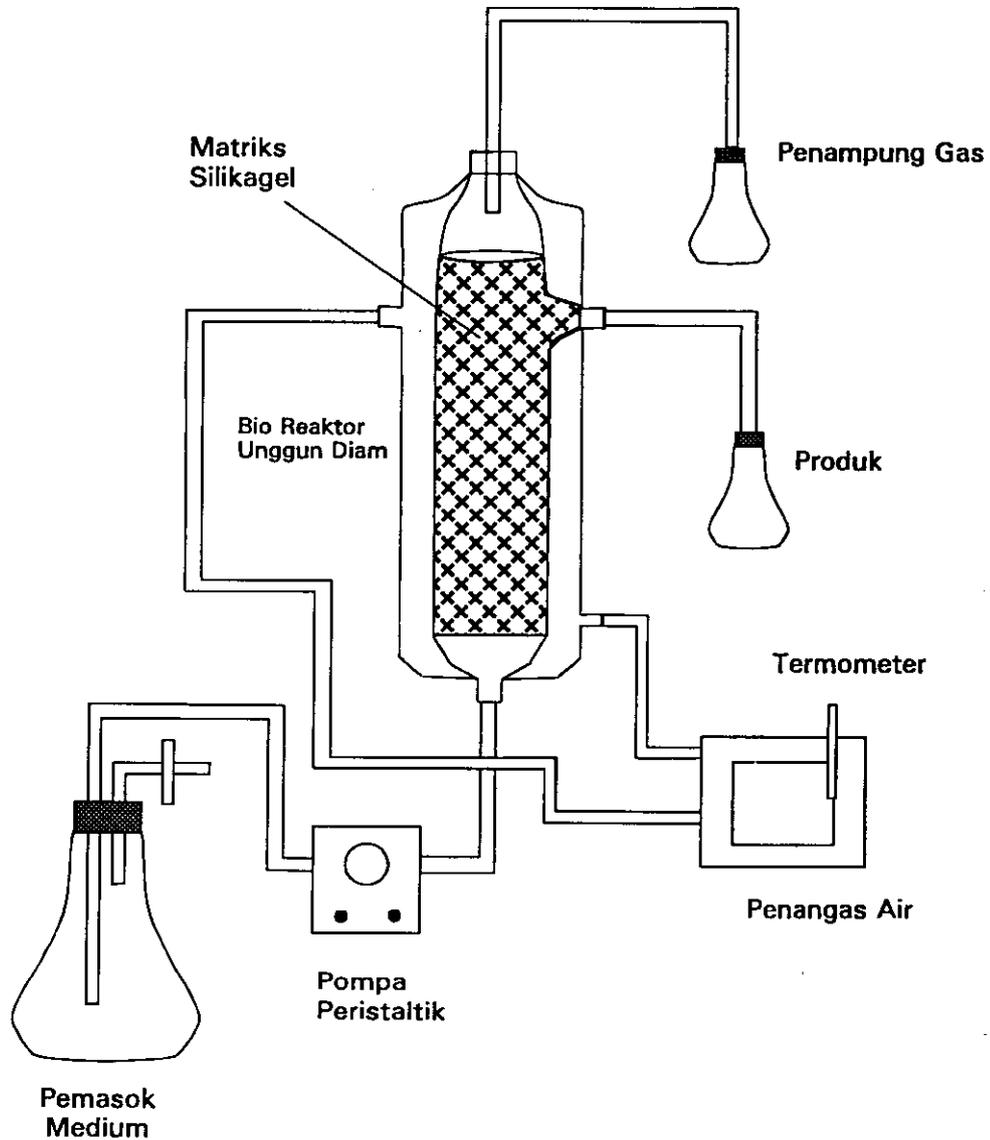


Gambar 13. Sistem fermentasi sinambung produksi ABE dalam bio-reaktor unggun diam



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 14. Skema sistem fermentasi sinambung produksi ABE dalam bioreaktor unggun diam



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## B. PENELITIAN UTAMA

### 1. Fermentasi Curah Aseton-Butanol-Etanol

Fermentasi sistem curah adalah sistem fermentasi yang paling sederhana. Fermentasi curah merupakan contoh sistem tertutup yang melibatkan medium dengan jumlah dan jenis tertentu. Pada fermentasi curah terdapat satu waktu di mana mikroorganisme beradaptasi. Hal ini biasanya terjadi beberapa saat setelah inokulasi. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan sel yang lambat (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Penelitian tentang fermentasi curah ABE cukup banyak dan beragam. Penelitian yang secara khusus mempelajari tentang fermentasi sistem curah untuk produksi ABE adalah seperti yang dilakukan oleh Fond *et al.* (1986). Penelitian tersebut mengkaji pemanfaatan glukosa, xilosa dan campuran glukosa-xilosa. Nilai rendemen pelarut terhadap gula terbaik yang dicapai dalam penelitian tersebut adalah 33 persen pada pemanfaatan campuran 25 g glukosa dan 52 g xilosa per satu liter larutan. Jumlah butanol terbesar yang dicapai dalam penelitian tersebut hampir 15 g/l.

Substrat campuran xilosa dan glukosa yang dipergunakan dalam penelitian di atas adalah xilosa dan glukosa murni. Penggunaan xilosa dan glukosa murni dapat digantikan dengan penggunaan hidrolisat TKKS. Hasil hidrolisis TKKS mengandung glukosa, xilosa, selobiosa (Lampiran 4). Semua karbohidrat tersebut adalah gula-gula yang dapat difermentasi (*fermentable sugar*).

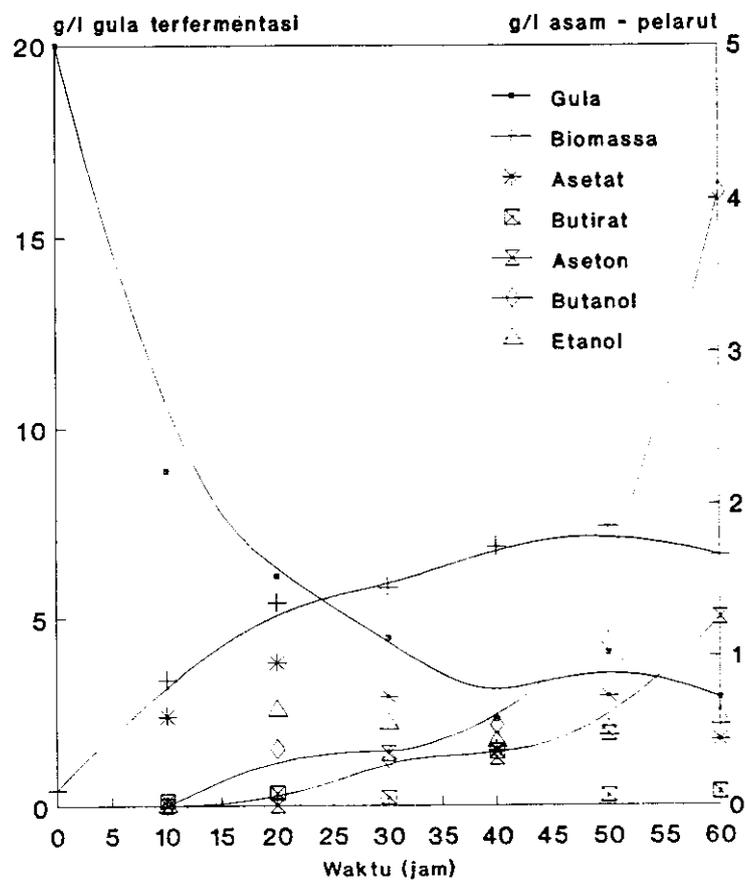


Secara umum, hidrolisat TKKS dapat digunakan sebagai substrat fermentasi. Hanya saja keberhasilan penggunaan hidrolisat tersebut sangat tergantung pada keberhasilan memperoleh hidrolisat yang kaya akan gula yang dapat difermentasi. Kadar gula terfermentasi dari hidrolisat TKKS yang berhasil diperoleh dalam penelitian ini berkisar antara 13,89 sampai 67,05 g/l.

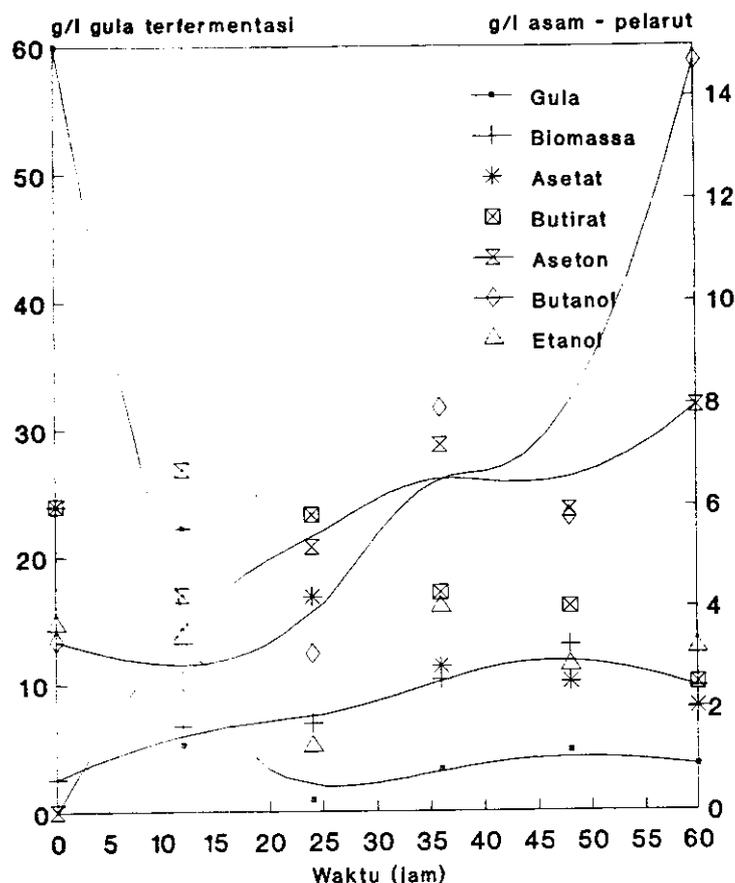
Fermentasi curah dengan substrat hidrolisat TKKS dan substrat sukrosa tidak berbeda jauh dengan fermentasi curah yang menggunakan gula-gula terfermentasi lainnya. Hal ini dapat dilihat pada pola pertumbuhan biomassa, pembentukan produk dan penggunaan substrat (Gambar 14 dan 15). Pola pertumbuhan biomassa diawali dengan fase adaptasi sampai kira-kira 10 jam fermentasi untuk kemudian memasuki fase logaritmik hingga jam ke 30. Fase pertumbuhan stasioner dimulai pada jam ke 30 ini hingga mencapai fase kematian pada sekitar jam ke 50. Butanol sebagai produk utama mulai diproduksi secara maksimal setelah pertumbuhan biomassa mulai menurun. Penurunan pertumbuhan biomassa selain diakibatkan oleh kondisi substrat yang sudah tidak mendukung, juga disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi butanol. Menurut Roffler *et al.* (1987) butanol dapat menghambat proses fermentasi. Penghambatan pertumbuhan sel sampai 50 persen, menurut Guttirez dan Maddox (1992) dapat terjadi bila konsentrasi butanol dalam sistem mencapai 7 - 13 g/l. Hasil selengkapnya dari fermentasi curah ABE dalam bentuk kurva dapat dilihat pada Gambar 15 dan 16.



Jumlah butanol maksimal yang dihasilkan pada fermentasi dengan substrat hidrolisat TKKS (20 g/l gula terfermentasi) adalah 4,4 g/l dengan substrat terkonsumsi sebesar 17,13 g/l. Pada fermentasi curah dengan substrat sukrosa 60 g/l, butanol yang diproduksi adalah 14,68 g/l dengan jumlah gula terkonsumsi 56,4 g/l.



Gambar 15. Kinetika fermentasi curah ABE pada substrat campuran hidrolisat TKKS (kadar gula ekuivalen awal 13,89 g/l) dan glukosa (6,11 g/l)



Gambar 16. Kinetika fermentasi curah ABE pada substrat sukrosa (kadar sukrosa awal 60 g/l)

Berdasarkan pola pertumbuhan biomassa, pembentukan produk, dan penggunaan substrat yang tampak pada Gambar 15 dan Gambar 16, dapat diketahui bahwa pola pertumbuhan *Clostridium acetobutylicum* mengikuti pola pertumbuhan campuran. Pola demikian menggambarkan sebagian pembentukan produk berasosiasi dengan pertumbuhan biomassa, tetapi pada fase yang lain pembentukan produk tidak berasosiasi dengan pertumbuhan biomassa. Ciri pola pertumbuhan campuran tersebut menurut Wang *et al.* (1978) ditandai dengan terbentuknya produk yang maksimal pada

saat pertumbuhan minimum. Pada Gambar 15 dan Gambar 16 dapat dilihat terbentuknya produk maksimal, yaitu 4,4 g/l butanol pada substrat campuran hidrolisat TKKS dengan glukosa, dan 14,68 g/l butanol pada substrat sukrosa, dimulai pada saat pertumbuhan biomassa mulai menurun (di atas jam ke 50).

Menurut Bailey dan Ollis (1977) pembentukan aseton dan butanol berada dalam satu jalur katabolik dengan pembentukan etanol. Dalam jalur katabolik tersebut etanol terbentuk lebih dulu daripada aseton dan butanol. Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa etanol terbentuk setelah terbentuknya asetil-CoA, sementara aseton dan butanol terbentuk satu tahap lebih jauh yaitu setelah terbentuknya asetoasetil-CoA.

Selain pelarut, dalam fermentasi ABE juga terbentuk produk antara yaitu asam asetat dan asam butirat. Pembentukan produk antara tersebut adalah merupakan hal yang lazim dalam beberapa fermentasi. Asam asetat diproduksi setelah terbentuknya asetil-CoA dan asam butirat diproduksi setelah terbentuknya asetoasetil-CoA. Menurut Gottschalk dan Gruppe (1992) asetat dan butirat dapat masuk kembali ke dalam siklus biokimia pembentukan pelarut. Asetat dikonversi kembali menjadi asetil CoA dan butirat menjadi butiril CoA. Hal inilah yang menyebabkan adanya dua tahap dalam fermentasi ABE, yaitu tahap asidogenesis dan solventogenesis.

Selama tahap asidogenesis, terjadi pembentukan asam asetat dan butirat. Selama tahap ini terjadi penurunan pH hingga mencapai 4,5. Tahap asidogenesis terjadi lebih dahulu karena dalam pembentukan asam-



asam ini tidak melibatkan enzim. Konsentrasi asam maksimal yang terbentuk pada fermentasi curah dengan menggunakan substrat hidrolisat TKKS adalah 0,95 g/l asam asetat dan 0,36 g/l asam butirat. Pada fermentasi dengan menggunakan substrat sukrosa terbentuk asam asetat maksimal sebanyak 6,0 g/l dan 6,71 g/l asam butirat.

Tahap selanjutnya setelah asidogenesis adalah solventogenesis, yaitu tahap pembentukan pelarut. Pada tahap ini pH mulai naik karena terjadi sejumlah konsumsi asam. Untuk membentuk butanol melibatkan enzim *butiraldehid dehidrogenase*, sedangkan untuk membentuk aseton melibatkan enzim *CoA transferase* dan *asetoasetat dekarboksilase*. Di dalam fermentasi curah, pertukaran fase asidogenesis menjadi solventogenesis ditandai dengan turunnya konsentrasi asam atau naiknya nilai pH. Perubahan-perubahan tersebut umumnya terjadi pada sekitar jam ke 50.

Fermentasi ABE juga menghasilkan sejumlah buih yang cukup banyak. Sebagian besar buih tersebut adalah gas  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2$ . Berdasarkan jalur biokimiawi produksi ABE, diketahui bahwa gas  $\text{CO}_2$  terbentuk bersamaan dengan terbentuknya asetil-CoA dan etanol, sedangkan  $\text{H}_2$  terbentuk pada waktu perubahan piruvat menjadi asetil-CoA. Bagi fermentasi anaerobik, adanya buih tersebut justru menguntungkan, karena dapat menghambat jalan masuk udara yang mungkin terjadi, ke dalam sistem fermentasi.

Fenomena yang cukup penting dari fermentasi aseton-butanol-etanol adalah terjadinya penurunan konsentrasi biomassa sel menjelang 60 jam



fermentasi. Konsentrasi biomassa maksimal yang diperoleh pada fermentasi curah dengan substrat hidrolisat TKKS adalah 1,85 g/l yang terbentuk pada jam ke 50. Pada fermentasi dengan substrat sukrosa, terbentuk biomassa maksimal 3,25 g/l pada jam ke 50. Pada kedua fermentasi tersebut, konsentrasi biomassa mulai menurun. Dengan adanya keterbatasan ini, fermentasi ABE yang menunjukkan hasil terbaik belum pernah dilaksanakan melebihi 60 jam fermentasi. Alasan paling kuat terhadap terjadinya penurunan konsentrasi biomassa sel adalah karena sel mengalami lisis. Fenomena sel yang lisis adalah fenomena yang umum terjadi pada mikroorganisme yang menghasilkan spora. Menurut Dwidjoseputro (1978), pada saat konsentrasi medium sudah buruk, ditambah dengan kehadiran zat beracun, maka endospora mulai terbentuk. Pembentukan endospora yang sempurna akan diikuti oleh pecahnya dinding sel.

Secara visual spora yang terbentuk terlihat sebagai padatan halus yang berwarna putih dan menumpuk pada dasar medium. Jika fermentasi diteruskan, spora tersebut akan bertambah banyak dan larutan fermentasi menjadi keruh.

## 2. Pengaruh Perbedaan Jenis dan Konsentrasi Substrat Pada Fermentasi Curah ABE

Perbedaan jenis substrat yang digunakan dalam fermentasi ABE memberikan pengaruh pada beberapa nilai parameter kinetika. Nilai-nilai parameter kinetika fermentasi curah pada substrat hidrolisat TKKS dan



substrat sukrosa yang dilakukan dalam bioreaktor curah berupa botol dengan sumbat dilengkapi selang silikon, dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Parameter kinetika fermentasi curah

Parameter yang diukur	Substrat	
	Hidrolisat TKKS dan glukosa	Sukrosa
Kadar gula substrat awal (g/l)	20,00	60,00
$\mu$ (maks)	0,20	0,08
Biomassa maksimum (g/L)	1,85	3,25
Aseton (g/L)	1,25	7,94
Butanol (g/L)	4,40	14,68
Etanol (g/L)	0,58	3,19
Asam asetat (g/L)	0,44	2,03
Asam butirat (g/L)	0,10	2,50
Gula terkonsumsi (g/L)	17,13	56,40
Y(p/s)	0,34	0,33
$r$ (maks), Laju pembentukan butanol maksimal(g/L jam)	1,06	0,56
$\sigma$ (maks), Laju penggunaan substrat maksimal (g/L jam)	3,08	1,68

Dari Tabel 7 dapat diketahui bahwa penggunaan hidrolisat TKKS dan sukrosa sebagai substrat fermentasi memberikan nilai Y(p/s) yang tidak jauh berbeda. Hal ini disebabkan karena sukrosa maupun hidrolisat TKKS tergolong sebagai gula yang bukan monosakarida atau tidak sepenuhnya monosakarida. Meskipun di dalam hidrolisat TKKS terdapat monosakarida, tetapi masih mengandung disakarida seperti selobisa. Namun demikian

secara keseluruhan, perbedaan penggunaan jenis substrat pada fermentasi curah mempengaruhi parameter kinetika fermentasi yang lainnya.

Berdasarkan penelitian sebelumnya dapat dilihat adanya pengaruh tersebut. Pada Tabel 8 dapat dilihat hasil-hasil terbaik fermentasi curah berdasarkan nilai parameter kinetika pada beberapa jenis substrat yang digunakan. Dari Tabel 8 dapat diketahui bahwa nilai rendemen terbaik (0,47) diperoleh pada penggunaan xilosa sebagai substrat fermentasi. Nilai rendemen sebesar itu diperoleh pada laju pertumbuhan biomassa maksimum yang cukup rendah, yaitu 0,13 g/l. Pada substrat glukosa nilai rendemen tidak begitu tinggi namun nilai  $\mu$  maksimum cukup tinggi. Laktosa yang tergolong disakarida berhasil difermentasi dengan rendemen dan  $\mu$  maksimum cukup tinggi. Substrat campuran glukosa dan xilosa memberikan hasil berupa nilai rendemen dan  $\mu_{maks}$  yang tidak begitu tinggi. Menurut Fond *et al.* (1986) adanya konsentrasi xilosa yang tinggi menyebabkan waktu pertumbuhan sel berlangsung lebih lama sehingga konsentrasi biomassa menjadi tinggi. Hal ini terjadi karena xilosa menjadi pilihan pertama untuk digunakan dalam pertumbuhan sel. Keadaan di atas mengakibatkan penguraian (katabolisme) terhadap glukosa menjadi pelarut berlangsung cepat dan akumulasi asam pada medium menjadi berkurang.



Tabel 8. Beberapa parameter kinetika fermentasi curah ABE pada berbagai jenis substrat

Parameter kinetika	Jenis Susbtrat			
	Laktosa <sup>a</sup>	Glukosa <sup>b</sup>	Xilosa <sup>b</sup>	Glukosa + Xilosa <sup>b</sup>
Konsentrasi awal substrat (g/l)	45	62	50	25 + 52
$\mu$ (maks)	0,31	0,20	0,13	0,17
$Y(p/s)$ , Rendemen	0,41	0,32	0,47	0,33
$\pi$ (maks), Laju pembentukan butanol maksimal(g/L jam)	0,37	-	-	-
$\sigma$ (maks), Laju penggunaan substrat maksimal (g/L jam)	0,90	-	-	-

<sup>a</sup>Ennis dan Maddox (1987)

<sup>b</sup>Fond *et al.* (1986)

Jika dibandingkan antara penggunaan substrat campuran hidrolisat TKKS dan glukosa dengan campuran glukosa dan xilosa pada penelitian Fond *et al.* (1986), ternyata nilai rendemen yang dihasilkan tidak jauh berbeda. Demikian juga halnya dengan nilai  $\mu_{maks}$ . Pengaruh perbedaan jenis substrat dalam penelitian ini terlihat jelas pada nilai  $\mu_{maks}$  yang dihasilkan. Nilai  $\mu_{maks}$   $0,202 \text{ jam}^{-1}$  diperoleh pada penggunaan hidrolisat TKKS sebagai substrat fermentasi. Pada penggunaan sukrosa sebagai substrat fermentasi hanya diperoleh nilai  $\mu_{maks}$   $0,079 \text{ jam}^{-1}$ . Hal ini menunjukkan bahwa gula terfermentasi yang terdapat dalam hidrolisat TKKS lebih banyak digunakan untuk pertumbuhan biomassa. Kenyataan ini ditunjang dengan adanya laju penggunaan substrat hidrolisat TKKS yang cukup besar ( $3,10 \text{ g/l jam}$ ).

Pengaruh perbedaan konsentrasi substrat memberikan dampak pada konsentrasi butanol yang diproduksi. Dengan konsentrasi gula terfermentasi 20 g/l pada substrat hidrolisat TKKS, hanya diperoleh 4,4 g/l butanol. Sementara itu penggunaan 60 g/l sukrosa sebagai substrat fermentasi mampu diproduksi 14,7 g/l butanol. Demikian halnya terhadap asam yang diproduksi. Pada akhir fermentasi diperoleh sekitar 0,5 g/l pada pemanfaatan hidrolisat TKKS dan 4,53 g/l pada penggunaan sukrosa sebagai substrat fermentasi. Prosentase pelarut pada fermentasi curah dengan substrat hidrolisat TKKS adalah 20,1 persen aseton, 70,6 persen butanol dan 9,3 persen etanol. Pada penggunaan substrat sukrosa, prosentase pelarutnya adalah 30,8 persen aseton, 56,9 persen butanol dan 12,3 persen etanol.

### 3. Fermentasi Sinambung Aseton-Butanol-Etanol

Fermentasi sinambung ABE seperti dijelaskan oleh Kanchanatawee *et al.* (1992) dilakukan untuk tujuan meningkatkan produktivitas fermentasi. Dalam beberapa hal fermentasi secara sinambung lebih menguntungkan dibanding fermentasi sistem curah. Dengan fermentasi secara sinambung dapat dilakukan perpanjangan masa fermentasi sampai jauh di atas masa fermentasi sistem curah. Dengan cara ini, menurut Stanbury dan Whitaker (1984), fase pertumbuhan eksponensial dari fermentasi curah dapat diperpanjang.



Di dalam kultur sinambung medium segar ditambahkan secara sinambung ke dalam sistem fermentasi dan sejumlah volume yang sama dikeluarkan dari sistem fermentasi. Dengan cara ini volume kultur total yang tersisa tetap sama (Primorse, 1987). Faktor penting yang perlu diketahui sebelum pelaksanaan sistem sinambung adalah laju dilusi, berdasarkan nilai laju dilusi dapat diketahui waktu tinggal fermentasi sinambung.

Dengan menggunakan pendekatan berdasarkan nilai  $\mu$  maksimum yang diperoleh selama fermentasi curah ditetapkan laju dilusi yang dipergunakan adalah  $0,05 \text{ jam}^{-1}$ ;  $0,10 \text{ jam}^{-1}$  dan  $0,15 \text{ jam}^{-1}$ . Nilai-nilai laju dilusi ini berada di bawah nilai laju pertumbuhan spesifik maksimalnya ( $\mu$  maks), yaitu  $0,202 \text{ jam}^{-1}$ .

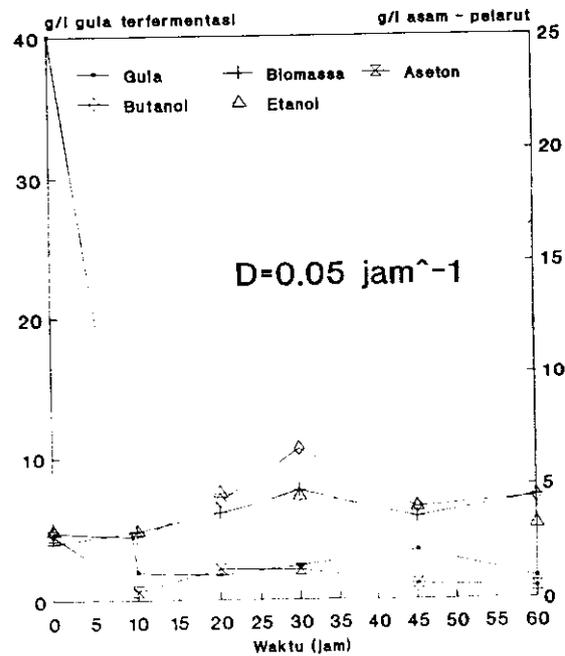
Fermentasi sinambung dilaksanakan selama tiga kali waktunya. Lama fermentasi untuk laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$  adalah 20 jam, untuk laju dilusi  $0,10 \text{ jam}^{-1}$  fermentasi dilaksanakan selama 30 jam dan 60 jam untuk laju dilusi  $0,05 \text{ jam}^{-1}$ .

Penggambaran kurva hubungan antara waktu fermentasi dengan beberapa parameter dalam fermentasi sinambung dapat dilihat pada Gambar 17, 18 dan Gambar 19. Secara umum pola penurunan konsentrasi substrat pada fermentasi sinambung tidak jauh berbeda dengan fermentasi curah. Ciri yang paling jelas dari pola penurunan konsentrasi substrat ini adalah terjadinya konsumsi sejumlah besar substrat pada awal-awal fermentasi untuk kemudian konsumsi ini menurun pada masa-masa setelahnya. Hal ini bisa jadi disebabkan oleh beberapa hal antara lain, kebutuhan untuk

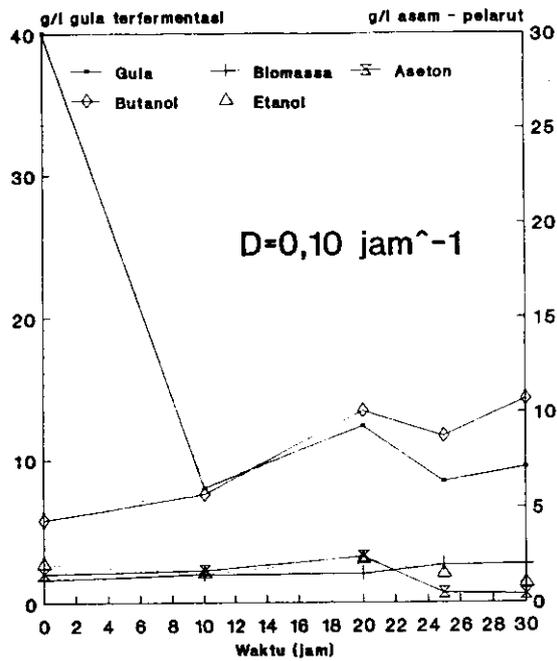


pertumbuhan, dan kebutuhan untuk memproduksi sejumlah asam. Konsumsi substrat yang tidak terlalu besar pada masa-masa fermentasi selanjutnya dapat terjadi karena adanya konsumsi asam yang terbentuk di pertengahan masa fermentasi.

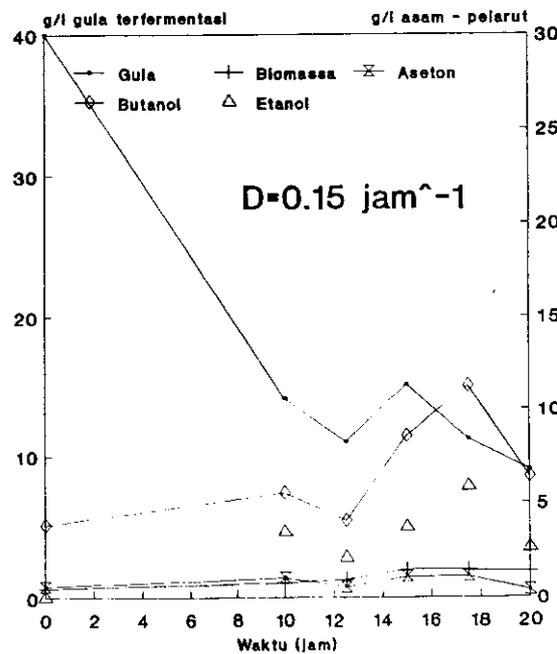
Perbedaan pola pertumbuhan biomassa, pembentukan pelarut antara fermentasi curah dan fermentasi sinambung sangat jelas. Pada fermentasi sinambung, pola-pola perubahan konsentrasi biomassa relatif konstan. Hal ini dikarenakan telah dicapainya kondisi tunak (*steady state*). Demikian halnya dengan produksi pelarut. Adanya pemasukan secara sinambung substrat menyebabkan produksi pelarut relatif lebih konstant. Hal ini memungkinkan untuk melaksanakan fermentasi sinambung sampai batas waktu jauh melebihi waktu fermentasi curah.



Gambar 17. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut dalam fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,05 \text{ jam}^{-1}$



Gambar 18. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut dalam fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,10 \text{ jam}^{-1}$



Gambar 19. Pola perubahan konsentrasi substrat dan pelarut pada fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$

Faktor yang terpenting dari pelaksanaan fermentasi sinambung adalah keberhasilan dalam mempertahankan kondisi tunak. Untuk itu sistem fermentasi perlu dirancang dengan baik. Pada penelitian ini, faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi sinambung dibuat mantap. Untuk mempertahankan suhu 34°C, dialirkan air hangat melewati dinding bioreaktor yang terbungkus *jacket*. Untuk mempertahankan debit alir substrat yang tetap, laju alir diatur kecepatannya dengan pompa peristaltik. Untuk mempertahankan kondisi anaerobik, sistem perpipaan dibuat hingga tidak ada jalan masuk udara. Hal ini dilakukan dengan menyumbat pipa dan merendamnya dalam cairan etanol 95 persen.

Sama halnya dengan fermentasi curah, selama fermentasi sinambung diproduksi sejumlah gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> hanya tidak sebanyak yang diproduksi oleh fermentasi curah. Hal ini terjadi karena adanya aliran substrat yang membuat partikel gas pecah sehingga gas tidak terlihat seperti menumpuk.

Penggunaan matriks silika gel dengan ukuran diameter partikel 2 - 4 mm cukup baik. Dalam penggunaannya, matriks silika gel perlu di-nonaktifkan terlebih dahulu. Hal ini dapat dilakukan dengan cara merendam dalam air dan dikeringkan dengan oven. Secara umum, matriks silika gel mampu memerangkap sel dalam bioreaktor. Hal ini secara fisik terlihat jelas jika dilihat dari sisi bioreaktor. Biomassa sel yang berwarna putih banyak berkumpul di sela-sela partikel matriks. Hal yang cukup penting dalam penggunaan matriks pada bioreaktor unggul diam adalah diusahakannya



agar biomassa menyebar ke seluruh bioreaktor. Penyebaran biomassa penting untuk efektivitas penggunaan substrat. Hal ini dapat dilakukan dengan mengalirkan gas nitrogen sebelum pelaksanaan fermentasi, yaitu pada masa inkubasi awal (24 jam fermentasi curah sebelum fermentasi sinambung dimulai).

#### 4. Pengaruh Perbedaan Laju Dilusi

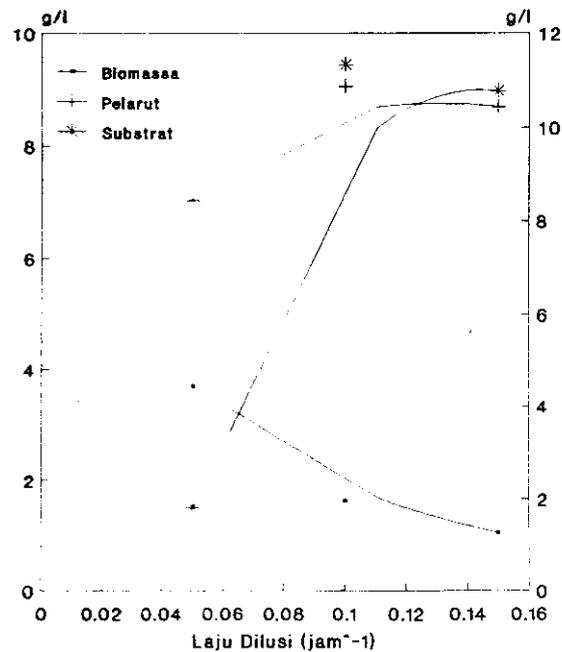
Faktor yang cukup penting dalam fermentasi sinambung adalah laju dilusi. Pemilihan laju dilusi yang tidak tepat akan menyebabkan fermentasi berlangsung tidak optimal. Dalam penelitian-penelitian mencari laju dilusi optimal, biasanya diperoleh melalui uji coba pada selang-selang laju dilusi tertentu. Pengaruh laju dilusi yang cukup tampak adalah pada pola pertumbuhan biomassa, dan pembentukan produk. Jika nilai laju dilusi semakin mendekati nilai laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu_{maks}$ ) maka konsentrasi biomassa akan jauh berkurang karena besar kemungkinan terjadi pencucian (*wash out*). Akan halnya produk yang terbentuk, peningkatan laju dilusi akan meningkatkan produksi sampai pada laju dilusi tertentu. Jika laju dilusi mendekati nilai  $\mu$  maks, maka produksi akan menurun.

Penggambaran pola perubahan konsentrasi biomassa rata-rata, konsentrasi pelarut rata-rata dan konsentrasi substrat akhir pada fermentasi sinambung dengan tiga laju dilusi dapat dilihat pada Gambar 20. Pola-pola perubahan konsentrasi ketiga parameter, hampir mendekati pola perubahan secara teoritik. Peningkatan laju dilusi menyebabkan penurunan konsentrasi



biomassa. Konsentrasi produk meningkat untuk kemudian mengalami penurunan. Pola konsumsi substrat meningkat untuk kemudian konstan. Penurunan produksi pelarut pada laju dilusi yang mendekati nilai  $\mu$  maks terjadi karena konsentrasi biomassa sel yang sudah mulai berkurang. Peningkatan yang terjadi sebelumnya karena adanya konsentrasi biomassa sel yang konstan dengan konsumsi substrat yang cukup tinggi.

Berdasarkan pola kurva pada Gambar 20, dapat ditentukan beberapa parameter kinerja fermentasi sinambung. Berdasarkan nilai-nilai tersebut dapat diketahui laju dilusi optimal untuk fermentasi sinambung. Parameter kinetika fermentasi sinambung ABE dengan substrat hidrolisat TKKS dapat dilihat pada Tabel 9.



Gambar 20. Hubungan laju dilusi dengan konsentrasi substrat, biomassa dan pelarut pada fermentasi sinambung ABE menggunakan hidrolisat TKKS

Tabel 9. Parameter fermentasi sinambung ABE menggunakan substrat hidrolisat TKKS pada beberapa taraf laju dilusi.

Parameter	Laju dilusi ( $\text{jam}^{-1}$ )		
	0,05	0,10	0,15
Kadar gula awal (g/l)	40	40	40
Biomassa rata-rata (g/l)	3,70	1,64	1,06
Gula terkonsumsi (g/l)	38,50	30,56	31,02
Rendemen (pelarut/substrat)	0,22	0,36	0,34
Produktivitas (g/l jam)	0,42	1,10	1,57

Berdasarkan Tabel 9 diketahui bahwa konsentrasi pelarut terbesar diperoleh pada fermentasi sinambung dengan laju dilusi  $0,10 \text{ jam}^{-1}$ . Namun produktivitas maksimum diperoleh pada laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$ . Oleh karena dalam fermentasi sinambung lebih diinginkan produktivitas yang tinggi, maka laju dilusi yang lebih baik adalah  $0,15 \text{ jam}^{-1}$ . Nilai laju dilusi ini sama dengan yang digunakan oleh Kanchanatawee *et al.* (1992) yang melakukan fermentasi sinambung menggunakan substrat *whey permeat* pada bioreaktor unggun diam.

Produktivitas yang tinggi menggambarkan kehandalan suatu fermentasi. Berdasarkan satuan produktivitas, maka tiap jam fermentasi pada laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$  dihasilkan sekitar  $1,56 \text{ g/l}$  pelarut. Hal ini tergantung pada keberhasilan mempertahankan kondisi tunak dan anaerobik. Komposisi pelarut yang dihasilkan dalam fermentasi dengan laju dilusi  $0,15 \text{ jam}^{-1}$  adalah 57,5 persen butanol, 33,8 persen etanol dan 8,7 persen aseton.



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Hasil analisis proksimat TKKS memperlihatkan bahwa komponen terbesar dari TKKS adalah selulosa 36,3 persen. TKKS yang dipergunakan dalam penelitian ini memiliki kandungan lignin yang cukup besar (24,2 persen). Proses penghilangan lignin dengan basa kuat NaOH 1 N cukup menunjang hidrolisis enzimatik yang dilaksanakan setelahnya. Hidrolisis enzimatik TKKS dengan menggunakan enzim selulase dan selobiase mampu menghasilkan hidrolisat dengan kadar gula terfermentasi rata-rata 37,5 g/l.

Fermentasi curah dilaksanakan pada substrat hidrolisat TKKS dan substrat sukrosa. Fermentasi dengan substrat hidrolisat TKKS menghasilkan rendemen 34,3 persen, sedangkan untuk substrat sukrosa 33,4 persen. Konsentrasi butanol tertinggi diperoleh pada fermentasi dengan substrat sukrosa, yaitu 14,7 g/l. Nilai laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu$  maks) *C. acetobutylicum* pada substrat hidrolisat TKKS adalah 0,202 jam<sup>-1</sup>.

Fermentasi sinambung dilaksanakan pada laju dilusi 0,05; 0,10; dan 0,15 jam<sup>-1</sup>. Produktivitas tertinggi fermentasi sinambung ABE pada bioreaktor unggun diam dicapai pada laju dilusi 0,15 jam<sup>-1</sup>, yaitu sebesar 1,57 g/l jam dengan rendemen 34 persen.

### B. SARAN

Penelitian ini sangat tergantung pada keberhasilan hidrolisis TKKS, oleh karena itu perlu dicoba penggunaan metode hidrolisis yang lain. Untuk

meningkatkan efektifitas penggunaan matriks, perlu dilakukan penelitian lebih jauh untuk memanfaatkan jenis matriks lain yang mempunyai ukuran lebih kecil. Selain itu, untuk memperoleh nilai laju dilusi yang lebih optimal, perlu dilakukan penelitian fermentasi sinambung dengan penggunaan kisaran laju dilusi yang lebih banyak.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





## DAFTAR PUSTAKA

- Anis, M., K. Das dan N. Ismail. 1994. Swelling and Multienzyme Effect on Improved Yields of Fermentable Sugars from Solid Palm Waste. Inter. Symp. Bioprocessing (4 - 7 Jan 1994), Malaysia.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati dan S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Bogor.
- Aritonang, D. 1986. Perkebunan Kelapa Sawit, Sumber Pakan Ternak di Indonesia. J. Litbang Pertanian 5(4):93-99.
- Bailey, J.E. dan D. F. Ollis. (1977). Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Graw Hill, Kogakusha Ltd, Tokyo.
- BPS. 1991. Statistik Perdagangan Luar Negeri Indonesia. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Bryant, M.P. 1972. Commentary in The Hungate Technique for Culture of Anaerobic Bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25:1324-1328.
- Buchta, K. 1987. Primary Metabolites. Di dalam P. Prave, U. Faust, W. Sittig dan D.A. Sukatsch. (eds.). Fundamentals of Biotechnology. Akademische Verlagsgesellschaft, D-6200, Wiesbaden, Germany.
- Chang, R. dan W. Tikkanen. 1988. The Top Fifty Industrial Chemical. Random House Inc., New York
- Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes. Kodansha Ltd., Tokyo.
- CIC. 1992. The Prospect of Ethanol Industry In Indonesia. PT. Capricon Indonesia Consult Inc., Jakarta.
- Cowling, E.B. 1975. Physical and Chemical constrains in The Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5:163-181.
- Darwis, A.A., T.K. Bunasor, L. Hartoto dan I. Saillah. 1987. Laporan Studi Potensi Limbah Lignoselulosik. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 1991. Statistik Perkebunan Indonesia Tahun 1980-1991. Direktorat Jenderal Perkebunan, Departemen Pertanian, Jakarta.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Dwidjoseputro, D. 1978. Dasar-dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Ennis, B.M. dan I.S. Maddox. 1987. The Effect of pH and Lactose Concentration on Solvent Production from Whey Permeate Using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotech. Bioeng.* 29:229-334.
- Fajarrini, K. 1991. Hidrolisis Enzimatis Tandem Kosong Kelapa Sawit Dengan Perlakuan Pendahuluan Perendaman Dalam Larutan Besi (III) Natrium Tartrat. Skripsi. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fateta-IPB, Bogor.
- Fond, O., J.M. Engasser, G.M. El Amouri dan H. Petittdemange. 1986. The Acetone Butanol Fermentation on Glucose and Xylose, Regulation and Kinetics in Batch Cultures. *Biotech. Bioeng.* 28:160-166.
- Girindra, A. 1990. Biokimia 1. PT. Gramedia, Jakarta.
- Gong, C.S., Li, F.C., Michael, C.F. dan George, T.S. 1981. Conversions of Hemicellulose Carbohydrates. Di dalam A. Feichter (ed.). *Adv. Biochem. Eng.* 20. Springer-Verlag, Berlin.
- Gottschalk, G. dan H. Grupe. 1992. Physiological Improvements in Acetone Butanol Fermentation. *J. Am. Chem. Soc.* 102:102-105.
- Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri. Jilid I. Terjemahan. UI Press, Jakarta.
- Gumbira-Sa'id, E. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Gutierrez, N. A. dan I.S. Maddox. 1992. Product Inhibition in A Nonmotile Mutant of *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14:101-105
- Hadioetoemo, R.S. 1985. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. PT Gramedia, Jakarta.
- 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.
- Higgins, I.J., D.J. Best dan J.Jones. 1985. Biotechnology Principles and Its Applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford.



- Hippe, H. 1984. Maintenance of Methanogenic Bacteria. Di dalam B.E. Kirsop dan J. Snell (ed.). Maintenance of Microorganism. Academic Press, London.
- Hungate, R.E. 1969. A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobs. Di dalam J.R. Norris dan D.W. Ribbons (ed.). Methods in Microbiology, volume 3 B. Academic Press, New York.
- Kanchanatawee, S. dan I.S. Maddox. 1992. The Effect of Selected Nutrients on Solvent Production By *Clostridium acetobutylicum*. Biotech. Dept. Publ., Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Kanchanatawee, S., I.S. Maddox, S.M. Rao Bhamidimarri. 1992. Nutrient Requirements for Acetone-Butanol-Ethanol Production Using *Clostridium acetobutylicum* in A Packed Bed Reactor. 10th Austral. Biotec. Conf.
- Kim, W.Y. dan S.M. Byun. 1982. Hydrolisis of Inulin From Jerusalem artichoke by Inulinase Immobilized on Aminoethylcellulose. Enzyme Microb. Technol. J. 4:239-244.
- Ljungdahl, L.G. dan J. Wiegel. 1984. Working With Anaerobic Bacteria. J. Bacteriology. 160:84-96.
- Mangunwidjaja, D. 1990. Pengantar Bioteknologi Kinetika Fermentasi dan Rancang Bangun Bioreaktor. Agroindustri Press, Bogor.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. Analytical Chemistry. 31(3):426-428.
- Nevel, T.P. dan S.H. Zeronian. 1985. Cellulose Chemistry and Its Applications. Ellis Harwood United, Chicester.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan. UI Press, Jakarta.
- Pratiwi, W., A. Oskari dan S.P. Rahdi. 1988. Pembuatan Pulp Kertas dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Proses Antrakinin. Menara Perkebunan. 56(2):49-52.
- Prave, P., U. Faust, W. Sittig dan D.A. Sukatsch. 1987. Fundamentals of Biotechnology. Akademische Verlagsgesellschaft, D-6200, Wiesbaden, Germany.
- Primorse, S.B. 1987. Modern Biotechnology. Blackwell Scientific Publ., Oxford.



- Qureshi, N. dan I.S. Maddox. 1991. An Economic Assessment of The Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation Process. *Austral. J. Biotec.* 5 (1) : 56-60.
- Roffler, S.R., H.W. Blanch, dan C.R. Wilke. 1987. In Situ Extractive Fermentation of Acetone Butanol. *Biotech. Bioeng.* 31:135-143.
- Satyawibawa, I. dan Y.E. Widyastuti. 1992. Kelapa Sawit Usaha Budidaya, Pemanfaatan Hasil dan Aspek Pemasaran. PT. Penebar Swadaya, Jakarta
- Schugerl, K. dan W. Sittig. 1987. Bioreactors. Di dalam P. Prave, U. Faust, W. Sittig dan D.A. Sukatsch. (eds.). *Fundamentals of Biotechnology.* Akademische Verlagsgesellschaft, D-6200, Wiesbaden, Germany.
- Sivalingan, P.M. 1983. Problems in Palm Oil Waste Treatment. Regional Symposium on Plantation Environments, Medan
- Stanbury, P.F. dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford.
- Tjokroadikoesoemo, P.S. 1986. HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya. PT Gramedia, Jakarta.
- Tsao, G.T., M. Ladisch, C. Ladisch, T.A. Hsu, B. Dale dan T. Chou. 1978. Fermentation Substrates from Cellulosic Material : Production of Fermentable sugar From Cellulosic Material. *Annual Report on Fermentation Processes* 2:1-21.
- Van't Riet, K. dan J. Tramper. 1987. Basic Bioreactor Design. Marcell Dekker Inc., New York.
- Walton, M.T. dan J.L. Martin. 1979. Production of Butanol-Acetone by Fermentation. *J. Micobial Technology.* 2: 187-209. Academic Press Inc., New York.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain dan P. Dunnill 1978. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, California.
- Zeronian, S.H. 1985. Intercrystalline Swelling of Cellulose. Di dalam Nevel dan Zeronian, S.H. (eds.). *Cellulose Chemistry and Its Applications.* Ellis Harwood United, Chicester.



# LAMPIRAN

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

### Lampiran 1. Parameter kinetika fermentasi curah ABE pada medium hidrolisat TKKS

Jam	pH	Gula (g/l)	Biomassa (g/l)	Asetat (g/l)	Butirat (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	6,000	20,000	0,119	-	-	-	-	-
10	5,220	8,888	0,840	0,595	0,033	0,000	0,000	0,000
20	5,740	6,106	1,350	0,947	0,083	0,000	0,380	0,640
30	4,690	4,467	1,453	0,728	0,054	0,350	0,310	0,550
40	4,710	2,308	1,720	0,372	0,360	0,320	0,540	0,430
50	4,840	4,083	1,850	0,730	0,067	0,480	1,090	0,510
60	5,000	2,875	1,663	0,436	0,099	1,250	4,404	0,580

Jam	Biomassa (X)	Ln (X)	X-X <sub>0</sub>	Substrat (S)	S <sub>0</sub> -S	Produk (P)	P-P <sub>0</sub>
0	0,119	-2,190	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000
10	0,840	-0,174	0,728	8,888	11,112	0,000	0,000
20	1,350	0,300	1,238	6,107	13,894	1,020	1,020
30	1,453	0,355	1,314	4,467	15,533	1,210	1,210
40	1,720	0,542	1,608	2,308	17,692	1,290	1,290
50	1,850	0,615	1,738	4,083	15,917	2,080	2,080
60	1,663	0,509	1,551	2,875	17,125	5,870	5,870

$\mu$ (maks)	= 0,202
Y (p/s)	= 0,343
Y (x/s)	= 0,066
Y (p/x)	= 3,784

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

## Lampiran 2. Parameter kinetika fermentasi curah ABE pada medium sukrosa

Jam	pH	Gula (g/l)	Biomassa (g/l)	Asetat (g/l)	Butirat (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	5,44	60,000	0,650	6,000	6,000	0,000	3,337	3,674
12	4,59	5,234	1,675	5,570	6,709	4,255	2,552	3,415
24	4,95	0,921	1,725	4,210	5,812	5,191	3,092	1,287
36	4,70	3,282	2,575	2,840	4,285	7,194	7,909	4,007
48	4,80	4,761	3,250	2,520	4,000	5,900	5,771	2,847
60	4,65	3,602	2,425	2,030	2,500	7,944	14,684	3,191

Jam	Biomassa (X)	Ln (X)	X-X <sub>0</sub>	Substrat (S)	So-S	Produk (P)	P-P <sub>0</sub>
0	0,650	-0,431	0,000	60,000	0,000	7,010	0,000
12	1,675	0,516	1,025	5,234	54,766	10,222	3,212
24	1,725	0,545	1,075	0,921	59,079	9,570	2,560
36	2,575	0,946	1,925	3,282	56,718	19,110	12,100
48	3,250	1,179	2,600	4,761	55,239	14,518	7,508
60	2,425	0,886	1,775	3,602	56,398	25,819	18,809

$$\begin{aligned} \mu \text{ (maks)} &= 0,079 \\ Y \text{ (p/s)} &= 0,334 \\ Y \text{ (x/s)} &= 0,047 \\ Y \text{ (p/x)} &= 10,597 \end{aligned}$$

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



### Lampiran 3. Parameter kinetika fermentasi sinambung ABE pada medium hidrolisat TKKS

Laju dilusi = 0,05 jam<sup>-1</sup>

Jam	pH	Gula (g/l)	Biomassa (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	5,32	40,000	2,500	2,832	2,960	3,030
10	5,28	1,927	3,000	0,357	2,752	3,000
20	5,63	1,761	3,800	1,350	4,322	4,670
30	5,73	2,374	4,763	1,325	6,612	4,500
45	5,93	3,452	3,588	0,671	4,036	4,000
60	5,53	1,504	4,500	0,510	0,452	3,250

Laju dilusi = 0,10 jam<sup>-1</sup>

Jam	pH	Gula (g/l)	Biomassa (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	5,09	40,000	1,225	1,500	4,339	2,014
10	5,01	8,006	1,463	1,675	5,668	1,522
20	5,08	12,350	1,500	2,412	10,065	2,250
25	5,11	8,435	1,987	0,518	8,741	1,500
30	5,07	9,438	2,000	0,435	10,669	1,000

Laju dilusi = 0,15 jam<sup>-1</sup>

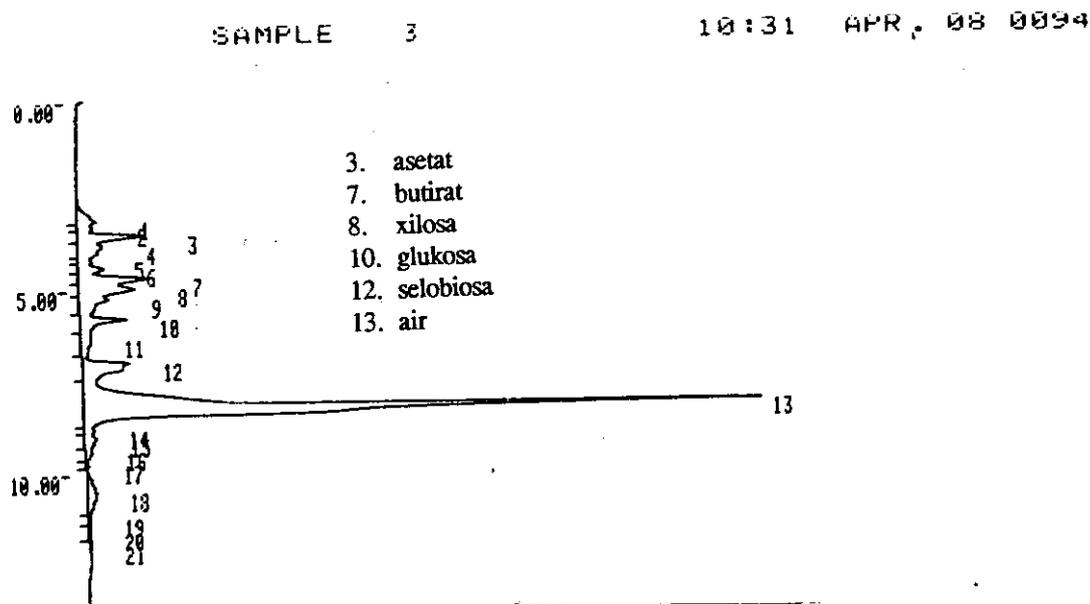
Jam	pH	Gula (g/l)	Biomassa (g/l)	Aseton (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	5,96	40,000	0,463	0,582	3,827	0,674
10	5,58	14,156	0,750	1,011	5,528	3,424
12,5	5,55	10,997	0,925	0,553	4,075	2,068
15	5,59	15,113	1,453	1,067	8,550	3,692
17,5	5,44	11,214	1,438	1,108	11,280	5,865
20	5,39	8,98	1,325	0,376	6,384	2,574

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

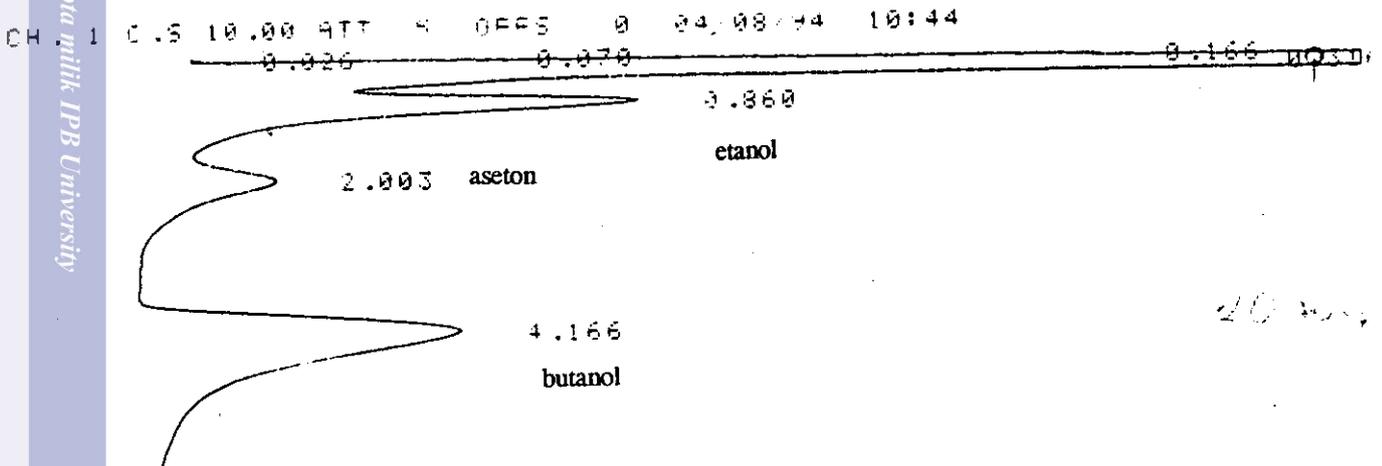
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 4. Contoh komposisi substrat hidrolisat TKKS yang digunakan dalam fermentasi sinambung ABE pada sampel jam ke-10, laju dilusi 0,15 jam<sup>-1</sup>, yang ditentukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi.



NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1		3.195	22475	M	1.6906
2		3.370	8452	M	0.6358
3		3.594	44497	M	3.3472
4		3.870	28188	M	2.1204
5		4.260	6919	M	0.5205
6		4.450	17626	M	1.3259
7		4.727	50314	M	3.7847
8		4.999	48143	M	3.6214
9		5.275	31352	M	2.3584
10		5.304	35265	M	2.6527
11		6.332	16349	M	1.2298
12		6.992	63200	M	4.7541
13		8.200	606483	M	45.6213
14		8.634	5480	M	0.4122
15		9.057	11740	M	0.8831
16		9.425	4976	M	0.3743
17		9.774	1126	M	0.0847
18		10.502	24406	M	1.8358
19		11.199	1787	M	0.1344
20		11.582	1938	M	0.1457
21		11.957	1009		0.0759

Lampiran 5. Contoh hasil kromatografi gas terhadap pelarut ABE yang dihasilkan pada fermentasi sinambung ABE (sampel jam ke-20, laju dilusi 0,15 jam<sup>-1</sup>)



D-2500 04/08/94 10:44

METHOD: ABE EGUM. TAG: 7 Pa: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	SC
1	0.026	232	0.011	BB
2	0.070	9239	0.399	BU
3	0.166	119536	5.323	UU
4	0.316	1334088	54.241	UU
5	0.860	146184	6.059	TBB
6	2.003	71007	3.419	TBB ✓
7	4.166	406360	19.560	BB
TOTAL		2076696	100.000	
PEAK REJ :		100		

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## Lampiran 6. Prosedur penentuan komposisi tandan kosong kelapa sawit

### 1. Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)

Untuk menganalisa kadar air pertama kali dilakukan pemanasan cawan aluminium kosong pada suhu 105°C dan selanjutnya didinginkan serta ditimbang hingga diperoleh berat yang konstan. Contoh sebanyak 2 gram ditimbang untuk kemudian dimasukkan ke dalam cawan aluminium. Cawan yang telah berisi bahan ini kemudian dimasukkan ke dalam oven bersuhu 105°C selama 1 jam dan didinginkan dalam desikator serta ditimbang secepatnya setelah mencapai suhu kamar. Pemanasan dan penimbangan diulang beberapa kali hingga diperoleh berat yang tetap. Untuk menghitung kadar air bahan dipergunakan rumus :

$$\text{Kadar air} = \frac{W_0 - w_1}{W_0} \times 100 \%$$

$W_0$  : bobot contoh kering

$w_1$  : bobot contoh awal

### 2. Analisis Kadar Abu (AOAC, 1984)

Analisis kadar abu dimulai dengan membakar cawan pengabuan dalam tanur pada suhu 550°C. Cawan tersebut kemudian didinginkan dan ditimbang. Contoh sebanyak

3 - 5 gram ditimbang dan dibakar dalam tanur pengabuan. Pembakaran dilakukan sampai didapat warna keabu-abuan atau sampai bobot bahan yang dibakar tetap. Proses pengabuan ini dilakukan dalam dua tahap, pertama pengabuan dengan suhu 400°C dan kedua dengan suhu 550°C. Kadar abu dihitung sebagai :

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{bobot abu (g)}}{\text{bobot contoh (g)}} \times 100 \%$$

### 3. Penentuan Kadar Hemiselulosa Bahan (Goering dan Van Soest, 1970)

Prosedur penentuan kadar hemiselulosa bahan diawali dengan pembuatan Pereaksi NDF dan Pereaksi ADF. Pereaksi NDF terdiri atas :

Natrium dedosil sulfat (NDS) .....	30,00 g
EDTA .....	18,61 g
✓ Natrium borat dekahidrat .....	6,81 g
✓ Dinatrium hidrogen fosfat .....	4,56 g
Etilen glikol monoetil eter .....	10,00 ml
Air suling .....	1000,00 ml

Pembuatan pereaksi NDF dilakukan dengan memanaskan EDTA dan Natrium borat dalam labu berisi air. Pemanasan dihentikan sampai semua bahan larut. Larutan yang dihasilkan selanjutnya ditambahkan ke dalam larutan berisi NDS dan Etilen glikol monoetil eter. Campuran kedua larutan ini kemudian ditambah dengan larutan Dinatrium hidrogenfosfat yang telah dipanaskan

dalam labu. Pencampuran dilakukan sampai diperoleh larutan dengan pH 6,9 - 7,1.

Pembuatan Pereaksi ADF dilakukan dengan mencampur bahan yang terdiri atas :

✓Asam sulfat .....	49,04 g
Cetil trimetil amonium bromid (CTAB) .	20,00 g
Air suling .....	1000,00 ml

Pembuatan pereaksi dilakukan mengencerkan asam sulfat dengan air hingga normalitasnya mencapai 1 N. Standardisasi larutan tersebut dilakukan dengan titrasi dan setelah itu ditambahkan CTAB.

Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih antara Serat Deterjen Netral (NDF) dan Serat Deterjen Asam (ADF). Penentuan kedua jenis serat adalah :

a. Benentuan Serat Deterjen Netral (NDF)

Contoh kering berukuran 20 - 30 mesh ditimbang sebanyak 0,5 - 1,0 g untuk kemudian dimasukkan ke dalam labu refluks dan ditambahkan 100 ml pereaksi NDF, 2 ml deka hidro naftalen serta 0,5 g natrium sulfit. Tahap berikutnya adalah pendidihan selama 5 - 10 menit dan selanjutnya direfluks selama 60 menit. Hasil reflux kemudian disaring dan ditempatkan dalam cawan *gooch* yang telah diketahui beratnya secara vakum. Sisa bahan dalam labu dibilas dengan air panas dan selanjutnya disaring untuk



ditempatkan dalam cawan. Untuk memperoleh seluruh sisa bahan dalam labu, maka pembilasan dilanjutkan dengan alkohol dan hasilnya disaring serta dimasukkan dalam cawan. Cawan yang telah diisi selanjutnya dikeringkan pada suhu 100°C selama satu malam. Kadar Serat Deterjen Netral dihitung sebagai :

$$\text{Kadar NDF} = \frac{W_1 - W_0}{s} \times 100$$

$w_1$  : bobot cawan dengan isinya

$w_0$  : bobot cawan kosong

$s$  : bobot contoh kering

#### b. Penentuan Serat Deterjen Asam (ADF)

Contoh kering berukuran 20 - 3- mesh ditimbang sebanyak 1,0 g dan dimasukkan ke dalam labu reflux serta ditambahkan 100 ml pereaksi ADF dan 2 ml deka hidro naftalen. Labu tersebut selanjutnya dididihkan selama 5 - 10 menit dan direfluks selama 60 menit. Hasil refluks selanjutnya disaring dan dimasukkan ke dalam cawan *gooch* yang telah diketahui beratnya secara vakum. Sisa contoh di dalam labu dicuci dengan air panas dan disaring kembali.

Sisa contoh terakhir dicuci dengan aseton sampai filtrat tidak berwarna, bila perlu dilakukan pencucian dengan hexan. Tahap akhir adalah mengeringkan cawan pada suhu 100°C selama satu malam. Kadar Serat Deterjen Asam (ADF) dihitung sebagai :

$$\text{Kadar ADF} = \frac{W_1 - W_0}{s} \times 100$$

$w_1$  : bobot cawan dengan isinya

$w_0$  : bobot cawan kosong

$s$  : bobot contoh kering

#### 4. Penentuan Kadar Lignin dan Selulosa Bahan (Goering dan Van Soest, 1970)

Prosedur penentuan kadar lignin dan selulosa bahan diawali dengan pembuatan dua jenis pereaksi, yaitu pereaksi A dan pereaksi B. Pereaksi A terdiri atas :

##### 1. Larutan Kalium permanganat jenuh, yang berupa:

✓ Kalium permanganat .....	50,00 g
Perak sulfat .....	0,05 g
Air suling .....	1000,00 ml

##### 2. Larutan bufer lignin, yang berupa :

Besi nitrat nanohidrat .....	6,00 g
Perak nitrat .....	0,15 g
✓ Asam asetat glasial .....	500,55 ml
Kalium asetat .....	5,00 g
Butil alkohol tersier .....	400,00 ml
Air suling .....	100,00 ml

Pembuatan larutan bufer lignin dilakukan dengan melarutkan besi nitrat dan perak nitrat di dalam air terlebih dahulu. Larutan tersebut selanjutnya ditambahkan asam asetat dan



kalium asetat serta butil alkohol tersier sambil diaduk.

Tahap selanjutnya adalah pencampuran larutan Kalium permanganat jenuh dan larutan Bufer lignin dengan perbandingan 2 : 1 (v/v). Pereaksi tersebut kemudian disimpan dalam lemari es tanpa ada cahaya, maksimum selama satu minggu. Larutan dapat dipakai apabila berwarna ungu dan tidak terdapat endapan.

Tahap berikutnya adalah pembuatan *Pereaksi E* yang terdiri atas :

Asam oksalat dihidrat .....	50,00 g
Etanol 95% .....	700,00 ml
HCl pekat (12 N) .....	50,00 ml
Air suling .....	250,00 ml

Pembuatan *Pereaksi B* dilakukan dengan cara melarutkan Asam oksalat dihidrat dalam etanol 95 persen terlebih dahulu dan kemudian ditambahkan asam klorida dan air.

Prosedur penentuan kadar lignin dan selulosa bahan dilanjutkan dengan menghaluskan bahan yang akan diuji sampai berukuran 20 - 30 mesh. Contoh tersebut ditimbang sebanyak 1,0 g dan dianalisa kadar ADF-nya. Kemudian cawan yang dipakai untuk menguji kadar ADF ditempatkan pada talam berisi air setinggi 1 cm (serat



jangan sampai basah). Ke dalam cawan selanjutnya ditambahkan 25 ml Pereaksi A. Ke dalam talam ditambahkan air 2 - 3 cm dan diaduk, kemudian dibiarkan selama 90 menit. Jika diperlukan dapat ditambahkan Pereaksi A lagi (warna seharusnya ungu). Tahap selanjutnya adalah penyaringan secara vakum dengan cawan ditempatkan dalam talam yang bersih. Ke dalam talam ditambahkan Pereaksi B sampai setengahnya dan setelah 5 menit dilakukan penyaringan sampai serat berwarna putih. Cawan dicuci dengan etanol 80 persen dan disaring sebanyak dua kali. Cawan dicuci kembali dengan aseton. Tahap terakhir adalah memanaskan cawan dalam oven pada suhu 100°C. Kadar lignin dihitung sebagai :

$$\text{Kadar lignin} = \frac{W_1 - W_2}{s} \times 100$$

$W_1$  : kadar ADF

$W_2$  : bobot cawan setelah dikeringkan

s : bobot contoh kering

Penentuan kadar selulosa dilakukan dengan mem bakar cawan dalam tanur pada suhu 500°C selama 3 jam. Cawan selanjutnya didinginkan dan ditimbang. Kadar selulosa dihitung sebagai :



$$\text{Kadar Selulosa} = \frac{W_2 - W_3}{s} \times 100$$

$W_2$  : bobot cawan setelah dikeringkan

$W_3$  : bobot cawan setelah diabukan

$s$  : bobot contoh kering

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## Lampiran 7. Kadar Gula Pereduksi (Miller, 1959)

Kadar gula pereduksi ditentukan dengan Metode DNS dan digunakan untuk menentukan kadar substrat.

### a. Penyiapan Pereaksi DNS

Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 10,6 g asam 3,5 dinitrosalisilat dan 19,8 g NaOH ke dalam 1 416 ml air. Setelah itu ditambahkan 306 g Na-K tartrat, 7,6 g fenol yang dicairkan pada suhu 50°C dan 8,3 Na-metabisulfit. Lrutan ini diaduk merata. Kemudian 3 ml larutan ini dititrasi dengan HCL 0,1 N. Titrasi ini seharusnya 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 penentuan kadar glukosa dan xylosa (substrat) dengan metode DNS, contoh yang diuji harus berupa cairan jernih. Oleh karena itu harus dilakukan pengendapan dan penghilangan warna terhadap contoh yang akan dianalisa.

Contoh dalam betuk cair dibuat netral atau basa dengan penambahan  $\text{CaCO}_3$ . Penambahan ini bertujuan agar asam yang terdapat dalam contoh tidak menghidrolisa gula yang ada pada waktu proses pemanasan.



Kemudian dilakukan pemucatan dengan menambahkan arang aktif 1,5 persen selama 15 menit pada suhu 80 -90°C. Larutan ini disaring dan diambil larutan yang bersih. Untuk menghilangkan bahan-bahan terlarut seperti pigmen dan senyawa koloid, maka ke dalam contoh ditambahkan Pb-asetat setengah basa. Kelebihan Pb-asetat diendapkan dengan menambahkan natrium atau kalium oksalat atau posfat. Penambahan Pb-asetat sedikit demi sedikit, sampai larutan contoh menjadi jernih. volume contoh dalam labu takar ditepatkan pada tanda tera untuk menentukan faktor pengenceran.

### c. Penetapan Kadar Gula

Contoh yang telah jernih sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 ml pereaksi DNS, dan ditempatkan dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya contoh didinginkan sampai mencapai suhu ruang. Bila diperlukan contoh diencerkan agar terukur pada kisaran 20 - 80 *Transmitan* (%T) pada panjang gelombang 550 nm. Untuk pengukuran blanko digunakan air suling.

Kurva standar dibuat dengan menggunakan larutan glukosa standar dengan kisaran 0,2 - 5 mg/l.

