



SKRIPSI

**PRODUKSI BIOBUTANOL DARI SABUT KELAPA
MELALUI HIDROLISIS TERKATALISIS ASAM DAN
FERMENTASI OLEH *Clostridium acetobutylicum***

**ZAKESA EKKY KAUTSAR
NRP. 0121154000020**

**Dosen Pembimbing
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.**

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN ANALITIKA DATA
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2020**



SCRIPT

**BIOBUTANOL PRODUCTION FROM COCONUT
HUSK VIA ACID-CATALYZED HYDROLYSIS AND
FERMENTATION BY *Clostridium acetobutylicum***

**ZAKESA EKKY KAUTSAR
NRP. 0121154000020**

**Advisor Lecturer
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE AND DATA ANALYTICS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2020**

**PRODUKSI BIOBUTANOL DARI SABUT KELAPA
MELALUI HIDROLISIS TERKATALISIS ASAM DAN
FERMENTASI OLEH *Clostridium acetobutylicum***

SKRIPSI

Disusun untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Analitika Data
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Disusun Oleh:

ZAKESA EKKY KAUTSAR
NRP. 0121154000020

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN ANALITIKA DATA
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN
PRODUKSI BIOBUTANOL DARI SABUT KELAPA
MELALUI HIDROLISIS TERKATALISIS ASAM DAN
FERMENTASI OLEH *Clostridium acetobutylicum*

SKRIPSI

Oleh :

ZAKESA EKKY KAUTSAR
NRP. 0121154000020

Surabaya, 19 Agustus 2020

Menyetujui,
Dosen Pembimbing,



Drs. Refdinal Nawfa, M.S.
NIP. 19580425 198701 1 001

Mengetahui,
Kepala Departemen Kimia FSAD ITS



Prof. Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, S.Si., M.Si.
NIP. 19740428 199802 1 001

PRODUKSI BIOBUTANOL DARI SABUT KELAPA MELALUI HIDROLISIS TERKATALISIS ASAM DAN FERMENTASI OLEH *Clostridium acetobutylicum*

Nama : Zakesa Ekky Kautsar
NRP : 0121154000020
Departemen : Kimia FSAD-ITS
Dosen Pembimbing : Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

Abstrak

Biobutanol merupakan salah satu jenis bahan bakar alternatif yang banyak diteliti potensinya. Kemiripan sifatnya dengan bahan bakar yang ada pada saat ini telah menjadikan biobutanol sebagai bahan bakar alternatif yang menjanjikan pada masa depan. Biobutanol dapat diproduksi dari bahan biomassa lignoselulosa, salah satunya adalah sabut kelapa. Pada penelitian ini, biobutanol telah diproduksi dari sabut kelapa yang sebelumnya dipreparasi terlebih dahulu secara fisik dan kimiawi. Sabut kelapa hasil preparasi (50 g/L) yang dihidrolisis menggunakan larutan H₂SO₄ 2% (b/v) menghasilkan glukosa dengan kadar tertinggi, yaitu sebesar 12,48 g/L. Hidrolisat sabut kelapa (50% v/v) difermentasi pada media fermentasi *Nutrient Broth* (NB) maupun *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Fermentasi pada media RCM menghasilkan butanol dengan konsentrasi sebesar 0,241 g/L, namun tidak menghasilkan butanol pada media NB selama 96 jam waktu fermentasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa biobutanol dapat diproduksi dari sabut kelapa menggunakan media fermentasi berbasis RCM.

Kata kunci: Biobutanol, Sabut kelapa, Hidrolisis asam, *Clostridium acetobutylicum*, Fermentasi.

BIOBUTANOL PRODUCTION FROM COCONUT HUSK VIA ACID-CATALYZED HYDROLYSIS AND FERMENTATION BY *Clostridium acetobutylicum*

Name : Zakesa Ekky Kautsar
NRP : 0121154000020
Department : Chemistry SCIENTICS-ITS
Advisor Lecturer : Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

Abstract

Biobutanol is one type of alternative fuel that has been investigated for its potential. The similarity with the current fuel has made biobutanol as a promising alternative fuel in the future. Biobutanol can be produced from lignocellulosic biomass materials, one of which is coconut husk. In this study, biobutanol had been produced from coconut husk which was previously pre-treated physically and chemically. Pre-treated coconut husk (50 g/L) was hydrolyzed with 2% (w/v) H₂SO₄ that produced the highest levels of glucose, which was 12.48 g/L. Fermentation of coconut husk hydrolyzate (50% v/v) was performed in Nutrient Broth (NB) and Reinforced Clostridial Medium (RCM) using *Clostridium acetobutylicum* bacteria. Butanol was produced with concentration of 0.241 g/L on RCM medium, but did not produce butanol on NB medium for 96 hours of fermentation time. These results indicate that biobutanol can be produced from coconut husk using RCM fermentation medium.

Keywords: Biobutanol, Coconut husk, Acid-catalyzed hydrolysis, *Clostridium acetobutylicum*, Fermentation.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga naskah skripsi berjudul **“PRODUKSI BIOBUTANOL DARI SABUT KELAPA MELALUI HIDROLISIS TERKATALISIS ASAM DAN FERMENTASI OLEH *Clostridium acetobutylicum*”** dapat diselesaikan dengan baik. Tulisan ini tidak akan terwujud dengan baik tanpa bantuan, dukungan, doa, serta dorongan semangat dari semua pihak. Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Refdinal Nawfa, M.S. selaku dosen pembimbing sekaligus Kepala Laboratorium Kimia Mikroorganisme periode 2015-2020 atas pengarahan, bimbingan, serta fasilitas laboratorium yang telah diberikan selama proses pengerjaan skripsi ini.
2. Prof. Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, S.Si., M.Si. selaku dosen wali atas pengarahan dan motivasi yang telah diberikan selama penulis menempuh perkuliahan di Departemen Kimia ITS.
3. Seluruh dosen dan tenaga kependidikan di lingkungan Departemen Kimia ITS atas ilmu dan pengabdian yang telah diberikan.
4. Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta selaku penyedia kultur bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang digunakan oleh penulis dalam penelitian skripsi ini.
5. UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang yang telah membantu penulis dalam analisis sampel hasil fermentasi.
6. Ibu dan Ayah yang selalu memberikan dukungan, semangat, serta doa yang tiada henti.
7. Dra. Kasminarti (almarhumah) yang telah memperkenalkan penulis dengan ilmu kimia beserta hal-hal menarik yang ada di dalamnya.

8. Rini Suswati, S.Si. sebagai *partner in chemistry* bagi penulis.
9. Afif, Igo, Kevin, Adit, dan sahabat-sahabat Todz Family yang telah menjadi tempat untuk berkeluh kesah.
10. Keluarga Besar Laboratorium Kimia Mikroorganisme yang telah membantu penulis selama penyelesaian skripsi.
11. Sahabat-sahabat Goldschmidt yang telah mewarnai kehidupan penulis selama menempuh perkuliahan di Departemen Kimia ITS.
12. Adik-adik Magnum Opus, Carbyne, dan Aqua Regia yang senantiasa menyemangati penulis untuk menyelesaikan skripsi.
13. Rekan-rekan di Himpunan Mahasiswa Kimia, *Chemistry Islamic Studies*, AICHe ITS SC, dan Paduan Suara Mahasiswa ITS yang telah memberikan pengalaman organisasi selama penulis menempuh perkuliahan di ITS.
14. Pihak-pihak lain yang telah membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan naskah skripsi ini tidak lepas dari kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
Abstrak.....	v
Abstract.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Batasan Masalah.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Biobutanol.....	5
2.2. Sabut Kelapa.....	6
2.3. Delignifikasi.....	7
2.4. Hidrolisis.....	8
2.5. Fermentasi ABE (Aseton-Butanol-Etanol).....	8
2.6. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	14
2.7. Analisis Kandungan Glukosa.....	15
2.8. Kromatografi Gas.....	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	23
3.1. Tahapan Penelitian.....	23
3.2. Alat dan Bahan.....	23
3.2.1. Alat.....	23
3.2.2. Bahan.....	24
3.3. Prosedur Kerja.....	24
3.3.1. Preparasi Sabut Kelapa.....	24
3.3.2. Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	25
3.3.3. Hidrolisis Sabut Kelapa Hasil Preparasi.....	25
3.3.4. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri.....	26
3.3.5. Regenerasi Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	26

3.3.6. Pembuatan Media Fermentasi	27
3.3.7. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	27
3.3.8. Fermentasi Campuran Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Produksi Biobutanol	29
3.3.9. Analisis Kandungan Biobutanol dengan Kromatografi Gas	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1. Preparasi Sabut Kelapa	31
4.2. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	33
4.3. Hidrolisis Sabut Kelapa Hasil Preparasi	37
4.4. Regenerasi Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	41
4.5. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	43
4.6. Fermentasi Campuran Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Produksi Biobutanol	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
5.1. Kesimpulan	57
5.2. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	71
A. Skema Kerja Penelitian.....	71
B. Perhitungan dan Data Penelitian	74
1. Pembuatan Larutan Standar Glukosa	74
2. Kurva Standar Glukosa	75
3. Pembuatan Larutan Asam Sulfat.....	76
4. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi	78
5. Densitas Optik Kurva Pertumbuhan <i>Clostridium acetobutylicum</i>	79
6. Analisis Kadar Glukosa.....	81
7. Kromatogram.....	83
BIODATA PENULIS	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur rantai butanol.....	5
Gambar 2.2	Jalur metabolisme oleh <i>C. acetobutylicum</i> dalam fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE).....	13
Gambar 2.3	Suatu kromatograf gas dan bagian-bagian utamanya.....	20
Gambar 4.1	Filtrat coklat kehitaman yang dihasilkan pada delignifikasi sabut kelapa.....	33
Gambar 4.2	Mekanisme reaksi glukosa menjadi 5-hidroksimetilfurfural (HMF).....	34
Gambar 4.3	Mekanisme reaksi pembentukan senyawa kromofor dari 5-hidroksimetilfurfural (HMF) dengan adanya penambahan fenol.....	35
Gambar 4.4	Kurva standar glukosa.....	36
Gambar 4.5	Hidrolisat dengan konsentrasi H_2SO_4 yang berbeda sebelum dan setelah penetralan.....	38
Gambar 4.6	Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan adanya asam sulfat (H_2SO_4) sebagai katalis.....	40
Gambar 4.7	Hasil regenerasi bakteri <i>C. acetobutylicum</i> pada media pertumbuhan NA dan RCA.....	42
Gambar 4.8	Kurva pertumbuhan bakteri <i>C. acetobutylicum</i>	46
Gambar 4.9	Kurva konsumsi glukosa selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa.....	49
Gambar 4.10	Konsentrasi produk yang dihasilkan selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa pada media NB.....	54

Gambar 4.11	Konsentrasi produk yang dihasilkan selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa pada media RCM.....	54
-------------	--	----

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Data absorbansi larutan glukosa.....	36
Tabel 4.2	Kadar glukosa dalam hidrolisat sabut kelapa....	39
Tabel 4.3	Densitas optik terukur pada panjang gelombang 600 nm dari berbagai macam campuran.....	45
Tabel 4.4	Kadar glukosa selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa.....	49
Tabel 4.5	Data waktu retensi dan luas puncak berdasarkan kromatogram pada masing-masing sampel.....	51
Tabel 4.6	Konsentrasi produk hasil fermentasi hidrolisat sabut kelapa (dalam %)......	52
Tabel 4.7	Konsentrasi produk hasil fermentasi hidrolisat sabut kelapa (dalam g/L).....	53

*Karya ini saya persembahkan untuk
Ibu dan Ayah serta keluarga tercinta
Bu Mien (almh.), Rully, dan Mbak Rini
Sahabat-sahabat Goldschmidt dan Tod'z Family
Adik-adik Magnum Opus, Carbyne, dan Aqua Regia
serta teman-teman seperjuangan*

*Terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu
penyelesaian naskah skripsi ini.*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Bahan bakar dari sumber terbarukan kini menarik perhatian banyak peneliti seiring dengan menipisnya bahan bakar dari sumber fosil. Salah satu jenis bahan bakar yang kini menjadi perhatian adalah bahan bakar butanol. Butanol diproduksi, salah satunya, melalui fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE). Butanol memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan bahan bakar alkohol lainnya (metanol dan etanol) (Lee dkk., 2008; Jin dkk, 2011; Dürre, 2007). Salah satu keunggulan butanol adalah kesamaan karakteristiknya dengan bensin, sehingga butanol menjadi salah satu kandidat pengganti bahan bakar bensin yang ada pada saat ini.

Butanol dapat diproduksi dari bahan biomassa lignoselulosa yang dihasilkan oleh industri pertanian. Biomassa tersebut merupakan bahan yang paling melimpah di Bumi yang dapat berfungsi sebagai bahan baku fermentasi. Biomassa lignoselulosa memiliki komposisi kimia yang terdiri dari selulosa dan hemiselulosa, yang dapat diubah menjadi monomer gula (Ibrahim dkk., 2015). Salah satu biomassa lignoselulosa yang dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi butanol adalah sabut kelapa. Sabut kelapa dipilih karena ketersediaannya yang sangat melimpah (diperkirakan mencapai 250 ribu ton di seluruh dunia) dan telah dikenal luas sebagai bahan yang memiliki banyak kegunaan di masyarakat (Arsène dkk., 2017; Hasan dkk., 2012).

Pemanfaatan biomassa lignoselulosa sebagai bahan baku fermentasi (dalam hal ini untuk fermentasi ABE) melibatkan beberapa langkah atau proses, yaitu preparasi substrat, hidrolisis, fermentasi ABE, dan penentuan kadar produk (Ibrahim dkk., 2015). Preparasi substrat diperlukan untuk menghilangkan atau

mengubah struktur lignin, sehingga bagian dalam selulosa dan hemiselulosa dapat dimanfaatkan untuk proses hidrolisis. Metode preparasi biomassa lignoselulosa telah dipelajari secara luas menggunakan cara mekanik, kimia, maupun biologis. Hal tersebut bertujuan untuk meningkatkan efisiensi hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula yang dapat difermentasi (Mosier dkk., 2005). Pada penelitian ini, sabut kelapa dipreparasi secara fisik dan kimiawi dengan adanya penambahan larutan NaOH 10% (b/v). Hidrolisis adalah proses untuk mengubah selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula. Proses ini biasanya berlangsung lambat sehingga diperlukan katalis berupa asam atau enzim untuk mempercepat terjadinya reaksi (García dkk., 2011). Pada penelitian ini, larutan asam berupa H_2SO_4 digunakan sebagai katalis dalam hidrolisis sabut kelapa dengan adanya variasi konsentrasi larutan H_2SO_4 yang digunakan.

Clostridium acetobutylicum adalah mikroorganisme yang paling umum digunakan dalam fermentasi ABE. Spesies bakteri ini telah dilaporkan mampu menghasilkan butanol dari substrat berupa gula yang dihasilkan dari biomassa lignoselulosa seperti residu empulur sagu, tandan kosong kelapa sawit, dan serat jagung (Li dkk., 2011; Sukumaran dkk., 2011; Linggang dkk., 2013; Qureshi dkk., 2008). Media fermentasi yang digunakan juga bermacam-macam, antara lain *Reinforced Clostridial Medium*, *P2 Medium*, dan *Tryptone-Yeast Extract-Acetate Medium* (Noomtim dan Cheirsilp, 2011; Ibrahim dkk., 2015; Al-Shorgani dkk., 2016). Media fermentasi berupa *Nutrient Broth* dan *Reinforced Clostridial Medium* digunakan dalam penelitian ini untuk diteliti produksi biobutanol pada dua media tersebut.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Kadar glukosa dalam hidrolisat sabut kelapa dipengaruhi oleh konsentrasi larutan H_2SO_4 yang digunakan pada tahap

- hidrolisis, sehingga diperlukan optimasi pada konsentrasi larutan tersebut
2. Komposisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi dapat mempengaruhi besarnya konsentrasi produk fermentasi yang dihasilkan, sehingga perlu dilakukan optimasi pada komposisi campuran tersebut.

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini dibatasi pada variasi konsentrasi larutan H_2SO_4 yang digunakan pada tahap hidrolisis, yaitu sebesar 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, dan 2,00% (b/v). Komposisi hidrolisat sabut kelapa yang digunakan pada tahap optimasi, yaitu sebesar 50, 60, 70, 80, 90, dan 100% (v/v). Jenis media fermentasi yang digunakan, yaitu *Nutrient Broth* (NB) dan *Reinforced Clostridial Medium* (RCM); dan waktu fermentasi selama 96 jam.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi larutan asam sebagai katalis pada reaksi hidrolisis sabut kelapa
2. mengetahui komposisi optimum yang dibutuhkan dalam fermentasi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi oleh bakteri *C. acetobutylicum* untuk menghasilkan biobutanol.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi tentang produksi biobutanol dari sabut kelapa oleh bakteri *C. acetobutylicum* sebagai salah satu kandidat bahan bakar alternatif.

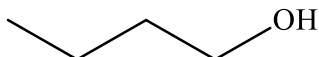
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biobutanol

Butanol, yang juga dikenal sebagai biobutanol apabila diproduksi secara biologis, adalah suatu alkohol tidak berwarna yang memiliki empat atom karbon dan rumus molekul $C_4H_{10}O$ (rumus struktur ditampilkan pada Gambar 2.1). Butanol memiliki beberapa kegunaan, antara lain sebagai pelarut, perantara dalam sintesis produk-produk kimia, dan bahan bakar. Butanol juga telah digunakan dalam berbagai bidang industri, seperti industri makanan, plastik, dan farmasi. Selain itu, produk turunan butanol banyak digunakan di industri cat dan pelapisan, resin, dan herbisida (Jiang dkk., 2015; He dkk., 2019).



Gambar 2.1 Struktur rantai butanol (1-butanol).

Butanol (1-butanol) memiliki sifat-sifat fisika dan kimia sebagai berikut (Fortman dkk., 2008; Anyanwu dkk., 2018):

- Massa molekul: 74,12 g/mol
- Wujud zat: cairan tidak berwarna
- Aroma: seperti pisang
- Titik didih: 117,6 °C
- Titik leleh: -88,6 °C
- Titik nyala: 29 °C
- Densitas: 0,81 g/mL
- Viskositas: 2,544 cP (pada temperatur 25 °C)
- Kalor pembakaran: 36,111 kJ/gram
- Kalor penguapan: 52,35 kJ/mol (pada temperatur 25 °C).

Biobutanol dapat diproduksi dari berbagai jenis gula, tanaman pertanian (seperti tebu, jagung, dan gandum), limbah pengolahan bahan makanan, dan alga. Proses yang biasa digunakan untuk memproduksi biobutanol dari bahan-bahan tersebut adalah fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE), suatu proses yang telah dikenal selama lebih dari 150 tahun (Wang dkk., 2014; Melikoglu dkk., 2016). Pada proses tersebut, digunakan mikroorganisme anaerobik terutama dari genus Clostridia, seperti *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, dan *Clostridium saccharobutylicum* (Qureshi dan Ezeji, 2008; Jones dan Woods, 1986; Ramanjaneyulu dan Reddy, 2019).

Biobutanol memiliki beberapa keunggulan yang menjadikannya sebagai bahan bakar alternatif yang menjanjikan (Ramey, 2007; Dürre, 2007), antara lain:

- Biobutanol dapat dicampur dengan bensin dalam berbagai perbandingan maupun digunakan sebagai bahan bakar tunggal dalam mesin kendaraan bermotor tanpa harus dimodifikasi sebelumnya
- Biobutanol memiliki bilangan oktan yang dekat dengan bilangan oktan yang dimiliki oleh bensin
- Biobutanol bersifat kurang korosif jika dibandingkan dengan bahan bakar alternatif yang lain (biometanol maupun bioetanol), sehingga mengurangi potensi kerusakan pada mesin kendaraan bermotor.

2.2. Sabut Kelapa

Sabut kelapa adalah salah satu bagian buah kelapa (*Cocos nucifera*) yang berupa serat-serat kasar. Kandungan yang terdapat dalam sabut kelapa antara lain selulosa (21-40%), hemiselulosa (12-27%), dan lignin (15-47%) (Yan, 2016).

Sabut kelapa merupakan limbah yang dihasilkan dari instalasi pengolahan minyak kelapa. Awalnya, sabut kelapa hanya dipandang sebagai tumpukan sampah yang dibiarkan membusuk begitu saja. Namun, saat ini sabut kelapa telah menjadi bahan biomassa yang potensial digunakan sebagai bahan baku pembuatan berbagai macam kebutuhan, salah satunya adalah bahan bakar alternatif. Hal ini disebabkan oleh melimpahnya bahan tersebut sepanjang waktu, diperkirakan mencapai 250 ribu ton, dan mudah ditemukan di banyak wilayah beriklim tropis, seperti Afrika, Asia, dan Amerika. Selain digunakan sebagai bahan baku pembuatan bahan bakar alternatif, sabut kelapa juga dapat dimanfaatkan menjadi bahan baku jok mobil, furnitur, pot, matras, pupuk, maupun kerajinan tangan (Arsène dkk., 2017; Hasan dkk., 2012).

2.3. Delignifikasi

Delignifikasi adalah tahap awal dan salah satu tahap penting dalam konversi biomassa lignoselulosa menjadi berbagai produk. Delignifikasi bertujuan untuk mengurangi kadar lignin dalam biomassa lignoselulosa sehingga selulosa yang terdapat dalam bahan tersebut dapat dikonversi lebih lanjut (Agustini dan Efiyanti, 2015).

Delignifikasi dapat dilakukan antara lain menggunakan larutan asam, larutan basa, pelarut organik, mikroorganisme, maupun enzim (Trisanti dkk., 2018; Sánchez dkk., 2011). Penggunaan larutan basa adalah metode yang sering digunakan dalam proses delignifikasi. Larutan basa akan melarutkan lignin yang terdapat dalam biomassa lignoselulosa sehingga senyawa tersebut akan mengalami perubahan struktur. Akibat dari perubahan struktur tersebut, selulosa yang terdapat dalam biomassa menjadi lebih mudah untuk dikonversi melalui proses lebih lanjut (Saleh dkk., 2009; Kurniaty dkk., 2017; Mosier dkk., 2005).

2.4. Hidrolisis

Hidrolisis berasal dari kata *hydro* yang berarti “air” dan *lysis* yang berarti “penguraian”. Berdasarkan hal tersebut, dapat didefinisikan bahwa hidrolisis adalah suatu proses pemutusan ikatan kimia dari suatu senyawa dengan adanya penambahan air (Katyal dan Morrison, 2007). Salah satu contoh penerapan proses hidrolisis adalah proses sakarifikasi. Sakarifikasi adalah proses penguraian senyawa karbohidrat (polisakarida), seperti amilum maupun selulosa, menjadi molekul-molekul gula yang lebih sederhana (Speight, 2018).

Pada umumnya, proses hidrolisis yang melibatkan senyawa organik berlangsung lambat. Hal ini disebabkan karena air adalah molekul yang bersifat polar, sedangkan senyawa organik memiliki kepolaran yang lebih rendah daripada air. Akibat dari adanya perbedaan polaritas tersebut, proses hidrolisis tidak dapat langsung terjadi. Oleh karena itu, suatu katalis biasa ditambahkan ketika proses hidrolisis dilakukan. Katalis yang dapat ditambahkan antara lain larutan asam, larutan basa, maupun enzim. Selain itu, terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya proses hidrolisis, antara lain meliputi struktur molekul substrat yang akan dihidrolisis, temperatur yang digunakan, dan pH (biasanya tergantung dari jenis katalis yang digunakan) (Katyal dan Morrison, 2007; Rogoff dan Screve, 2019; Whitehurst dan van Oort, 2010).

2.5. Fermentasi ABE (Aseton-Butanol-Etanol)

Fermentasi adalah suatu proses yang memanfaatkan kemampuan (metabolisme, biosintesis, dan reaksi enzimatik) satu atau beberapa spesies mikroorganisme untuk menghasilkan energi dari penguraian substrat berupa senyawa-senyawa organik sehingga substrat tersebut dapat diubah menjadi produk yang dikehendaki (Muhidin, 2011; Machida, 2002; Balaman, 2019; Speight, 2017). Mikroorganisme yang digunakan biasanya adalah

mikroorganisme yang tidak memiliki sifat patogen terhadap manusia, seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Aspergillus* sp., *Neurospora sitophila*, *Streptococcus thermophilus*, *Rhizopus oligosporus*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Penicillium chrysogenum*, dan *Zymomonas mobilis* (Tyagi dkk., 2019), sedangkan produk-produk yang dapat dihasilkan dari proses fermentasi antara lain:

- Biomassa sel, seperti ragi dan mikroorganisme yang berperan dalam pembuatan bahan pangan dan pakan
- Enzim, yang dapat digunakan sebagai biokatalis
- Metabolit primer, seperti butanol, asam sitrat, aseton, etanol, dan vitamin
- Metabolit sekunder, seperti antibiotik.

Fermentasi memiliki definisi yang terus berkembang selama ratusan tahun. Awalnya, istilah fermentasi berasal dari bahasa Latin *fervere* yang berarti “mendidihkan”. Arti tersebut muncul dari suatu pengamatan terhadap cacahan buah anggur yang menghasilkan gelembung-gelembung ketika dibiarkan dalam suatu bejana besar, seolah-olah seperti sesuatu yang mendidih (Alba-Lois dan Segal-Kischinevzky, 2010). Akan tetapi, definisi tersebut mengalami perkembangan setelah Gay-Lussac menyimpulkan fermentasi sebagai proses penguraian gula menjadi etanol dan karbon dioksida (CO₂) (Prescott dan Dunn, 1959). Pada tahun 1857, Louis Pasteur mendefinisikan fermentasi sebagai bentuk asosiasi antara sel, produksi gas, dan produksi senyawa-senyawa organik. Hal tersebut didasari dari suatu pengamatan bahwa fermentasi tidak hanya menghasilkan etanol, tetapi juga dapat menghasilkan senyawa-senyawa organik seperti asam laktat maupun asam asetat. Akan tetapi, definisi tersebut kembali mengalami perubahan karena terdapat fakta bahwa tidak ada gas yang dihasilkan dalam produksi asam laktat. Apalagi, diketahui pula bahwa gula bukanlah satu-satunya substrat yang dapat difermentasi. Substrat lain yang dapat difermentasi antara

lain asam-asam organik, protein, dan lemak. Hal tersebut diketahui setelah adanya temuan tentang beberapa mikroorganisme yang justru memproses substrat-substrat tersebut bukan hanya sebagai sumber makanan, melainkan juga sebagai sumber energi. Berdasarkan perkembangan tersebut, kini fermentasi dimaknai sebagai proses untuk menghasilkan energi dari penguraian substrat berupa senyawa-senyawa organik sehingga substrat tersebut dapat diubah menjadi produk yang dikehendaki. Hasil fermentasi dapat berbeda-beda tergantung dari substrat apa yang difermentasi dan bagaimana jalur metabolisme dari mikroorganisme yang digunakan (Stephenson, 1949; Doelle, 1975).

Dalam bidang bioteknologi, fermentasi disebut-sebut sebagai proses tertua yang pernah digunakan. Proses fermentasi masih dipertahankan hingga saat ini, bahkan dalam beberapa tahun terakhir terdapat sejumlah inovasi dan teknologi yang dikembangkan dalam proses ini (termasuk kultur mikroorganisme skala besar) (Money, 2016). Hal tersebut dilakukan karena proses fermentasi dapat mendayagunakan bahan-bahan bernilai ekonomi rendah menjadi produk-produk bernilai ekonomi tinggi yang bermanfaat bagi manusia.

Proses fermentasi memerlukan mikroorganisme, wadah atau tempat berlangsungnya proses fermentasi, dan substrat sebagai media pertumbuhan sekaligus sumber nutrisi bagi mikroorganisme yang digunakan. Keberlangsungan proses fermentasi tidak dapat dilepaskan dari sejumlah faktor yang mempengaruhinya (Aslanzadeh dkk., 2014). Faktor-faktor tersebut antara lain:

- **Temperatur**
Temperatur menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi keberlangsungan proses fermentasi serta keberlangsungan hidup mikroorganisme yang terdapat di dalamnya. Setiap mikroorganisme memiliki temperatur optimum tertentu untuk dapat tumbuh dan memperbanyak diri dengan cepat.

- Oksigen
Kadar oksigen dalam proses fermentasi perlu diatur sedemikian rupa karena setiap mikroorganisme memerlukan oksigen dalam kadar yang berbeda-beda untuk dapat tumbuh, memperbanyak diri, serta untuk fermentasi.
- Substrat
Setiap mikroorganisme membutuhkan substrat sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perbanyakan sel. Substrat yang dibutuhkan mikroorganisme berbeda-beda bergantung dari komposisi kimia yang diperlukan.
- Derajat keasaman (pH)
Derajat keasaman sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme.
- Inhibitor
Fermentasi dapat dipengaruhi oleh sejumlah senyawa yang terkandung dalam media fermentasi. Senyawa-senyawa tersebut dapat berasal dari hasil pemrosesan biomassa lignoselulosa maupun pemrosesan gula. Secara umum, inhibitor mengurangi hasil dan produktivitas fermentasi.

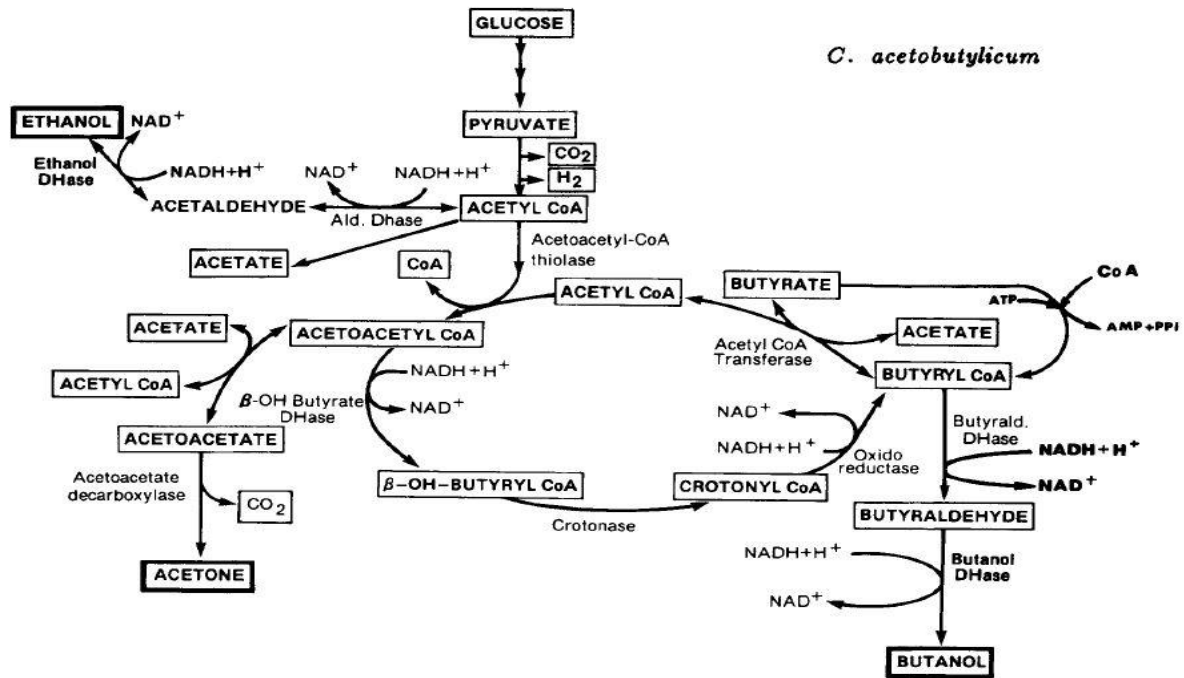
Fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) adalah suatu proses fermentasi yang digunakan untuk memproduksi biobutanol (Guan dkk., 2018). Proses ini telah dikenal lebih dari satu abad yang lalu dan telah digunakan selama beberapa dekade untuk memproduksi berbagai macam pelarut (aseton, butanol, dan etanol) dalam skala besar (Votruba dkk., 1986; Lu dkk., 2013). Fermentasi ABE pertama kali ditemukan oleh Louis Pasteur pada tahun 1862 dan dikembangkan secara besar-besaran oleh Chaim Weizmann pada tahun 1913 di Manchester (Inggris) dengan tujuan awal untuk memproduksi aseton (Green, 2011). Proses ini sempat mengalami penurunan penerapan secara signifikan pada dekade 1950-an akibat kalah bersaing dengan proses petrokimia. Namun, proses ini kembali mendapat perhatian pada dekade 1970-an akibat terjadinya krisis minyak dan telah menarik

perhatian para peneliti untuk mengembangkan proses fermentasi ABE hingga saat ini (Birgen dkk., 2019; Karimi dkk., 2015).

Fermentasi ABE berlangsung dalam keadaan anaerobik menggunakan bantuan mikroorganisme. Spesies-spesies mikroorganisme yang sering digunakan dalam proses ini antara lain *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium roseum*, *Clostridium felsienum*, dan *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Chen dkk., 2013; Al-Shorgani dkk., 2016; García dkk., 2011; Tashiro dkk., 2004). Produk utama yang dihasilkan dalam fermentasi ABE adalah butanol, sedangkan produk samping yang dihasilkan adalah aseton, etanol, asam asetat, asam butirat, dan gas (CO_2 maupun H_2) (Sukma dan Mienda, 2015; Datta dan Zeikus, 1985; Bowles dan Ellefson, 1985).

Terdapat dua tahap utama dalam fermentasi ABE, yaitu tahap asidogenesis (pembentukan asam) dan tahap solventogenesis (pembentukan pelarut) (Monot dkk., 1982). Pada tahap asidogenesis, substrat diubah menjadi asam-asam organik seperti asam asetat dan asam butirat. Substrat yang dapat digunakan antara lain monosakarida, oligosakarida, maupun polisakarida (Baral dkk., 2016; Guan dkk., 2018). Selain itu, hidrolisat biomassa lignoselulosa juga dapat digunakan sebagai substrat (Al-Tabib dkk., 2017). Selanjutnya, asam-asam tersebut diubah dalam tahap solventogenesis menjadi aseton, butanol, dan etanol dengan bantuan koenzim A transferase (Liu dkk., 2013; Lee dkk., 2008).

Jalur metabolisme yang digunakan dalam fermentasi ABE diberikan dalam Gambar 2.2 (Votruba dkk., 1986).



Gambar 2.2 Jalur metabolisme oleh *C. acetobutylicum* dalam fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) (Votruba dkk., 1986).

Glukosa mula-mula diubah menjadi piruvat melalui jalur glikolisis (jalur Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)). Molekul piruvat yang terbentuk selanjutnya diubah menjadi asetil-koenzim A dengan melepaskan gas karbon dioksida (CO₂) dan gas hidrogen (H₂). Molekul asetil-koenzim A yang terbentuk dapat diubah menjadi berbagai macam produk, seperti etanol dan asam asetat. Etanol dan asam asetat dapat dikonversi kembali membentuk aseton maupun asam butirat, lalu asam butirat dapat dikonversi lebih lanjut membentuk butanol (Suparno, 1995).

2.6. *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum adalah organisme yang secara umum digunakan dalam produksi aseton, butanol, dan etanol melalui proses yang dikenal sebagai fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE). Spesies ini sebagian besar digunakan dalam proses fermentasi ABE selama tahun 1910-an hingga akhir tahun 1950-an. Perkembangan industri petrokimia menyebabkan penurunan penggunaan proses fermentasi ini sebagai proses utama dalam industri (Buendia-Kandia dkk., 2018; Lee dkk., 2012). Fermentasi ABE oleh *C. acetobutylicum* ditandai dengan adanya dua fase khas, yaitu fase asidogenesis (pembentukan asam) dan fase solventogenesis (pembentukan pelarut) (Herman dkk., 2017).

C. acetobutylicum mampu melakukan proses metabolisme pada berbagai sumber karbon secara baik. Perbandingan konversi substrat menjadi pelarut dapat bervariasi tergantung pada sifat karbohidrat dan kondisi kultur. *C. acetobutylicum* dapat tumbuh pada media yang mengandung gula, garam, dan vitamin (Monot dkk., 1982). Saat ini, ketertarikan peneliti terhadap *C. acetobutylicum* sebagai penghasil butanol yang efektif dari substrat-substrat turunan lignoselulosa (seperti glukosa, selobiosa, dan ksilosa) telah meningkat, sehingga dihasilkan sejumlah penelitian tentang produksi butanol dari

berbagai macam substrat turunan lignoselulosa tersebut (Buendia-Kandia dkk., 2018).

Klasifikasi ilmiah bakteri *C. acetobutylicum* berdasarkan sistem penamaan dua nama (*binomial nomenclature*) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Clostridia
Bangsa	: Clostridiales
Suku	: Clostridiaceae
Marga	: Clostridium
Jenis	: <i>Clostridium acetobutylicum</i>

2.7. Analisis Kandungan Glukosa

Kandungan glukosa dalam suatu sampel dapat dianalisis secara kualitatif maupun kuantitatif. Uji kualitatif yang biasa digunakan dalam analisis kandungan glukosa antara lain uji Molisch, uji Fehling, uji Benedict, uji Barfoed, dan uji Seliwanoff (Coulter, 2009; Belitz dkk., 2009). Sementara itu, metode Luff-Schoorl, metode Nelson-Somogyi, metode fenol-asam sulfat, dan metode DNS (dinitrosalisilat) merupakan metode yang biasa digunakan dalam analisis kandungan glukosa secara kuantitatif (Sartika, 2011; Fajariah, 2012; Pratiwi, 2018; Ibrahim dkk., 2015).

Salah satu metode yang sering digunakan dalam analisis kandungan glukosa adalah metode fenol-asam sulfat. Metode fenol-asam sulfat adalah suatu metode sederhana dan cepat yang digunakan untuk mengukur kandungan glukosa dalam suatu sampel. Metode ini sering digunakan secara luas dalam analisis kuantitatif glukosa karena kemudahannya dalam penanganannya jika dibandingkan dengan metode lain yang tersedia (Dubois dkk., 1951; Masuko dkk., 2005).

Prinsip dasar yang digunakan dalam metode fenol-asam sulfat adalah senyawa glukosa dapat bereaksi dengan asam sulfat

(H₂SO₄) pekat sebagai agen pendehidrasi membentuk senyawa 5-hidroksimetilfurfural (HMF). Kemudian, senyawa ini bereaksi dengan fenol membentuk senyawa berwarna kuning kecoklatan yang dapat dideteksi dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi maksimum terjadi pada panjang gelombang 490 nm (Dubois dkk., 1956; Jain dkk., 2017; Agrawal dkk., 2015; Sablania dkk., 2019).

2.8. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah suatu metode analitik yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu sampel. Kromatografi menjadi metode yang paling sering digunakan dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif, isolasi, dan pemurnian senyawa-senyawa yang mudah menguap maupun senyawa-senyawa yang dapat larut dalam pelarut yang sesuai (Poole, 2000; Meyer, 2005; Coskun, 2016).

Kromatografi memiliki sejarah yang panjang sebagai suatu metode pemisahan. Istilah kromatografi berasal dari kata-kata dalam bahasa Yunani, yaitu *chroma* yang berarti “warna” dan *graphien* yang berarti “untuk menulis”, serta pertama kali digunakan oleh seorang ahli botani yang bernama Mikhail Semenovich Tswett pada tahun 1906 (Ettre, 2003). Pada awalnya, metode ini digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa berwarna seperti klorofil yang terkandung dalam suatu sampel. Jenis kromatografi yang digunakan hanya terbatas pada kromatografi kertas dan kromatografi kolom. Seiring dengan berjalannya waktu, jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi lebih beragam (tidak hanya terbatas pada senyawa berwarna) dan terdapat sejumlah pembaruan pada jenis kromatografi yang dapat digunakan, seperti kromatografi gas, kromatografi cair berkinerja tinggi, dan kromatografi fluida superkritis (Poole, 2000; Coskun, 2016).

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan

fase diam sehingga senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu sampel dapat dipisahkan satu sama lain (Poole, 2000; Hage, 2018; Cheremisinoff, 1996; Coskun, 2016). Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh sifat adsorpsi dan kelarutan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel. Semakin tinggi tingkat adsorpsi senyawa oleh fase diam, maka semakin lambat senyawa tersebut bergerak melalui kolom. Sementara itu, semakin tinggi kelarutan senyawa dalam fase gerak, maka semakin cepat senyawa tersebut bergerak melalui kolom (Harris, 2013). Senyawa-senyawa yang telah larut dalam fase gerak akan bergerak melalui kolom yang bertindak sebagai fase diam. Melalui proses tersebut, senyawa-senyawa akan terpisah dan dapat dianalisis menggunakan detektor, serta dapat digabungkan dengan metode lain untuk dianalisis lebih lanjut (Hage, 2018).

Jenis-jenis kromatografi yang telah dikenal antara lain (Hage, 2018; Cheremisinoff, 1996; Coskun, 2016):

- Kromatografi kertas
Kromatografi kertas merupakan metode kromatografi yang menggunakan kertas selulosa murni sebagai fase diam, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah pelarut atau campuran pelarut yang sesuai dengan sampel yang hendak dianalisis. Kertas yang bertindak sebagai fase diam dicelupkan ke dalam pelarut atau sampel, kemudian pelarut atau sampel akan diserap oleh kekuatan kapiler pada kertas sehingga terjadi pemisahan senyawa dalam sampel yang ditunjukkan oleh adanya perbedaan bercak warna pada kertas.
- Kromatografi cair
Kromatografi cair merupakan metode kromatografi yang paling umum digunakan untuk memisahkan senyawa maupun ion yang terdapat dalam suatu sampel. Senyawa atau ion dalam sampel bertindak sebagai fase gerak dan berinteraksi dengan fase diam. Interaksi yang terjadi dapat berbeda-beda tergantung dari intensitas penyerapan yang terjadi, ada atau

tidaknya pertukaran ion, maupun ukuran senyawa atau ion. Macam-macam jenis kromatografi cair antara lain:

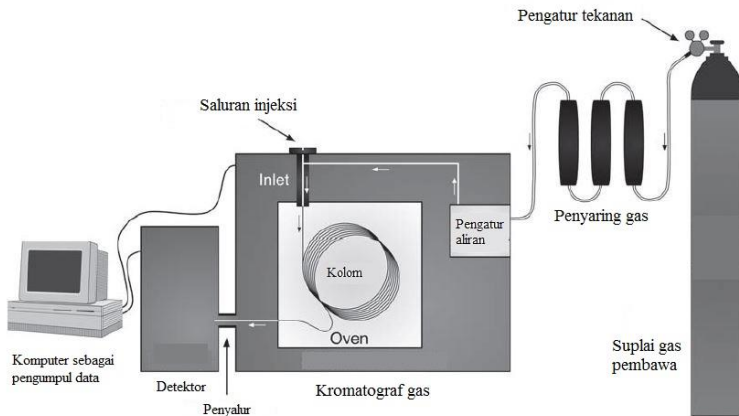
- Kromatografi fase balik (*reverse phase chromatography*), biasa digunakan untuk memisahkan senyawa yang sukar menguap
- Kromatografi cair berkinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*), memiliki prinsip yang sama dengan kromatografi fase balik namun menggunakan tekanan dan kecepatan yang lebih tinggi dalam analisisnya
- Kromatografi penukar ion (*ion exchanger chromatography*), biasa digunakan untuk memisahkan senyawa biomolekul seperti asam nukleat, asam amino, dan protein. Jenis-jenis penukar ion yaitu:
 - Penukar kation, dimana ion negatif bertindak sebagai fase diam
 - Penukar anion, dimana ion positif bertindak sebagai fase diam.
- Kromatografi eksklusi ukuran (*size exclusion chromatography*), biasa digunakan dalam pemisahan protein. Di dalam alat yang digunakan pada jenis kromatografi ini, terdapat suatu gel berpori (biasanya adalah mikropori silika) yang berfungsi untuk memisahkan senyawa berdasarkan ukurannya.
- Kromatografi lapis tipis
Kromatografi lapis tipis merupakan metode kromatografi yang digunakan dalam analisis kualitatif senyawa yang terdapat dalam suatu sampel. Pemisahan yang terjadi didasarkan pada perbedaan polaritas antara pelarut atau campuran pelarut (eluen) yang digunakan dan sampel yang dianalisis. Jenis kromatografi ini menggunakan pelat silika atau pelat alumina sebagai fase diam, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah suatu eluen yang tergantung dari jenis sampel yang akan dipisahkan. Semakin dekat polaritas antara eluen dan sampel, maka sampel akan semakin terbawa oleh

fase gerak sehingga semakin cepat terjadi pemisahan senyawa dalam sampel tersebut.

- Kromatografi gas
Kromatografi gas merupakan metode kromatografi yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa seperti gas, senyawa-senyawa mudah menguap seperti alkohol, ester, dan asam karboksilat. Kromatografi ini menggunakan gas sebagai fase gerak (biasanya adalah gas inert seperti argon, helium, atau nitrogen) dan zat cair maupun zat padat sebagai fase diam.
- Kromatografi kolom
Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi yang menggunakan kolom sebagai alat untuk memisahkan senyawa yang terdapat dalam suatu sampel. Pada jenis kromatografi ini, adsorben padat seperti gel silika, kristal silika, atau alumina bertindak sebagai fase diam dan cairan yang mengalir sepanjang kolom bertindak sebagai fase gerak. Prinsip kerja kromatografi kolom didasarkan pada adsorpsi senyawa-senyawa pada suatu sampel dengan afinitas yang berbeda-beda terhadap permukaan fase diam (adsorben). Senyawa yang memiliki afinitas besar terhadap adsorben akan tertahan, sedangkan senyawa yang memiliki afinitas rendah terhadap adsorben akan mengikuti aliran pelarut sehingga dapat dipisahkan dan dianalisis.

Kromatografi gas adalah salah satu jenis kromatografi yang digunakan untuk memisahkan dan menganalisis senyawa-senyawa yang terkandung dalam suatu sampel, terutama senyawa-senyawa yang mudah menguap (Pavia, 2018). Metode ini didasarkan pada interaksi antara fase gerak (berupa gas yang bersifat stabil (inert) atau tidak reaktif) dan fase diam (berupa zat padat atau zat cair) (Li dan Liu, 2019). Interaksi tersebut dipengaruhi oleh titik didih dan polaritas senyawa dalam sampel (Yahia dkk., 2019; Stauffer dkk., 2008). Instrumen yang digunakan dalam kromatografi gas disebut kromatograf gas (Li

dan Liu, 2019). Secara mendasar, sebuah kromatograf gas terdiri dari enam bagian, yaitu gas pembawa yang ditempatkan dalam suatu tabung bertekanan tinggi dan dilengkapi dengan pengatur tekanan dan laju alir, sistem injeksi, kolom pemisah, detektor, perekam, dan termostat untuk mengatur temperatur pada kolom dan detektor (Aniszewski, 2007).



Gambar 2.3 Suatu kromatograf gas dan bagian-bagian utamanya (Stauffer dkk., 2008).

Sampel disuntikkan melalui saluran injeksi ke dalam injektor untuk diuapkan, kemudian uap sampel tersebut dialirkan oleh gas pembawa (fase gerak) menuju kolom pemisah tempat fase diam berada. Kolom pemisah ini dilengkapi dengan pengatur temperatur. Pemisahan terjadi ketika uap sampel dialirkan melalui kolom pemisah. Pemisahan tersebut terjadi berdasarkan keterikatan senyawa-senyawa dengan kolom yang digunakan. Jika kolom yang digunakan bersifat polar, maka senyawa yang bersifat polar akan terikat lebih lama dalam kolom, sedangkan senyawa yang bersifat non-polar akan lebih cepat meninggalkan kolom dan terdeteksi oleh detektor (begitu pula sebaliknya ketika kolom yang digunakan bersifat non-polar). Selanjutnya, hasil pemisahan dapat dianalisis berdasarkan kromatogram yang

dihasilkan. Analisis yang dapat dilakukan antara lain pengujian kemurnian senyawa, identifikasi, dan penentuan komposisi (kadar) senyawa yang terkandung dalam suatu sampel (Stauffer dkk., 2008).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tahapan Penelitian

Tahapan proses produksi biobutanol dari sabut kelapa meliputi preparasi sabut kelapa secara fisik dan kimiawi, optimasi hidrolisis sabut kelapa hasil preparasi menggunakan H_2SO_4 dengan berbagai konsentrasi (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, dan 2,00% (b/v)), optimasi komposisi hidrolisat dalam media fermentasi (50, 60, 70, 80, 90, dan 100% (v/v)), dan proses fermentasi selama 96 jam. Media fermentasi yang digunakan terdiri dari dua macam, yaitu *Nutrient Broth* (NB) dan *Reinforced Clostridial Medium* (RCM), yang keduanya ditambah hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi. Hasil fermentasi dari masing-masing media fermentasi yang digunakan dianalisis menggunakan kromatografi gas untuk penentuan kadar butanol dalam sampel.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan dan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, corong kaca, labu Erlenmeyer, jarum ose, botol vial, kertas saring, botol *Falcon*, kaca arloji, batang pengaduk, spatula, botol timbang, pipet tetes, pipet ukur, bola hisap, kotak pendingin (Modena), pemanas (Thermolyne), lemari asam, *autoclave* (GEA), inkubator (Thermoshake Gerhardt), *rotary shaker* (Thermolyne), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-VIS), neraca analitik (O'Haus), neraca tiga lengan, *laminary air flow*, spektrofotometer (Optima SP-300), dan sentrifus (Centrifuge IEC CL40R).

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sabut kelapa, kultur murni *C. acetobutylicum* (Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta), NaOH (SAP Chemicals), akuades, H₂SO₄ 98% (b/v), kristal C₆H₅OH, *Nutrient Agar* (Merck), *Nutrient Broth* (Oxoid), Bacto Agar (Difco), ekstrak daging sapi (Difco), pepton (Oxoid), glukosa (Merck), NaCl (SAP Chemicals), ekstrak ragi (Merck), CH₃COONa (SAP Chemicals), amilum (Merck), dan jantung sapi cincang.

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Preparasi Sabut Kelapa

3.3.1.1. Preparasi Sabut Kelapa secara Fisik

Sabut kelapa yang diperoleh dari sisa pengolahan buah kelapa di Pasar Pakis, Surabaya, mula-mula dicuci menggunakan air kran yang mengalir untuk menghilangkan kandungan debu dan kotoran yang menempel. Setelah itu, sabut kelapa yang telah dibersihkan dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dijemur di bawah sinar matahari hingga kering. Sabut kelapa yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan *blender* dan disimpan dalam kantong plastik pada temperatur ruang sebelum digunakan.

3.3.1.2. Preparasi Sabut Kelapa secara Kimiawi

Sebanyak 50 g sabut kelapa hasil preparasi fisik dilarutkan dalam 500 mL NaOH 10% (b/v) dan dididihkan selama 15 menit (Noomtim dan Cheirsilp, 2011). Campuran didinginkan dan disaring untuk memisahkan filtrat dan sabut kelapa hasil preparasi. Sabut kelapa hasil preparasi dicuci dengan air hingga kandungan alkali pada sabut kelapa hilang, kemudian dikeringkan.

3.3.2. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa digunakan untuk menentukan kadar glukosa dalam suatu sampel. Mula-mula, larutan standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi sebesar 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Selanjutnya, masing-masing larutan glukosa tersebut diambil sebanyak 1 mL dan diteteskan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambah dengan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) sambil dikocok. Sebanyak 5 mL H₂SO₄ 98% (b/v) ditambahkan secara cepat ke dalam tabung reaksi yang berisi campuran larutan glukosa dan fenol sambil direndam dalam air hangat dan didiamkan selama 10 menit. Hasil reaksi kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm (Dubois dkk., 1956). Blanko berupa akuades juga disiapkan dan diberi perlakuan yang sama dengan larutan-larutan glukosa tersebut. Kurva standar glukosa diperoleh melalui plot grafik dengan sumbu X merupakan konsentrasi glukosa dan sumbu Y merupakan absorbansi. Persamaan regresi yang diperoleh nantinya digunakan untuk menentukan kadar glukosa dalam sampel.

3.3.3. Hidrolisis Sabut Kelapa Hasil Preparasi

Sebanyak 5 g sabut kelapa hasil preparasi dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan pada masing-masing labu ditambahkan 100 mL H₂SO₄ dengan berbagai variasi konsentrasi, yaitu 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, dan 2,00% (b/v). Campuran didiamkan selama 15 menit dan selanjutnya dipanaskan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 1 jam. Setelah itu, campuran didinginkan dan disaring untuk memisahkan hidrolisat dan sabut kelapa yang masih tersisa. Hidrolisat yang diperoleh diatur pH-nya hingga bernilai 7±0,2 menggunakan NaOH (Noomtim dan Cheirsilp, 2011). Kandungan glukosa dari masing-masing hidrolisat yang telah diatur pH-nya diukur menggunakan metode fenol-asam sulfat (Dubois dkk., 1956) yang dihubungkan dengan kurva standar glukosa yang telah

diperoleh sebelumnya. Hidrolisat dengan kandungan glukosa tertinggi digunakan untuk proses fermentasi.

3.3.4. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Media yang digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum* terdiri dari dua macam, yaitu *Nutrient Agar* (NA) dan *Reinforced Clostridial Agar* (RCA). Masing-masing media dibuat sebanyak 100 mL dan disiapkan dalam bentuk media agar miring.

NA: Sebanyak 20 g/L NA siap pakai (Merck) dilarutkan dalam akuades dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, tuang sebanyak 6-7 mL media ke dalam masing-masing tabung reaksi dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, media didinginkan dalam kondisi steril dengan posisi tabung reaksi berada dalam keadaan miring hingga menjadi padat.

RCA: Media RCA memiliki komposisi sebagai berikut: 13,5 g/L agar, 10 g/L ekstrak daging sapi, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl, 5 g/L glukosa, 3 g/L ekstrak ragi, 3 g/L CH₃COONa, 1 g/L amilum, dan 0,5 g/L L-sistein. Pada penelitian ini, komponen L-sistein diganti dengan jantung sapi cincang dalam jumlah yang sama. Komponen-komponen tersebut dicampur dan dilarutkan dalam akuades, lalu dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, tuang sebanyak 6-7 mL media ke dalam masing-masing tabung reaksi dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 115 °C selama 15 menit. Setelah itu, media didinginkan dalam kondisi steril dengan posisi tabung reaksi berada dalam keadaan miring hingga menjadi padat (Atlas, 2010).

3.3.5. Regenerasi Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Sebanyak satu koloni bakteri *C. acetobutylicum* yang berasal dari kultur murni (Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta) diambil menggunakan jarum ose steril dan diinokulasikan pada media agar miring yang berisi NA maupun

RCA steril, lalu diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam (Ibrahim dkk., 2015).

3.3.6. Pembuatan Media Fermentasi

Media yang digunakan sebagai media fermentasi hidrolisat sabut kelapa terdiri dari dua macam, yaitu NB dan RCM. Masing-masing media dibuat sebanyak 100 mL dan disiapkan dalam bentuk media cair.

NB: Sebanyak 8 g/L NB siap pakai (Merck) dilarutkan dalam akuades dan diaduk hingga larut sempurna. Setelah larut sempurna, media disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, media didinginkan dalam kondisi steril dan disimpan dalam kotak pendingin sebelum digunakan.

RCM: Media RCM memiliki komposisi sebagai berikut: 10 g/L ekstrak daging sapi, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl, 5 g/L glukosa, 3 g/L ekstrak ragi, 3 g/L CH₃COONa, 1 g/L amilum, dan 0,5 g/L L-sistein. Pada penelitian ini, komponen L-sistein diganti dengan jantung sapi cincang dalam jumlah yang sama dan media tidak ditambahkan glukosa karena nantinya sumber glukosa berasal dari hidrolisat sabut kelapa yang telah dinetralkan. Komponen-komponen tersebut dicampur dan dilarutkan dalam akuades, lalu dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, media disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 115 °C selama 15 menit. Setelah itu, media didinginkan dalam kondisi steril dan disimpan dalam kotak pendingin sebelum digunakan (Atlas, 2010).

3.3.7. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Optimasi pada komposisi hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi dilakukan menggunakan variasi konsentrasi hidrolisat sabut kelapa sebesar 50, 60, 70, 80, 90, dan 100% (v/v)

dengan volume total campuran adalah 40 mL. Media fermentasi yang digunakan terdiri dari dua macam, yaitu NB dan RCM.

Hidrolisat sabut kelapa dibuat melalui hidrolisis 10 g sabut kelapa hasil preparasi menggunakan 200 mL larutan H_2SO_4 dengan konsentrasi yang menghasilkan glukosa dengan kadar tertinggi (hasil Subbab 3.3.3) pada temperatur 121 °C selama 1 jam. Hidrolisat yang diperoleh diatur pH-nya menggunakan NaOH hingga bernilai $7,0 \pm 0,2$. Hidrolisat yang telah dibuat dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berbeda-beda sesuai dengan variasi konsentrasi yang akan digunakan. Media fermentasi yang telah dibuat, yaitu NB maupun RCM dicampurkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi hidrolisat sabut kelapa hingga volume dalam masing-masing labu Erlenmeyer mencapai 40 mL. Terdapat enam buah labu Erlenmeyer yang berisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi NB serta enam buah labu Erlenmeyer yang berisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi RCM. Campuran-campuran yang telah dibuat selanjutnya disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit, lalu didinginkan dengan tetap memperhatikan sterilitasnya.

Sebanyak satu ose bakteri *C. acetobutylicum* diinokulasi dari media pertumbuhan yang ada ke dalam masing-masing campuran yang mengandung media fermentasi yang analog. Campuran diaduk dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *rotary shaker* selama 24 jam. Setelah pengadukan selesai, densitas optik dari masing-masing campuran diukur pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer. Campuran dengan densitas optik tertinggi, masing-masing dari campuran dengan NB maupun campuran dengan RCM, digunakan pada tahap produksi biobutanol.

3.3.8. Fermentasi Campuran Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Produksi Biobutanol

Fermentasi pada penelitian ini dilakukan berdasarkan hasil optimasi komposisi hidrolisat dan media fermentasi yang telah dilakukan. Fermentasi dimulai dengan menginokulasi satu ose bakteri *C. acetobutylicum* ke dalam masing-masing campuran berbasis media fermentasi NB maupun campuran berbasis media fermentasi RCM yang telah disiapkan. Media yang telah diinokulasi selanjutnya dikocok dengan kecepatan putar sebesar 150 rpm selama 96 jam menggunakan *rotary shaker* (Ibrahim dkk., 2015). Sebanyak 2 mL cairan sampel dari setiap labu Erlenmeyer diambil setiap 2 jam untuk penentuan kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum*, sedangkan 5 mL cairan sampel dari setiap labu Erlenmeyer diambil setiap 24 jam dan ditampung dalam botol vial, kemudian disimpan dalam kotak pendingin sebelum analisis sampel berupa pengukuran kadar glukosa beserta produk hasil fermentasi dilakukan.

3.3.9. Analisis Kandungan Biobutanol dengan Kromatografi Gas

Sampel yang diambil setiap 2 jam diukur densitas optiknya pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) untuk penentuan kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum*, sedangkan sampel yang diambil setiap 24 jam dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2.500 rpm selama 20 menit menggunakan sentrifus (Centrifuge IEC CL40R) untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk penentuan konsentrasi glukosa dan produk hasil fermentasi (Ibrahim dkk., 2015). Konsentrasi glukosa ditentukan menggunakan metode fenol-asam sulfat (Dubois dkk., 1956) yang dihubungkan dengan kurva standar glukosa yang telah diperoleh sebelumnya, sedangkan konsentrasi produk hasil fermentasi ditentukan menggunakan kromatografi gas (Shimadzu). Analisis menggunakan kromatografi gas dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Kromatografi gas

yang digunakan dilengkapi dengan detektor jenis *flame ionization detector* (FID). Kondisi operasi pada kromatografi gas yang digunakan yaitu temperatur pada saluran injeksi maupun detektor sebesar 280 °C, gas pembawa sebagai fase gerak berupa gas helium, laju alir pada saluran injeksi sebesar 16 mL/menit, temperatur pada oven diatur pada rentang 50-260 °C dengan laju pemanasan sebesar 8 °C/menit, dan temperatur maksimum pada kolom yang digunakan sebesar 330 °C.

Konsentrasi produk hasil fermentasi berupa butanol dan etanol yang terkandung dalam masing-masing sampel ditentukan menggunakan persamaan berikut (Fajariah, 2012 dan Pratiwi, 2018):

$$\% \text{ konsentrasi sampel} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \times \text{konsentrasi standar} \quad (3.1)$$

Keterangan:

A_{sampel} = luas puncak sampel pada kromatogram

A_{standar} = luas puncak standar pada kromatogram

Konsentrasi standar = 25,000% (butanol) dan 75,000% (etanol)
(Lampiran B.7)

Apabila konsentrasi dinyatakan dalam bentuk g/L, dapat digunakan persamaan berikut:

$$K = \% \times \rho \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \quad (3.2)$$

Keterangan:

K = konsentrasi (dalam g/L)

% = konsentrasi (dalam %)

ρ = massa jenis (dalam g/mL): butanol = 0,81, etanol = 0,79

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Sabut Kelapa

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah preparasi terhadap sabut kelapa yang akan digunakan. Preparasi yang dilakukan terdiri dari dua tahap, yaitu preparasi secara fisik dan preparasi secara kimiawi. Preparasi sabut kelapa secara fisik mula-mula dilakukan dengan cara pencucian menggunakan air kran yang mengalir. Tujuan pencucian ini adalah untuk menghilangkan kandungan debu dan kotoran yang bisa jadi masih menempel pada sabut kelapa. Selain itu, pencucian juga bertujuan agar sabut kelapa tidak terlalu keras saat diberi perlakuan selanjutnya. Setelah pencucian selesai, sabut kelapa dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dijemur di bawah sinar matahari hingga kering. Tujuan pemotongan ini adalah untuk mempermudah penanganan ketika sabut kelapa diberi perlakuan selanjutnya, sedangkan penjemuran bertujuan untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat pada sabut kelapa. Setelah kering, sabut kelapa yang telah dipotong kecil-kecil dihaluskan menggunakan *blender*. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan substrat (sabut kelapa) sehingga substrat menjadi lebih mudah diakses saat diberi perlakuan lanjutan. Sabut kelapa yang telah dihaluskan disimpan dalam kantong plastik pada temperatur ruang sebelum diberi perlakuan selanjutnya.

Setelah dipreparasi secara fisik, sabut kelapa dipreparasi secara kimiawi. Preparasi secara kimiawi sering disebut sebagai delignifikasi, yaitu proses pengurangan kandungan lignin yang terkandung dalam biomassa lignoselulosa seperti sabut kelapa. Biomassa lignoselulosa mengandung lignin yang menyelimuti seluruh bagian dinding sel biomassa. Akibat adanya lignin, selulosa yang terdapat di dalam biomassa lignoselulosa menjadi

lebih sulit untuk dikonversi lebih lanjut. Oleh karena itu, preparasi (delignifikasi) diperlukan untuk mengubah struktur lignin atau mengurangi kandungan lignin dalam biomassa lignoselulosa sehingga selulosa yang terdapat di dalam biomassa tersebut menjadi lebih mudah untuk dikonversi lebih lanjut (Agustini dan Efiyanti, 2015; Kurniaty dkk., 2017). Salah satu cara yang dapat digunakan pada tahap delignifikasi adalah dengan menambahkan larutan basa ke dalam wadah berisi biomassa lignoselulosa yang akan digunakan. Pada penelitian ini, larutan NaOH 10% (b/v) ditambahkan ke dalam sabut kelapa yang sebelumnya telah dipreparasi secara fisik. Larutan NaOH diketahui dapat memutus ikatan yang menghubungkan antara lignin dan selulosa sekaligus melarutkan lignin dari biomassa lignoselulosa. Setelah larutan ditambahkan, dilakukan pemanasan dan pendidihan selama 15 menit. Perlakuan-perlakuan ini bertujuan untuk mengurangi derajat polimerisasi dan derajat kristalisasi lignoselulosa dalam sabut kelapa sehingga selulosa menjadi lebih mudah diakses dan dikonversi lebih lanjut (Noomtim dan Cheirsilp, 2011; Trisanti dkk., 2018).

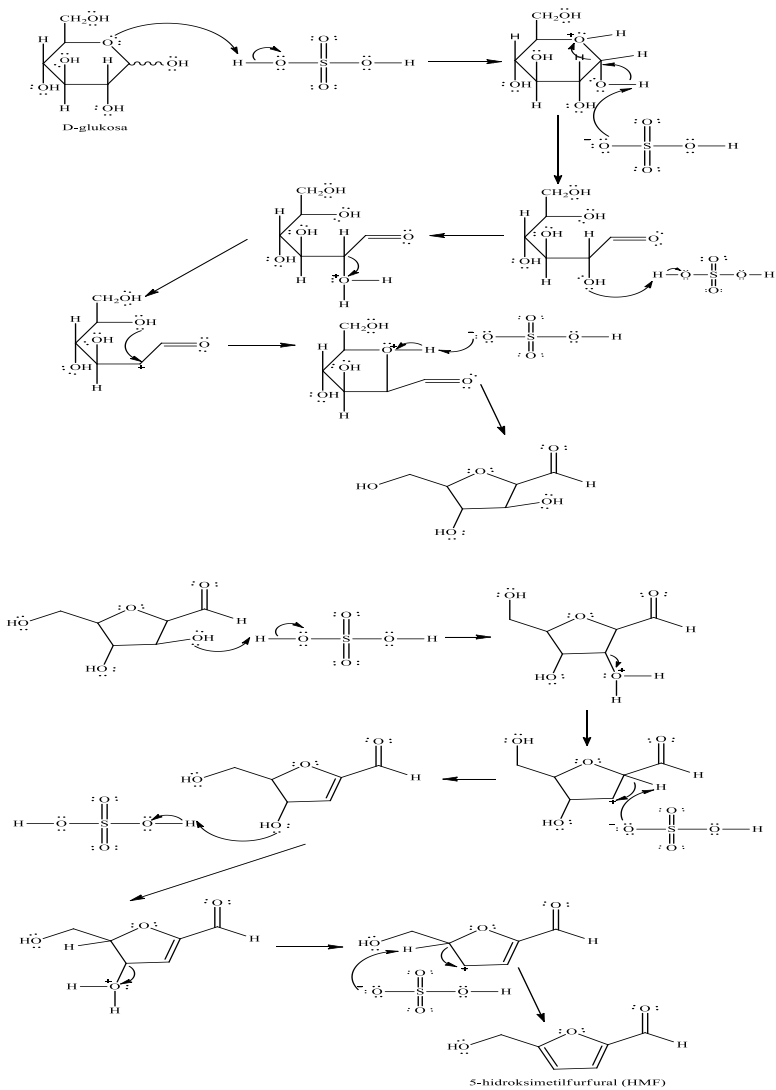
Setelah tahap delignifikasi, campuran didinginkan dan disaring untuk memperoleh sabut kelapa hasil delignifikasi. Selain sabut kelapa hasil delignifikasi, diperoleh pula filtrat berwarna coklat kehitaman (Gambar 4.1). Terbentuknya filtrat tersebut menunjukkan bahwa lignin telah dilarutkan dari sabut kelapa dengan adanya penambahan larutan NaOH 10% (b/v). Selanjutnya, sabut kelapa yang diperoleh dicuci menggunakan air untuk menghilangkan kandungan alkali yang masih tersisa lalu dikeringkan (Ibrahim dkk., 2015). Sabut kelapa yang telah dipreparasi secara fisik dan kimiawi siap diberi perlakuan selanjutnya.



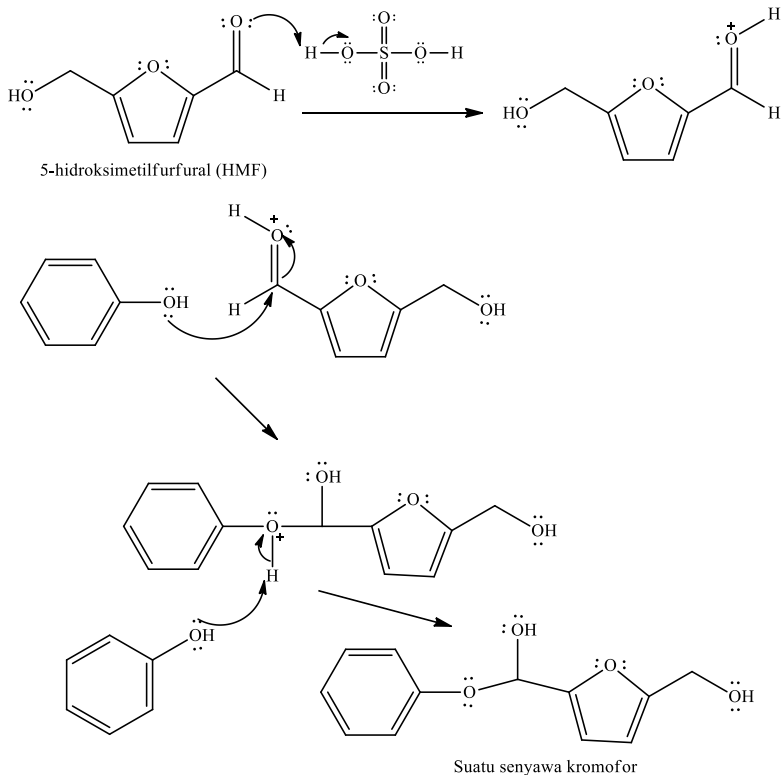
Gambar 4.1 Filtrat coklat kehitaman yang dihasilkan pada delignifikasi sabut kelapa.

4.2. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pada penelitian ini, telah dilakukan pembuatan kurva standar glukosa. Dalam pembuatan kurva standar glukosa, mula-mula disiapkan larutan induk glukosa dengan konsentrasi sebesar 100 ppm. Larutan induk tersebut kemudian diencerkan dengan akuades menjadi larutan glukosa dengan variasi konsentrasi sebesar 20, 40, 60, dan 80 ppm. Konsentrasi larutan glukosa dibuat bervariasi agar nantinya diperoleh suatu kurva berupa garis lurus. Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan tersebut diteteskan ke dalam tabung reaksi yang berbeda-beda dan ditambahkan dengan 1 mL larutan fenol 5% (b/v). Setelah itu, tabung reaksi tersebut direndam dalam penangas air hangat dan ditambahkan dengan 5 mL H_2SO_4 98% (b/v) secara cepat sambil dikocok, kemudian didiamkan dalam penangas air hangat selama 10 menit. Penambahan larutan H_2SO_4 98% (b/v) menyebabkan glukosa terkonversi menjadi senyawa 5-hidroksimetilfurfural, sedangkan penambahan larutan fenol 5% (b/v) menyebabkan terjadinya reaksi pengompleksan senyawa 5-hidroksimetilfurfural sehingga senyawa menjadi berwarna kecoklatan dan dapat dideteksi oleh spektrofotometer UV-Vis. Mekanisme reaksi tersebut ditampilkan pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3.



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi glukosa menjadi 5-hidroksimetilfurfural (HMF) (Ganado dan Franco, 2019).



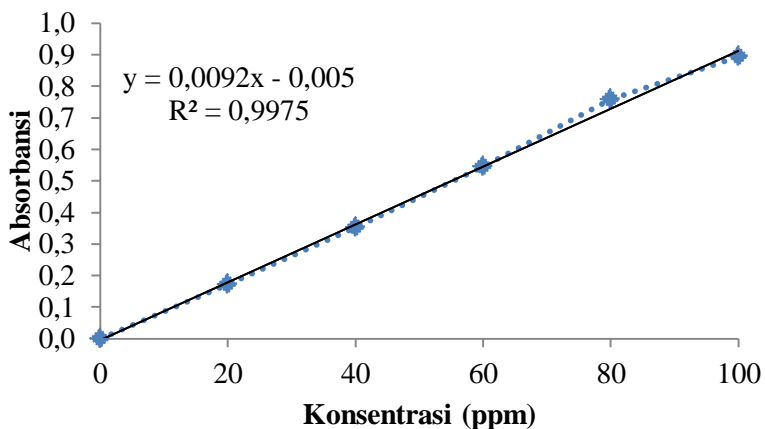
Gambar 4.3 Mekanisme reaksi pembentukan senyawa kromofor dari 5-hidroksimetilfurfural (HMF) dengan adanya penambahan fenol (Viel dkk., 2018).

Campuran hasil reaksi tersebut kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm (Dubois dkk., 1956). Blanko berupa akuades juga disiapkan dan diberi perlakuan yang sama dengan larutan-larutan glukosa tersebut. Data absorbansi ditampilkan dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data Absorbansi Larutan Glukosa.

Konsentrasi Larutan Glukosa (ppm)	Absorbansi
0	0,000
20	0,172
40	0,352
60	0,545
80	0,759
100	0,893

Berdasarkan Tabel 4.1, kurva standar glukosa dapat dibuat dengan plot sumbu X (absis) berupa konsentrasi larutan glukosa (dalam ppm) dan sumbu Y (ordinat) berupa absorbansi. Kurva tersebut ditunjukkan dalam Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kurva standar glukosa.

Berdasarkan kurva standar yang diperoleh, didapatkan persamaan regresi $y = 0,0092x - 0,005$, dimana x adalah

konsentrasi (dalam ppm) dan y adalah absorbansi. Selain itu, diperoleh pula nilai R^2 (koefisien determinasi, bentuk kuadrat dari koefisien korelasi (r)) sebesar 0,9975. Persamaan regresi tersebut nantinya digunakan untuk menentukan kadar glukosa yang terkandung dalam hidrolisat sabut kelapa maupun sampel hasil fermentasi.

4.3. Hidrolisis Sabut Kelapa Hasil Preparasi

Tahapan berikutnya yang dilakukan dalam penelitian ini adalah hidrolisis sabut kelapa hasil preparasi. Hidrolisis bertujuan untuk mengubah senyawa selulosa yang terkandung pada sabut kelapa menjadi molekul-molekul gula yang lebih sederhana. Gula yang dihasilkan dalam tahap hidrolisis nantinya akan digunakan sebagai substrat dalam tahap fermentasi untuk menghasilkan berbagai produk.

Pada keadaan biasa, reaksi hidrolisis berlangsung lambat sehingga diperlukan suatu katalis untuk mempercepat terjadinya reaksi. Salah satu katalis yang dapat digunakan dalam reaksi hidrolisis adalah larutan asam. Pada penelitian ini, hidrolisis dilakukan menggunakan larutan H_2SO_4 . Pemilihan larutan asam sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis memiliki beberapa keuntungan, antara lain biaya yang dikeluarkan menjadi lebih murah (ekonomis), kemampuan menghidrolisis yang lebih baik, dan waktu yang dibutuhkan menjadi lebih cepat jika dibandingkan dengan menggunakan enzim (García dkk., 2011). Larutan H_2SO_4 yang digunakan pada penelitian ini memiliki variasi konsentrasi yaitu 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, dan 2,00% (b/v). Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi larutan H_2SO_4 yang digunakan terhadap konsentrasi gula yang dihasilkan. Sebanyak 5 g sabut kelapa yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berbeda-beda dan pada masing-masing labu tersebut ditambahkan 100 mL larutan H_2SO_4 dengan variasi konsentrasi yang telah disebutkan sebelumnya. Setelah itu, campuran dibiarkan selama 15 menit

pada temperatur ruang dan dipanaskan selama 1 jam pada temperatur 121 °C menggunakan *autoclave*. Kemudian, campuran didinginkan lalu disaring untuk memisahkan filtrat berupa hidrolisat sabut kelapa dan residu berupa sabut kelapa yang masih tersisa. Hidrolisat sabut kelapa yang diperoleh berupa larutan berwarna kuning kecoklatan (Gambar 4.5). Selanjutnya, pH hidrolisat diatur hingga bernilai $7,0 \pm 0,2$ menggunakan NaOH. Pengaturan pH hidrolisat dilakukan untuk menciptakan kondisi optimum bagi mikroorganisme yang digunakan dalam tahap fermentasi. Setelah pengaturan pH, warna hidrolisat berubah dari kuning kecoklatan menjadi coklat (Gambar 4.5). Perubahan warna tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya degradasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam hidrolisat sabut kelapa dengan adanya penambahan larutan NaOH (Pratiwi, 2018).



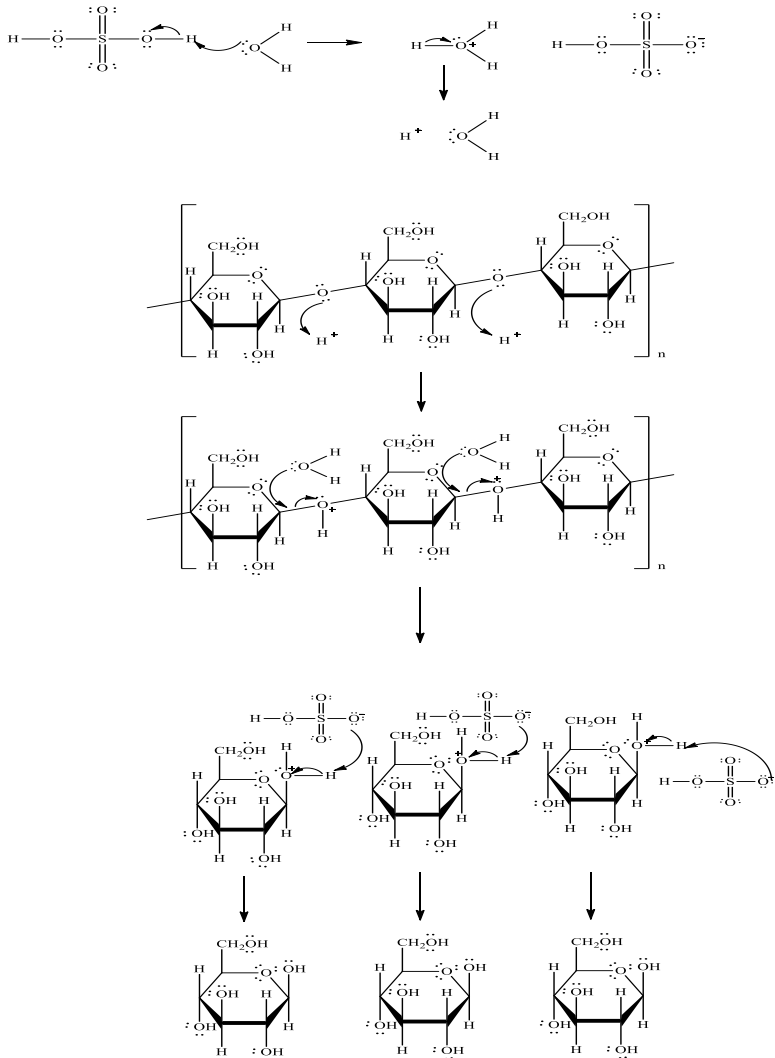
Gambar 4.5 Hidrolisat dengan konsentrasi H_2SO_4 yang berbeda (a) sebelum dan (b) setelah penetralan.

Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan adanya katalis asam ditampilkan pada Gambar 4.6. Hidrolisat yang telah diatur pH-nya diukur kadar glukosanya menggunakan metode fenol-asam sulfat (Dubois dkk., 1956) yang dihubungkan dengan kurva standar glukosa yang telah diperoleh sebelumnya. Hasil pengukuran kadar glukosa dalam hidrolisat sabut kelapa ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar Glukosa dalam Hidrolisat Sabut Kelapa.

Konsentrasi H ₂ SO ₄ (% b/v)	Kadar Glukosa (g/L)
0,25	9,89
0,50	10,30
1,00	11,14
1,50	12,07
2,00	12,48

Berdasarkan tabel di atas, hidrolisis sabut kelapa menggunakan larutan H₂SO₄ 2,00% (b/v) menghasilkan hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi, yaitu sebesar 12,48 g/L. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi daripada hasil yang diperoleh pada penelitian oleh Jannah dan Asip (2015). Pada penelitian tersebut, hidrolisis sabut kelapa menggunakan larutan H₂SO₄ 2,00% (b/v) menghasilkan glukosa dengan kadar sebesar 6,50 g/L. Sabut kelapa yang digunakan dipreparasi terlebih dahulu menggunakan larutan NaOH 3% (b/v) (Jannah dan Asip, 2015). Berdasarkan Tabel 4.2, kadar glukosa yang terdapat dalam hidrolisat sabut kelapa menjadi lebih rendah ketika konsentrasi larutan H₂SO₄ yang digunakan juga lebih rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi konsentrasi larutan H₂SO₄ yang digunakan sebagai katalis dapat mempengaruhi kadar glukosa yang dihasilkan saat tahap hidrolisis berlangsung. Semakin besar konsentrasi larutan asam yang digunakan, maka semakin cepat reaksi hidrolisis yang terjadi sehingga semakin tinggi pula kadar glukosa yang dapat dihasilkan (Jannah dan Asip, 2015; Jonglertjunya dkk., 2014). Hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi disimpan dan digunakan pada tahap fermentasi.



Gambar 4.6 Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan adanya asam sulfat (H_2SO_4) sebagai katalis (Lelekakis dkk., 2014).

4.4. Regenerasi Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Regenerasi bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri yang sebelumnya berada pada keadaan non-aktif dan tersimpan di dalam lemari pendingin. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *C. acetobutylicum* yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Bakteri tersebut telah dilaporkan sebagai salah satu bakteri penghasil biobutanol dari berbagai macam substrat (Monot dkk., 1982; Noomtim dan Cheirsilp, 2011; Fajariah, 2012; Linggang dkk., 2013; Al-Tabib dkk., 2017). Bakteri *C. acetobutylicum* diinokulasi memakai jarum ose steril menggunakan metode goresan zig-zag pada media agar miring steril yang telah disiapkan sebelumnya.

Terdapat dua jenis media pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam tahap regenerasi ini, yaitu NA dan RCA. Dua media pertumbuhan tersebut memiliki kandungan nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan bakteri dalam proses pertumbuhannya. Komposisi NA meliputi agar, ekstrak daging sapi, pepton, NaCl, dan ekstrak ragi (Atlas, 2010). Agar berfungsi sebagai agen pematat; ekstrak daging sapi, pepton, dan ekstrak ragi berfungsi sebagai sumber nitrogen, karbon, vitamin, dan mineral yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri; dan NaCl berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dalam media.

Sementara itu, RCA memiliki komposisi meliputi agar, ekstrak daging sapi, pepton, NaCl, glukosa, ekstrak ragi, CH₃COONa, amilum, dan L-sistein (Atlas, 2010). Agar berfungsi sebagai agen pematat; ekstrak daging sapi dan pepton berfungsi sebagai sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral; NaCl berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dalam media; glukosa berfungsi sebagai sumber karbon sederhana; ekstrak ragi berfungsi sebagai sumber vitamin B kompleks yang dapat merangsang pertumbuhan bakteri; CH₃COONa berfungsi sebagai sistem penyangga (*buffer*) yang menjaga kestabilan pH; amilum berfungsi sebagai agen detoksifikasi; dan L-sistein yang terdapat

pada jantung sapi cincang yang digunakan dalam penelitian ini berfungsi sebagai agen pereduksi (Hirsch dan Grinsted, 1954; Barnes dkk., 1963).

Bakteri *C. acetobutylicum* diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Temperatur tersebut merupakan temperatur optimum pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum* (Ibrahim dkk., 2015). Setelah inkubasi selama 24 jam, diperoleh hasil regenerasi berupa koloni-koloni bakteri *C. acetobutylicum* dalam media agar miring sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4.7 dan hasil tersebut siap digunakan pada prosedur berikutnya.



Gambar 4.7 Hasil regenerasi bakteri *C. acetobutylicum* pada media pertumbuhan (atas) NA dan (bawah) RCA.

4.5. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Tahapan berikutnya yang dilakukan pada penelitian ini adalah optimasi pada komposisi hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi. Tahap ini dilakukan untuk mencari kondisi yang optimum pada fermentasi hidrolisat sabut kelapa dan penentuan kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum*. Variasi konsentrasi hidrolisat sabut kelapa yang digunakan adalah 50, 60, 70, 80, 90, dan 100% (v/v) dengan volume total campuran adalah 40 mL. Media fermentasi yang digunakan terdiri dari dua macam, yaitu NB dan RCM. Komposisi NB dan RCM tidak jauh berbeda dengan masing-masing media pertumbuhan bakteri yang telah digunakan sebelumnya, yaitu NA dan RCA. Hanya saja, tidak ada penambahan agar sebagai agen pematid media pada NB maupun RCM (Atlas, 2010). Selain itu, sumber glukosa pada media fermentasi RCM diganti dengan hidrolisat sabut kelapa. Fungsi masing-masing komponen pada media bagi bakteri *C. acetobutylicum* telah dijelaskan pada Subbab 4.4.

Hidrolisat sabut kelapa dibuat melalui hidrolisis 10 g sabut kelapa hasil preparasi menggunakan 200 mL larutan H₂SO₄ 2,00% (b/v) pada temperatur 121 °C selama 1 jam. Pemilihan konsentrasi larutan H₂SO₄ tersebut didasarkan pada hasil yang diperoleh pada Subbab 4.3. Hidrolisat yang diperoleh diatur pH-nya menggunakan NaOH hingga bernilai 7,0±0,2. Hidrolisat yang telah dibuat dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berbeda-beda sesuai dengan variasi konsentrasi yang akan digunakan. Selanjutnya, media fermentasi berupa NB dan RCM dibuat dengan volume masing-masing sebanyak 100 mL. Perlu diingat bahwa pada pembuatan RCM tidak diperlukan penambahan glukosa karena sumber glukosa berasal dari hidrolisat sabut kelapa. Media yang telah dibuat dicampurkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi hidrolisat sabut kelapa hingga

volume dalam masing-masing labu Erlenmeyer mencapai 40 mL. Terdapat enam buah labu Erlenmeyer yang berisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi NB serta enam buah labu Erlenmeyer yang berisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi RCM dengan perbandingan campuran yang berbeda-beda.

Campuran-campuran yang telah dibuat selanjutnya disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit untuk menghindari terjadinya kontaminasi sebelum campuran tersebut digunakan. Kemudian, campuran didinginkan dengan tetap memperhatikan sterilitasnya. Sebanyak satu ose bakteri *C. acetobutylicum* diinokulasi dari media pertumbuhan yang ada ke dalam masing-masing campuran yang mengandung media fermentasi yang analog (bakteri dari media pertumbuhan NA diinokulasi ke dalam campuran yang mengandung NB, demikian pula bakteri dari media pertumbuhan RCA diinokulasi ke dalam campuran yang mengandung RCM). Campuran diaduk dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *rotary shaker* selama 24 jam. Pengadukan dilakukan untuk menghomogenkan campuran dengan bakteri yang diinokulasi. Setelah pengadukan selesai, densitas optik dari masing-masing campuran diukur pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran densitas optik ditampilkan pada Tabel 4.3 (a) dan Tabel 4.3 (b).

Berdasarkan Tabel 4.3 (a) dan (b), nilai OD₆₀₀ tertinggi dicapai pada campuran yang memiliki kandungan hidrolisat sabut kelapa dengan konsentrasi sebesar 50% (v/v), baik campuran dengan NB maupun campuran dengan RCM. Nilai OD₆₀₀ yang terukur pada campuran-campuran tersebut menunjukkan kondisi di mana bakteri dapat tumbuh dengan baik. Semakin tinggi nilai OD₆₀₀, maka semakin banyak bakteri yang dapat tumbuh pada suatu kultur. Berdasarkan hasil tersebut, campuran dengan komposisi hidrolisat sabut kelapa sebesar 50% (v/v), baik campuran dengan NB maupun campuran dengan RCM, digunakan pada tahap fermentasi.

Tabel 4.3 Densitas Optik Terukur pada Panjang Gelombang 600 nm dari Berbagai Macam Campuran.

(a) Media fermentasi: NB

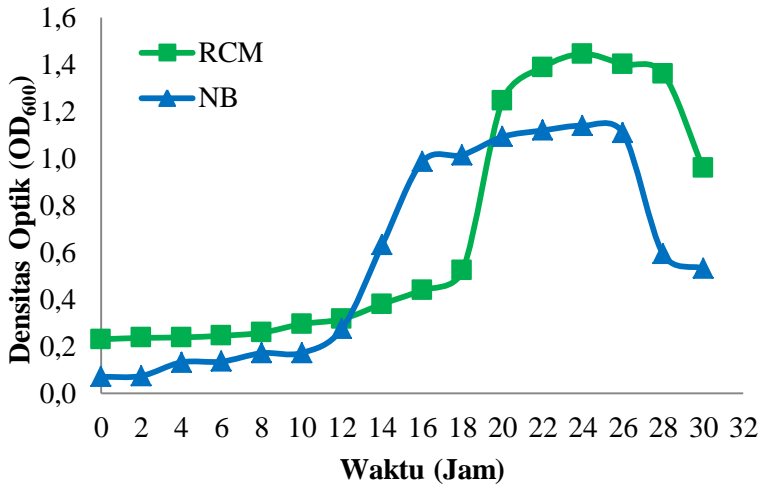
Komposisi Hidrolisat (% v/v)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD ₆₀₀) ke			OD ₆₀₀
	1	2	3	
100	0,135	0,127	0,131	0,131±0,003
90	0,167	0,164	0,166	0,166±0,001
80	0,576	0,572	0,580	0,576±0,003
70	1,001	1,010	1,005	1,005±0,004
60	1,020	1,005	1,012	1,012±0,006
50	1,130	1,140	1,150	1,140±0,008

(b) Media Fermentasi: RCM

Komposisi Hidrolisat (% v/v)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD ₆₀₀) ke			OD ₆₀₀
	1	2	3	
100	0,130	0,132	0,134	0,132±0,002
90	0,382	0,406	0,394	0,394±0,010
80	0,801	0,797	0,803	0,800±0,003
70	1,216	1,224	1,220	1,220±0,003
60	1,386	1,390	1,394	1,390±0,003
50	1,484	1,487	1,488	1,486±0,002

Pengukuran jumlah bakteri secara tidak langsung dapat dilakukan melalui pengukuran densitas optik (*Optical Density*, OD) menggunakan spektrofotometer. Meningkatnya densitas optik dalam media menandakan bahwa media menjadi semakin keruh karena meningkatnya jumlah bakteri yang tumbuh.

Kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum* ditampilkan dalam Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum*.

Berdasarkan kurva pada Gambar 4.8, terdapat empat fase pertumbuhan yang dialami oleh bakteri *C. acetobutylicum*, yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Pada fase lag, tidak ada peningkatan yang drastis dalam jumlah bakteri, namun sel-sel bakteri bermetabolisme secara aktif untuk mensintesis enzim-enzim yang diperlukan oleh sel bakteri tersebut. Tidak adanya peningkatan jumlah bakteri secara drastis dikarenakan bakteri membutuhkan waktu untuk beradaptasi dengan media pertumbuhan baru setelah dipindahkan dari media pertumbuhan sebelumnya. Ketika bakteri telah berhasil beradaptasi dengan media pertumbuhan yang baru, terjadi fase yang disebut sebagai fase eksponensial. Hal tersebut terjadi pada jam ke 12 pada media NB dan jam ke 18 pada media RCM. Pada fase ini, populasi sel bakteri akan meningkat secara eksponensial dalam waktu konstan. Bakteri membutuhkan waktu hingga beberapa jam untuk dapat tumbuh secara eksponensial hingga pada akhirnya bakteri dapat tumbuh secara eksponensial setiap jam (Hogg, 2013).

Bakteri memasuki fase stasioner ketika laju pertumbuhannya mengalami perlambatan. Fase ini terjadi pada jam ke 18 pada media NB dan jam ke 24 pada media RCM. Pada fase stasioner, laju kematian sel bakteri perlahan akan mengimbangi laju pertumbuhannya. Hal tersebut terjadi karena mulai terjadi penumpukan hasil metabolisme sel yang dapat bersifat toksik bagi bakteri. Selain itu, sumber nutrisi pada media yang mulai terbatas menyebabkan terjadinya kompetisi antar sel untuk dapat bertahan hidup. Pada suatu waktu tertentu, laju kematian sel bakteri akan lebih besar daripada laju pertumbuhan sel bakteri. Fase tersebut dikenal sebagai fase kematian. Nilai densitas optik pada fase ini mengalami penurunan karena menurunnya jumlah bakteri yang masih dapat mempertahankan hidupnya (Hogg, 2013). Fase ini terjadi mulai jam ke 26 pada media NB maupun RCM.

4.6. Fermentasi Campuran Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi untuk Produksi Biobutanol

Pada penelitian ini, dilakukan fermentasi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi menggunakan bakteri *C. acetobutylicum*. Bakteri ini telah dilaporkan mampu memproduksi berbagai produk melalui suatu proses yang dikenal sebagai fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) dengan butanol sebagai produk utamanya (Monot dkk., 1982; Noomtim dan Cheirsilp, 2011; Fajariah, 2012; Linggang dkk., 2013; Al-Tabib dkk., 2017). Fermentasi dilakukan menggunakan campuran yang terdiri dari hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi, yaitu masing-masing dengan NB dan RCM. Hidrolisat sabut kelapa yang digunakan berasal dari hasil pada tahap hidrolisis sabut kelapa hasil preparasi yang dikatalisis dengan larutan H_2SO_4 2,00% (b/v). Hidrolisis menggunakan larutan H_2SO_4 dengan konsentrasi yang disebutkan menghasilkan glukosa dengan kadar tertinggi (Subbab 4.3). Konsentrasi hidrolisat yang digunakan pada tahap fermentasi adalah 50% (v/v), dengan volume total

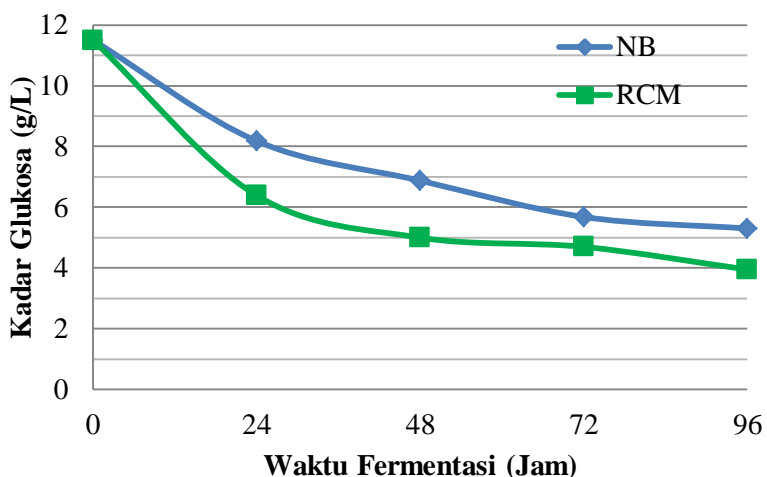
campuran adalah 100 mL. Hal ini didasarkan pada hasil yang diperoleh pada Subbab 4.5 di mana campuran dengan konsentrasi hidrolisat tersebut memberikan densitas optik tertinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi hidrolisat lainnya, baik campuran dengan media fermentasi NB maupun campuran dengan media fermentasi RCM. Nilai densitas optik yang tinggi menunjukkan bahwa bakteri dapat tumbuh dengan optimum pada campuran tersebut.

Dua buah labu Erlenmeyer yang masing-masing berisi campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi NB maupun campuran hidrolisat sabut kelapa dan media fermentasi RCM ditambahkan dengan kultur bakteri *C. acetobutylicum* dari media pertumbuhan yang analog. Kedua kultur campuran tersebut kemudian difermentasi dengan kecepatan pengadukan sebesar 150 rpm menggunakan *rotary shaker* selama 96 jam pada kondisi anaerobik. Tujuan pengadukan adalah untuk menghomogenkan campuran sehingga fermentasi dapat berlangsung dengan baik. Setiap 2 jam sekali, cairan dari masing-masing labu diambil untuk pengukuran densitas optik (OD) yang nantinya dapat menghasilkan kurva pertumbuhan bakteri *C. acetobutylicum* (telah dibahas pada Subbab 4.6). Sementara itu, setiap 24 jam sekali cairan dari masing-masing labu diambil sebanyak 5 mL untuk penentuan kadar glukosa maupun produk hasil fermentasi. Sebelum dilakukan pengukuran kadar glukosa maupun produk hasil fermentasi, cairan dipisahkan dengan sentrifugasi terlebih dahulu dengan kecepatan putar sebesar 2.500 rpm selama 20 menit untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis kadar glukosa maupun produk hasil fermentasi. Kadar glukosa diukur menggunakan metode fenol-asam sulfat (Dubois dkk., 1956) yang dihubungkan dengan kurva standar glukosa yang telah diperoleh sebelumnya, sedangkan konsentrasi produk hasil fermentasi ditentukan menggunakan kromatografi gas.

Hasil pengukuran kadar glukosa selama tahap fermentasi berlangsung ditampilkan pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.9.

Tabel 4.4 Kadar Glukosa selama Tahap Fermentasi Hidrolisat Sabut Kelapa.

Waktu fermentasi (jam)	Kadar Glukosa (dalam g/L) pada Media	
	NB	RCM
0	11,495	11,495
24	8,180	6,385
48	6,875	5,000
72	5,680	4,695
96	5,300	3,950



Gambar 4.9 Kurva konsumsi glukosa selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa.

Fermentasi pada penelitian ini dimulai dengan kadar glukosa awal sekitar 11,50 g/L pada kedua campuran. Pada campuran berbasis NB, kadar glukosa berkurang menjadi 5,30 g/L. Sementara itu, kadar glukosa berkurang menjadi 3,95 g/L pada campuran berbasis RCM setelah 96 jam fermentasi.

Penurunan kadar glukosa secara drastis terjadi pada 24 jam pertama fermentasi, yaitu sebesar 3,32 g/L pada campuran berbasis NB dan 5,11 g/L pada campuran berbasis RCM. Sedangkan setelah 24 jam, penurunan kadar glukosa pada kedua campuran terjadi secara konstan hingga 96 jam fermentasi. Penurunan kadar glukosa secara drastis disebabkan oleh adanya pertumbuhan sel bakteri *C. acetobutylicum* yang menggunakan glukosa sebagai sumber energi. Sementara itu, setelah 24 jam fermentasi mulai terjadi produksi berbagai produk oleh *C. acetobutylicum*, salah satunya adalah butanol (Ibrahim dkk., 2015) yang menjadi produk target pada penelitian ini.

Fermentasi ABE menghasilkan beberapa macam produk, antara lain asam asetat dan asam butirat yang dihasilkan pada tahap asidogenesis serta aseton, butanol, dan etanol yang dihasilkan pada tahap solventogenesis. Pada penelitian ini, hanya produk berupa butanol sebagai produk utama dan etanol sebagai salah satu produk samping yang akan diamati. Sampel hasil fermentasi dari masing-masing media yang diambil setiap 24 jam dianalisis menggunakan kromatografi gas untuk mengetahui besarnya konsentrasi butanol maupun etanol dalam sampel. Kromatogram yang dihasilkan ditunjukkan pada Lampiran B.7. Tabel 4.5 (a) dan Tabel 4.5 (b) menampilkan waktu retensi serta luas puncak yang muncul pada analisis menggunakan kromatografi gas.

Berdasarkan data pada Tabel 4.5, terdapat perbedaan waktu retensi antara butanol maupun etanol pada sampel hasil fermentasi terhadap standar yang digunakan. Hal tersebut dikenal sebagai pergeseran waktu retensi (*retention time shift*). Pergeseran ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perubahan pada temperatur kolom, ukuran kolom, maupun laju alir gas pembawa sebagai fase gerak kromatografi gas. Peningkatan laju alir gas pembawa menyebabkan waktu retensi menjadi lebih singkat, demikian pula sebaliknya. Bertambahnya panjang kolom dan berkurangnya diameter kolom menyebabkan meningkatnya waktu retensi, demikian pula sebaliknya (Rood, 1997).

Tabel 4.5 Data Waktu Retensi dan Luas Puncak berdasarkan Kromatogram pada Masing-masing Sampel.

(a) Media fermentasi: NB

Sampel	Butanol		Etanol	
	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak
Standar	6,084	$1,479 \times 10^8$	4,079	$2,639 \times 10^8$
Fermentasi 24 jam	TD	TD	3,975	$1,539 \times 10^3$
Fermentasi 48 jam	TD	TD	3,903	$1,994 \times 10^3$
Fermentasi 72 jam	TD	TD	3,799	$1,011 \times 10^3$
Fermentasi 96 jam	TD	TD	TD	TD

(b) Media fermentasi: RCM

Sampel	Butanol		Etanol	
	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak
Standar	6,084	$1,479 \times 10^8$	4,079	$2,639 \times 10^8$
Fermentasi 24 jam	TD	TD	TD	TD
Fermentasi 48 jam	TD	TD	3,952	$1,798 \times 10^4$
Fermentasi 72 jam	TD	TD	3,787	$2,514 \times 10^3$
Fermentasi 96 jam	5,787	$1,765 \times 10^5$	3,884	$1,339 \times 10^4$

*TD = tidak terdeteksi

Pada penelitian ini, waktu retensi butanol maupun etanol pada sampel menjadi lebih singkat daripada waktu retensi pada larutan standar yang digunakan. Berdasarkan penjelasan sebelumnya, maka dapat diperkirakan terjadinya pergeseran waktu retensi pada penelitian ini adalah akibat meningkatnya laju alir gas pembawa, berkurangnya panjang kolom, maupun bertambahnya diameter kolom yang digunakan pada instrumen kromatografi gas.

Perhitungan menggunakan persamaan (3.1) menghasilkan data berupa besarnya konsentrasi butanol dan etanol (dalam %) yang terkandung dalam masing-masing sampel. Data tersebut ditampilkan dalam Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Konsentrasi Produk Hasil Fermentasi Hidrolisat Sabut Kelapa (dalam %).

Media Fermentasi: NB		
Sampel	Konsentrasi (%)	
	Butanol	Etanol
Fermentasi 24 jam	TD	0,0004
Fermentasi 48 jam	TD	0,0006
Fermentasi 72 jam	TD	0,0003
Fermentasi 96 jam	TD	TD
Media Fermentasi: RCM		
Sampel	Konsentrasi (%)	
	Butanol	Etanol
Fermentasi 24 jam	TD	TD
Fermentasi 48 jam	TD	0,0051
Fermentasi 72 jam	TD	0,0007
Fermentasi 96 jam	0,0298	0,0038

*TD = tidak terdeteksi

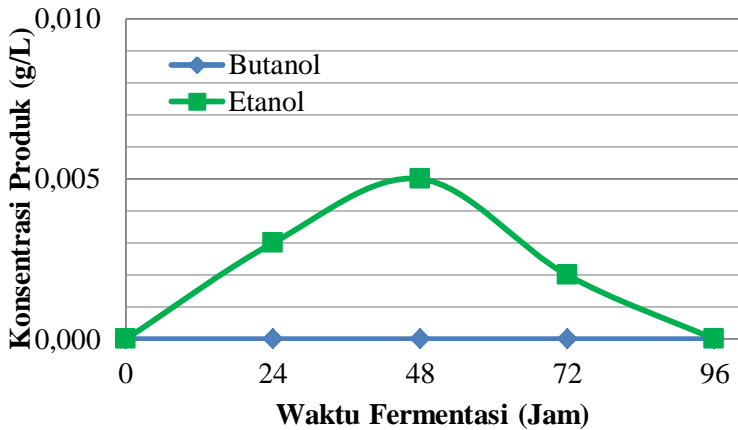
Konsentrasi produk hasil fermentasi hidrolisat sabut kelapa dapat dinyatakan dalam satuan g/L menggunakan persamaan (3.2), sehingga data pada Tabel 4.6 dapat dikonversi menjadi data pada Tabel 4.7 serta dapat dibuat grafik seperti pada

Gambar 4.10 dan Gambar 4.11. Berdasarkan data pada Tabel 4.7 serta grafik pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11, fermentasi hidrolisat sabut kelapa menghasilkan butanol dengan konsentrasi sebesar 0,241 g/L pada media berbasis RCM, sedangkan pada media berbasis NB tidak ada butanol yang dihasilkan selama 96 jam waktu fermentasi. Selain butanol sebagai produk utama, fermentasi ini juga menghasilkan etanol sebagai salah satu produk samping fermentasi oleh *C. acetobutylicum*. Konsentrasi maksimum etanol diperoleh pada 48 jam waktu fermentasi, yaitu 0,005 g/L pada media berbasis NB dan 0,040 g/L pada media berbasis RCM.

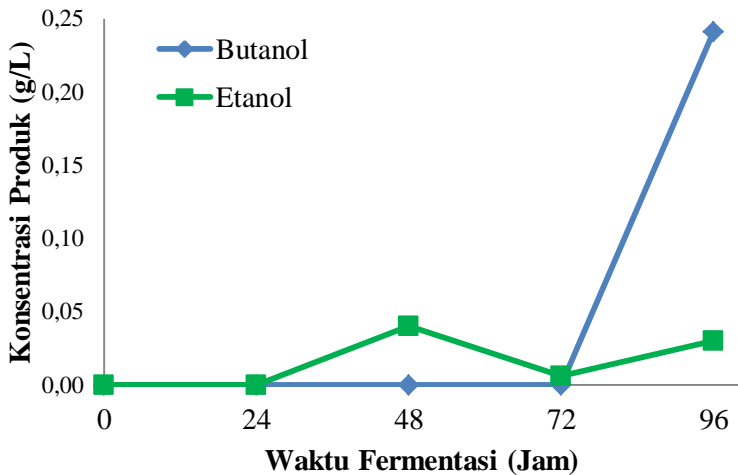
Tabel 4.7 Konsentrasi Produk Hasil Fermentasi Hidrolisat Sabut Kelapa (dalam g/L).

Media Fermentasi: NB		
Sampel	Konsentrasi (g/L)	
	Butanol	Etanol
Fermentasi 24 jam	TD	0,003
Fermentasi 48 jam	TD	0,005
Fermentasi 72 jam	TD	0,002
Fermentasi 96 jam	TD	TD
Media Fermentasi: RCM		
Sampel	Konsentrasi (g/L)	
	Butanol	Etanol
Fermentasi 24 jam	TD	TD
Fermentasi 48 jam	TD	0,040
Fermentasi 72 jam	TD	0,006
Fermentasi 96 jam	0,241	0,030

*TD = tidak terdeteksi



Gambar 4.10 Konsentrasi produk yang dihasilkan selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa pada media NB.



Gambar 4.11 Konsentrasi produk yang dihasilkan selama tahap fermentasi hidrolisat sabut kelapa pada media RCM.

Hasil-hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat dikatakan lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian-penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya (Ibrahim dkk., 2015; Al-Shorgani dkk., 2016). Pada penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim dkk. (2015), fermentasi 25 g/L glukosa yang berasal dari hidrolisat tandan kosong kelapa sawit menghasilkan butanol dan etanol dengan konsentrasi masing-masing sebesar 1,94 dan 0,09 g/L. Pada penelitian yang lain, fermentasi 30 g/L glukosa menghasilkan butanol dengan konsentrasi sebesar 6,2 g/L (Al-Shorgani dkk., 2016). Penelitian-penelitian tersebut menggunakan spesies bakteri yang sama seperti spesies bakteri yang digunakan dalam penelitian ini, namun menggunakan enzim sebagai katalis pada tahap hidrolisis, alih-alih menggunakan larutan asam. Rendahnya konsentrasi produk yang diperoleh pada penelitian ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:

1. Senyawa Inhibitor

Pada penelitian ini, metode hidrolisis yang digunakan adalah hidrolisis yang dikatalisis oleh larutan asam. Pada keadaan biasa, hidrolisis berlangsung lambat sehingga diperlukan suatu katalis untuk mempercepat reaksi hidrolisis. Penggunaan larutan asam sebagai katalis memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan penggunaan enzim, seperti biaya yang relatif lebih murah, waktu hidrolisis yang lebih singkat, dan perolehan glukosa yang lebih banyak (García dkk., 2011). Akan tetapi, proses hidrolisis biomassa lignoselulosa seperti sabut kelapa yang menggunakan larutan asam sebagai katalis dapat memicu terbentuknya senyawa-senyawa yang dapat menghambat proses fermentasi. Contoh senyawa tersebut antara lain furfural, 5-hidroksimetilfurfural (HMF), asam levulinat, asam format, asam 4-hidroksibenzoat, asam vanilat, vanillin, fenol, dan formaldehida. Semakin tinggi konsentrasi larutan asam yang digunakan, maka semakin tinggi konsentrasi glukosa yang dapat dihasilkan, namun semakin tinggi pula konsentrasi senyawa-senyawa

inhibitor yang ikut dihasilkan sehingga proses fermentasi menjadi terhambat (Noomtim dan Cheirsilp, 2011; Pratiwi, 2018).

2. Komposisi Media

Terdapat dua macam media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini, yaitu NB dan RCM. Hal ini bertujuan untuk mengetahui potensi penggunaan dua media tersebut dalam produksi biobutanol oleh bakteri *C. acetobutylicum*, terlebih lagi belum ada penelitian yang menggunakan media fermentasi NB dalam proses fermentasi menghasilkan biobutanol. NB dan RCM memiliki perbedaan dalam hal komposisi yang terkandung di dalamnya. Dua media tersebut sama-sama memiliki kandungan ekstrak daging sapi, pepton, NaCl, ekstrak ragi, serta glukosa yang berasal dari hidrolisat sabut kelapa. Akan tetapi, RCM memiliki komposisi tambahan berupa CH_3COONa , amilum, dan L-sistein yang juga dibutuhkan oleh bakteri *C. acetobutylicum* (Hirsch dan Grinsted, 1954; Barnes dkk., 1963; Atlas, 2010). Pada penelitian ini, bakteri tersebut dapat tumbuh pada dua media fermentasi yang digunakan. Namun, terdapat perbedaan kemampuan bakteri dalam memfermentasi hidrolisat sabut kelapa pada dua media yang digunakan. Fermentasi pada media berbasis NB hanya mampu menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang sangat rendah, sedangkan fermentasi pada media berbasis RCM mampu menghasilkan etanol dan butanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Hidrolisis sabut kelapa menggunakan larutan H_2SO_4 2,00% (b/v) menghasilkan hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi, yaitu sebesar 12,48 g/L
2. Campuran dengan komposisi hidrolisat 50% (v/v) menghasilkan densitas optik tertinggi pada 24 jam, yaitu $1,140 \pm 0,008$ pada media NB dan $1,486 \pm 0,002$ pada media RCM
3. Fermentasi hidrolisat sabut kelapa (komposisi hidrolisat 50% v/v) menghasilkan biobutanol hanya pada media RCM dengan konsentrasi sebesar 0,241 g/L selama 96 jam waktu fermentasi.

5.2. Saran

Saran yang dapat dilakukan untuk penelitian yang akan datang antara lain:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang produksi biobutanol menggunakan bahan biomassa lignoselulosa, media fermentasi, dan spesies bakteri penghasil biobutanol yang berbeda
2. Perlu dilakukan optimasi waktu fermentasi untuk mengetahui waktu optimum fermentasi
3. Perlu dilakukan pengembangan metode pemisahan dan/atau pemurnian biobutanol sebagai salah satu sumber bahan bakar yang menjanjikan pada masa depan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, N., Minj, D. K., dan Rani, K. 2015. "Estimation of Total Carbohydrate Present in Dry Fruits". *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology, and Food Technology* Vol. 1, No. 6, hal. 24-27.
- Agustini, L. dan Efiyanti, L. 2015. "Pengaruh Perlakuan Delignifikasi terhadap Hidrolisis Selulosa dan Produksi Etanol dari Limbah Berlignoselulosa". *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* Vol. 33, No. 1, hal. 69-80.
- Alba-Lois, L. dan Segal-Kischinevzky, C. 2010. "Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine". *Nature Education* Vol. 3, No. 9, hal. 7.
- Al-Shorgani, N. K. N., Isa, Mohd. H. Mohd., Yusoff, W. M. W., Kalil, Mohd. S., dan Hamid, A. A. 2016. "Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* Strain and Characterization of Its Fermentation Performance on Agricultural Wastes". *Renewable Energy* Vol. 86, hal. 459-465.
- Al-Tabib, A. I., Al-Shorgani, N. K. N., Hasan, H. A., Hamid, A. A., dan Kalil, Mohd. S. 2017. "Production of Acetone, Butanol, and Ethanol (ABE) by *Clostridium acetobutylicum* YM1 from Pretreated Palm Kernel Cake in Batch Culture Fermentation". *BioResources* Vol. 12, No. 2, hal. 3.371-3.386.
- Aniszewski, T. 2007. *Alkaloids – Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications, and Ecological Role*. Amsterdam: Elsevier.
- Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A., dan Olabi, A. G. 2018. *Micro-Macroalgae Properties and Applications* dalam Hashmi, S. dan Mridha, S. (Eds.). *Module in Materials Science and Materials Engineering*. Paisley: Elsevier.
- Arsène, M., Bilba, K., dan Onésippe, C. 2017. *Treatments for Viable Utilization of Vegetable Fibers in Inorganic-based*

- Composites* dalam Junior, H. S., Fiorelli, J., dan dos Santos, S. F. (Eds.). *Sustainable and Nonconventional Construction Materials using Inorganic Bonded Fiber Composites*. Duxford: Woodhead Publishing.
- Aslanzadeh, S., Ishola, M. M., Richards, T., dan Taherzadeh, M. J. 2014. *An Overview of Existing Individual Unit Operations* dalam Qureshi, N., Hodge, D. B., dan Vertès, A. A. (Eds.). *Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels (Ethanol and Butanol)*. Amsterdam: Elsevier.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. Northwest: Taylor and Francis Group.
- Balaman, Ş. Y. 2019. *Decision-Making for Biomass-Based Production Chains*. London: Elsevier.
- Baral, N. R., Slutzky, J. L., Shah, A., Ezeji, T. C., Cornish, K., dan Christy, A. 2016. “Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation of Corn Stover: Current Production Methods, Economic Viability, and Commercial Use”. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 363, No. 6, hal. fnw033.
- Barnes, E. M., Despaul, J. E., dan Ingram, M. 1963. “The Behaviour of a Food Poisoning Strain of *Clostridium welchii* in Beef”. *Journal of Applied Bacteriology* Vol. 26, No. 3, hal. 415-427.
- Belitz, H., Grosch, H., dan Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Berlin: Springer.
- Birgen, C., Dürre, P., Preisig, H. A., dan Wentzel, A. 2019. “Butanol Production from Lignocellulosic Biomass: Revisiting Fermentation Performance Indicators with Exploratory Data Analysis”. *Biotechnology for Biofuels* Vol. 12, hal. 167.
- Bowles, L. K. dan Ellefson, W. L. 1985. “Effects of Butanol on *Clostridium acetobutylicum*”. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 50, No. 5, hal. 1.165-1.170.
- Buendia-Kandia, F., Rondags, E., Framboisier, X., Mauviel, G., Dufour, A., dan Guedon, E. 2018. “Diauxic Growth of

- Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 when Grown on Mixtures of Glucose and Cellobiose”. *AMB Express* Vol. 8, hal. 85.
- Chen, W., Chen, Y., dan Lin, J. 2013. “Evaluation of Biobutanol Production from Non-pretreated Rice Straw Hydrolysate under Non-sterile Environmental Conditions”. *Bioresource Technology* Vol. 135, hal. 262-268.
- Cheremisinoff, N. P. 1996. *Polymer Characterization: Laboratory Techniques and Analysis*. New Jersey: Noyes Publications.
- Coskun, O. 2016. “Separation Techniques: Chromatography”. *Northern Clinics of Istanbul* Vol. 3, No. 2, hal. 156-160.
- Coultate, T. P. 2009. *Food: The Chemistry of its Components*. Cambridge: RSC Publishing.
- Datta, R. dan Zeikus, J. G. 1985. “Modulation of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by Carbon Monoxide and Organic Acids”. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 49, No. 3, hal. 522-529.
- Doelle, H. W. 1975. *Bacterial Metabolism*. New York: Academic Press.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., dan Smith, F. 1951. “A Colorimetric Method for the Determination of Sugars”. *Nature* Vol. 168, No. 4.265, hal. 167.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., dan Smith, F. 1956. “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances”. *Analytical Chemistry* Vol. 28, No. 3, hal. 350-356.
- Dürre, P. 2007. “Biobutanol: An Attractive Biofuel”. *Biotechnology Journal* Vol. 2, hal. 1.525-1.534.
- Ettre, L. S. 2003. “Milestone in Chromatography: M. S. Tswett and the Invention of Chromatography”. *LCGC North America* Vol. 21, No. 5, hal. 458-467.
- Fajariah, H. D. 2012. *Pemanfaatan Serbuk Gergaji menjadi Biobutanol dengan Hidrolisis Selulase dan Fermentasi*

- Bakteri Clostridium acetobutylicum*. Skripsi. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Fortman, J. L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T. S., Steen, E., dan Keasling, J. D. 2008. "Biofuel Alternatives to Ethanol: Pumping the Microbial Well". *Trends in Biotechnology* Vol. 26, No. 7, hal. 375-381.
- Ganado, R. J. J. dan Franco, F. C. 2019. "Towards the Valorization of Biomass to 5-Hydroxymethylfurfural: A Promising Biochemical and Biofuel Feedstock". *Kimika* Vol. 30, No. 1, hal. 4-12.
- García, V., Pääkkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E., dan Keiski, R. L. 2011. "Challenges in Biobutanol Production: How to Improve the Efficiency?". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Vol. 15, hal. 964-980.
- Green, E. M. 2011. "Fermentative Production of Butanol-The Industrial Perspective". *Current Opinion in Biotechnology* Vol. 22, hal. 337-343.
- Guan, W., Xu, G., Duan, J., dan Shi, S. 2018. "Acetone-butanol-ethanol (ABE) Production from Fermentation of Hot-water Extracted Hemicellulose Hydrolysate of Pulping Woods". *Industrial and Engineering Chemistry Research* Vol. 57, No. 2, hal. 775-783.
- Hage, D. S. 2018. *Chromatography* dalam Rifai, N., Horvath, A. R., Wittwer, C. T., dan Hoofnagle, A. N. (Eds.). *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens*. Amsterdam: Elsevier.
- Harris, D. C. 2013. *Exploring Chemical Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Hasan, N. Md. S., Sobuz, H. R., Sayed, Md. S., dan Islam, Md. S. 2012. "The Use of Coconut Fibre in the Production of Structural Lightweight Concrete". *Journal of Applied Sciences* Vol. 12, No. 9, hal. 831-839.
- He, X., Xue, T., Ma, Y., Zhang, J., Wang, Z., Hong, J., Hui, L., Qiao, J., Song, H., dan Zhang, M. 2019. "Identification of

- Functional Butanol-tolerant genes from *Escherichia coli* Mutants Derived from Error-Prone PCR-based Whole-genome Shuffling”. *Biotechnology for Biofuels* Vol. 12, hal. 73.
- Herman, N. A., Kim, S. J., Li, J. S., Cai, W., Koshino, H., dan Zhang, W. 2017. “The Industrial Anaerobe *Clostridium acetobutylicum* uses Polyketides to Regulate Cellular Differentiation”. *Nature Communications* Vol. 8, No. 1.514, hal. 1-11.
- Hirsch, A. dan Grinsted, E. 1954. “Methods for the Growth and Enumeration of Anaerobic Spore-Formers from Cheese, with Observations on the Effect of Nisin”. *Journal of Dairy Research* Vol. 21, No. 1, hal. 101-110.
- Hogg, S. 2013. *Essential Microbiology*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Ibrahim, M. F., Abd-Aziz, S., Yusoff, Mohd. E. M., Phang, L. Y., dan Hassan, Mohd. A. 2015. “Simultaneous Enzymatic Saccharification and ABE Fermentation using Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch as Substrate to Produce Butanol and Hydrogen as Biofuel”. *Renewable Energy* Vol. 77, hal. 447-455.
- Jain, V. M., Karibasappa, G. N., Dodamani, A. S., dan Mali, G. V. 2017. “Estimating the Carbohydrate Content of Various Forms of Tobacco by Phenol-Sulfuric Acid Method”. *Journal of Education and Health Promotion* Vol. 6, hal. 90.
- Jannah, A. M. dan Asip, F. 2015. “Bioethanol Production from Coconut Fiber using Alkaline Pretreatment and Acid Hydrolysis Method”. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology* Vol. 5, No. 5, hal. 320-322.
- Jiang, Y., Liu, J., Jiang, Y., dan Yang, S. 2015. “Current Status and Prospects of Industrial Bio-production of n-butanol in China”. *Biotechnology Advances* Vol. 33, No. 7, hal. 1.493-1.501.

- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C. F., dan Ji, J. 2011. "Progress in the Production and Application of n-butanol as a Biofuel". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Vol. 15, hal. 4.080-4.106.
- Jones, D. T. dan Woods, D. R. 1986. "Acetone-butanol Fermentation Revisited". *Microbiological Reviews* Vol. 50, No. 4, hal. 484-524.
- Jonglertjunya, W., Makkhanon, W., Siwanta, T., dan Prayoonyong, P. 2014. "Dilute Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Butanol Fermentation". *Chiang Mai Journal of Science* Vol. 41, No. 1, hal. 60-70.
- Karimi, K., Tabatabaei, M., Horváth, I. S., dan Kumar, R. 2015. "Recent Trends in Acetone, Butanol, and Ethanol (ABE) Production". *Biofuel Research Journal* Vol. 8, hal. 301-308.
- Katyal, A. dan Morrison, R. D. 2007. *Forensic Applications of Contaminant Transport Models in the Subsurface* dalam Murphy, B. L. dan Morrison, R. D. (Eds.). *Introduction to Environmental Forensics*. Burlington: Elsevier.
- Kurniaty, I., Habibah H., U., Yustiana, D., dan Fajriah M., I. 2017. "Proses Delignifikasi Menggunakan NaOH dan Amonia (NH₃) pada Tempurung Kelapa". *Jurnal Integrasi Proses* Vol. 6, No. 4, hal. 197-201.
- Lee, J., Jang, Y., Choi, S. J., Im, J. A., Song, H., Cho, J. H., Seung, D. Y., Papoutsakis, E. T., Bennett, G. N., dan Lee, S. Y. 2012. "Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol Fermentation". *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 78, No. 5, hal. 1.416-1.423.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., dan Jung, K. S. 2008. "Fermentative Butanol Production by Clostridia". *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 101, No. 2, hal. 209-228.
- Lelekakis, N., Wijaya, J., Martin, D., dan Susa, D. 2014. "The Effect of Acid Accumulation in Power-Transformer Oil

- on the Aging Rate of Paper Insulation”. *IEEE Electrical Insulation Magazine* Vol. 30, No. 3, hal. 19-26.
- Li, D. dan Liu, S. 2019. *Water Quality Monitoring and Management: Basis, Technology, and Case Studies*. London: Elsevier.
- Li, S., Srivastava, R., Suib, S. L., Li, Y., dan Parnas, R. S. 2011. “Performance of Batch, Fed-batch, and Continuous A-B-E Fermentation with pH-control”. *Bioresource Technology* Vol. 102, hal. 4.241-4.250.
- Linggang, S., Phang, L. Y., W., H., dan Abd-Aziz, S. 2013. “Acetone-Butanol-Ethanol Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Using Sago Pith Residues Hydrolysate”. *BioEnergy Research* Vol. 6, hal. 321-328.
- Liu, H., Wang, G., dan Zhang, J., 2013. *The Promising Fuel-Biobutanol* dalam Fang, Z. (Ed.). *Liquid, Gaseous, and Solid Biofuels - Conversion Techniques*. Rijeka: InTech.
- Lu, C., Dong, J., dan Yang, S. 2013. “Butanol Production from Wood Pulping Hydrolysate in an Integrated Fermentation-Gas Stripping Process”. *Bioresource Technology* Vol. 143, hal. 467-475.
- Machida, M. 2002. “Progress of *Aspergillus oryzae* Genomics”. *Advances in Applied Microbiology* Vol. 51, hal. 81-106, 107e.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., dan Lee, Y. C. 2005. “Carbohydrate Analysis by a Phenol-Sulfuric Acid Method in Microplate Format”. *Analytical Biochemistry* Vol. 339, hal. 69-72.
- Melikoglu, M., Singh, V., Leu, S., Webb, C., dan Lin, C. S. K. 2016. *Biochemical Production of Bioalcohols* dalam Luque, R., Lin, C. S. K., Wilson, K., dan Clark, J. (Eds.). *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies*. Duxford: Woodhead Publishing.
- Meyer, V. R. 2005. *Chromatography* dalam Worsfold, P., Townshend, A., dan Poole, C. (Eds.). *Encyclopedia of Analytical Science*. Amsterdam: Elsevier.

- Money, N. P. 2016. *Fungi and Biotechnology* dalam Watkinson, S. C., Boddy, L., dan Money, N. P. (Eds.). *The Fungi*. Waltham: Elsevier.
- Monot, F., Martin, J., Petitdemange, H., dan Gay, R. 1982. "Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium". *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 44, No. 6, hal. 1.318-1.324.
- Morone, A. dan Pandey, R. A. 2014. "Lignocellulosic Biobutanol Production: Gridlocks and Potential Remedies". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Vol. 37, hal. 21-35.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., dan Ladisch, M. 2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass". *Bioresource Technology* Vol. 96, No. 6, hal. 673-686.
- Muhidin, D. 2001. *Agroindustri Papain dan Pektin*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Noomtim, P. dan Cheirsilp, B. 2011. "Production of Butanol from Palm Empty Fruit Bunches Hydrolyzate by *Clostridium acetobutylicum*". *Energy Procedia* Vol. 9, hal. 140-146.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., dan Engel, R. G. 2018. *A Microscale Approach to Organic Laboratory Techniques*. Boston: Cengage Learning.
- Poole, C. F. 2000. *Chromatography* dalam Wilson, I. D., Adlard, E. R., Cooke, M., dan Poole, C. F. (Eds.). *Encyclopedia of Separation Science*. Cambridge: Academic Press.
- Pratiwi, N. E. 2018. *Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok Kering menjadi Etanol oleh *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae**. Skripsi. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Prescott, S. C. dan Dunn, C. G. 1959. *Industrial Microbiology*. New York: McGraw-Hill.

- Qureshi, N. dan Ezeji, T. C. 2008. "Butanol, 'A Superior Biofuel' Production from Agricultural Residues (Renewable Biomass): Recent Progress in Technology". *Biofuels Bioproducts and Biorefining* Vol. 2, hal. 319-330.
- Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., dan Blaschek, H. P. 2008. "Butanol Production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of Acid and Enzyme Hydrolyzed Corn Fiber". *Bioresource Technology* Vol. 99, hal. 5.915-5.922.
- Ramanjaneyulu, G. dan Reddy, B. R. 2019. *Emerging Trends of Microorganism in the Production of Alternative Energy* dalam Buddolla, V. (Ed.). *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press.
- Ramey, D. E. 2007. *Butanol: The Other Alternative Fuel* dalam Eaglesham, A. dan Hardy, R. W. F. (Eds.). *NABC Report 19, Agricultural Biofuels: Technology, Sustainability, and Profitability*. New York: National Agricultural Biotechnology Council.
- Rogoff, M. J. dan Screve, F. 2019. *Waste-to-Energy: Technologies and Project Implementation*. Oxford: Elsevier.
- Rood, D. 1997. "Gas Chromatography Problem Solving and Troubleshooting". *Journal of Chromatographic Science* Vol. 35, hal. 239-240.
- Sablania, P., Chakraborty, M., dan Keshari, J. R. 2019. "Enhancing Sensitivity of Phenol-Sulfuric Acid Assay using Orthophosphoric Acid as Modifier". *International Journal of Scientific Reports* Vol. 5, No. 6, hal. 150-153.
- Saleh, A., Pakpahan, M. M. D., dan Angelina, N. 2009. "Pengaruh Konsentrasi Pelarut, Temperatur, dan Waktu Pemasakan pada Pembuatan Pulp dari Serabut Kelapa Muda". *Jurnal Teknik Kimia* Vol. 16, No. 3, hal. 35-44.
- Sánchez, O., Sierra, R., dan Alméciga-Díaz, C. J. 2011. *Delignification Process of Agro-industrial Wastes an*

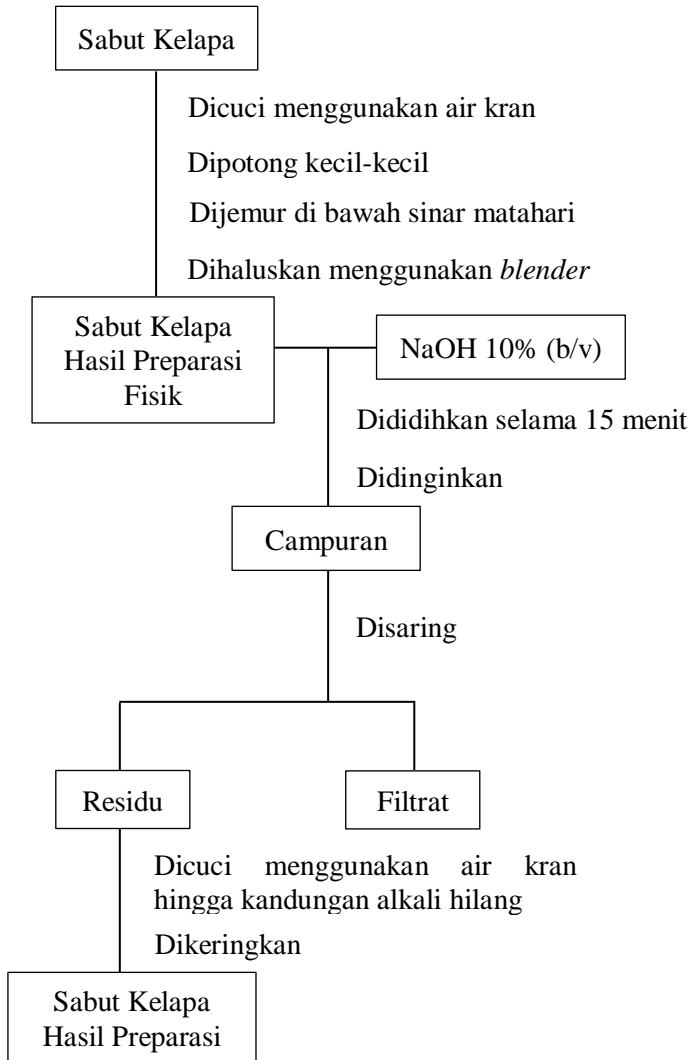
- Alternative to Obtain Fermentable Carbohydrates for Producing Fuel* dalam Manzanera, M. (Ed.). *Alternative Fuel*. Rijeka: InTech.
- Sartika. 2011. *Analisis Kadar Glukosa dan Fruktosa pada Beberapa Madu Murni yang Beredar di Pasaran dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Visibel*. Skripsi. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin.
- Speight, J. G. 2017. *Environmental Organic Chemistry for Engineers*. Oxford: Elsevier.
- Speight, J. G. 2018. *Reaction Mechanisms in Environmental Engineering: Analysis and Prediction*. Oxford: Elsevier.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., dan Newman, R. 2008. *Fire Debris Analysis*. Burlington: Elsevier.
- Stephenson, M. 1949. *Bacterial Metabolism*. Harlow: Longman, Green.
- Sukma, M. S. dan Mienda C., A. 2015. *Pengembangan Metode Kultivasi Solventogenic Clostridia untuk Proses Produksi Biobutanol*. Skripsi. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., Rajasree, K., Alex, D., dan Pandey, A. 2011. *Butanol Fuel from Biomass: Revisiting ABE Fermentation* dalam Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C., dan Gnansounou, E. (Eds.). *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Oxford: Academic Press.
- Suparno, O. 1995. *Kajian Pemisahan Campuran Aseton-Butanol-Etanol Hasil Fermentasi dengan Distilasi Bertingkat (Fractional Distillation)*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., dan Yoshino, S. 2004. "High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method". *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 98, No, 4, hal. 263-268.

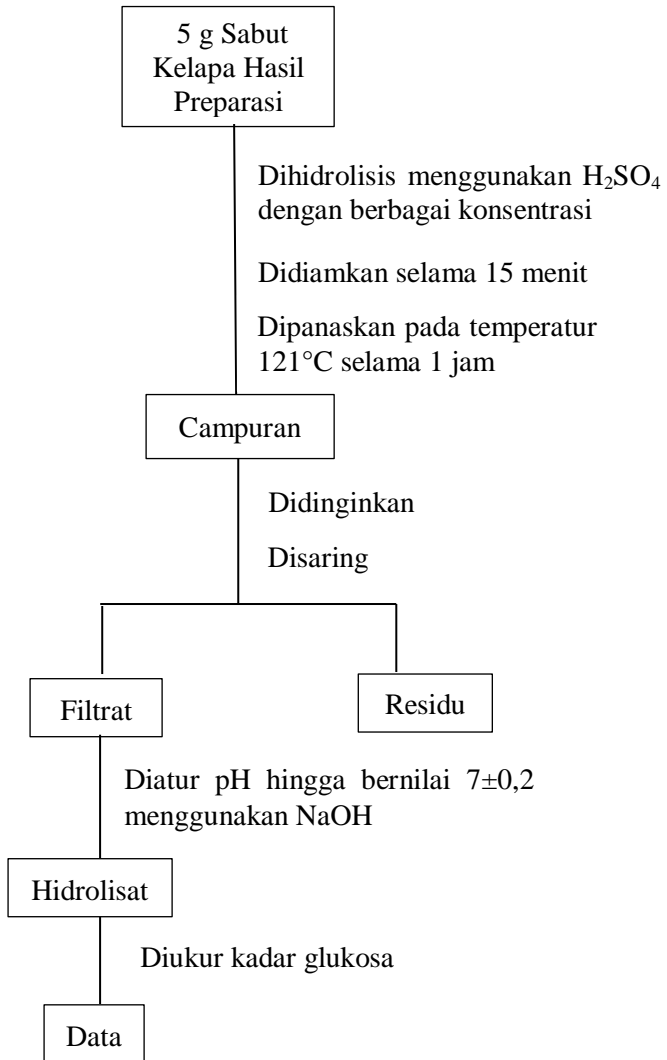
- Trisanti, P. N., Setiawan H. P., S., Nura'ini, E., dan Sumarno. 2018. "Ekstraksi Selulosa dari Serbuk Gergaji Kayu Sengon melalui Proses Delignifikasi Alkali Ultrasonik". *Jurnal Sains Materi Indonesia* Vol. 19, No. 3, hal. 113-119.
- Tyagi, S., Lee, K., Mulla, S. I., Garg, N., dan Chae, J. 2019. *Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives* dalam Shukla, P. (Ed.). *Applied Microbiology and Bioengineering: An Interdisciplinary Approach*. London: Elsevier.
- Viel, M., Collet, F., dan Lanos, C. 2018. "Chemical and Multi-physical Characterization of Agro-resources' by-product as a Possible Raw Building Material". *Industrial Crops and Products* Vol. 120, hal. 214-237.
- Votruba, J., Volesky, B., dan Yerushalmi, L. 1986. "Mathematical Model of a Batch Acetone-Butanol Fermentation". *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 28, hal. 247-255.
- Wang, Y., Janssen, H., dan Blaschek, H. P. 2014. *Fermentative Biobutanol Production: An Old Topic with Remarkable Recent Advances* dalam Bisaria, V. S. dan Kondo, A. (Eds.). *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Whitehurst, R. J. dan van Oort, M. 2010. *Enzymes in Food Technology*. Chichester: Blackwell Publishing.
- Yahia, E. M., Fadanelli, L., Mattè, P., dan Brecht, J. K. 2019. *Controlled Atmosphere Storage* dalam Yahia, E. M. (Ed.). *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities*. Duxford: Elsevier.
- Yan, Y. 2016. *Developments in Fibers for Technical Nonwovens* dalam Kellie, G. (Ed.). *Advances in Technical Nonwovens*. Duxford: Woodhead Publishing.

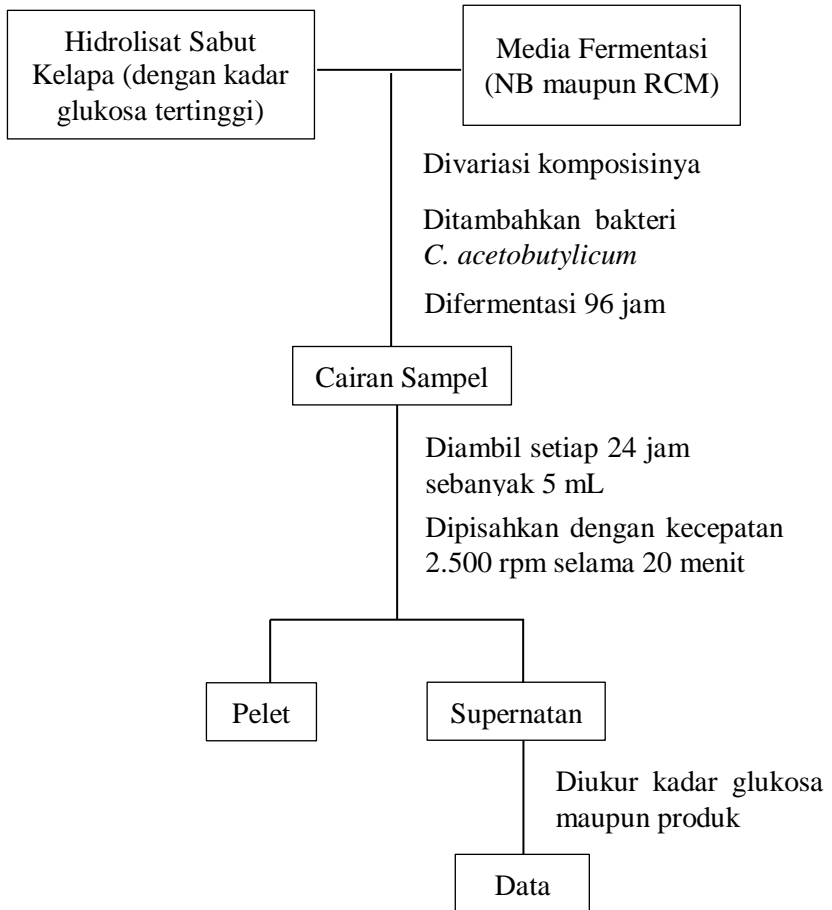
Yuliani, D. 2017. *Petunjuk Praktikum Biokimia I*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

LAMPIRAN

A. Skema Kerja Penelitian







B. Perhitungan dan Data Penelitian

1. Pembuatan Larutan Standar Glukosa

a. Pembuatan larutan stok glukosa 100 ppm

$$100 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1.000 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{5 \text{ mg}}{50 \text{ mL}}$$

Pembuatan larutan stok glukosa dilakukan dengan melarutkan 5 mg glukosa dalam beberapa mL pelarut, kemudian dilarutkan hingga mencapai tanda batas labu ukur 50 mL.

b. Pengenceran larutan stok glukosa menjadi beberapa variasi konsentrasi

Pengenceran larutan stok glukosa menjadi beberapa variasi konsentrasi menggunakan persamaan berikut:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Keterangan:

C_1 = konsentrasi awal larutan

V_1 = volume awal larutan

C_2 = konsentrasi akhir larutan

V_2 = volume akhir larutan

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = 1 \text{ mL}$$

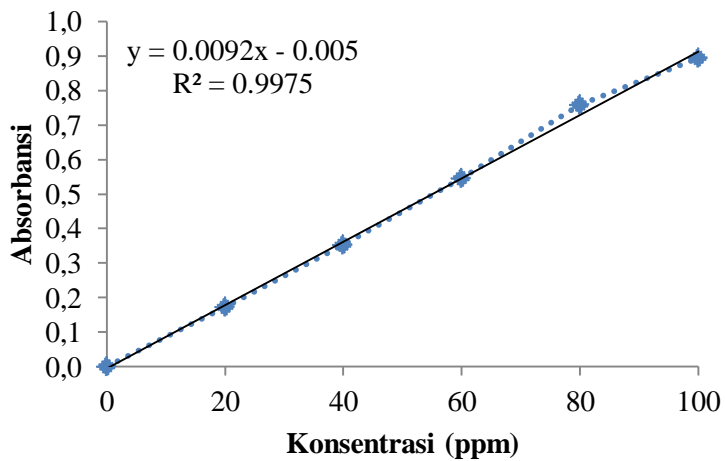
$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = 2 \text{ mL}$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = 3 \text{ mL}$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 80 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = 4 \text{ mL}$$

2. Kurva Standar Glukosa

Konsentrasi Larutan Glukosa (ppm)	Absorbansi
0	0,000
20	0,172
40	0,352
60	0,545
80	0,759
100	0,893



3. Pembuatan Larutan Asam Sulfat

Larutan asam sulfat (H_2SO_4) dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, dan 2,00% (b/v). Larutan H_2SO_4 tersebut dibuat dari larutan H_2SO_4 98% (b/v). Pengenceran larutan H_2SO_4 menjadi beberapa variasi konsentrasi menggunakan persamaan berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M_1 = molaritas awal larutan

V_1 = volume awal larutan

M_2 = molaritas akhir larutan

V_2 = volume akhir larutan

Hubungan molaritas dan persen massa diberikan dalam persamaan berikut:

$$M = \frac{\% \times \rho}{M_r} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

Keterangan:

M = molaritas larutan (mol/L)

$\%$ = persen massa larutan

P = massa jenis larutan (g/mL)

M_r = massa molar larutan (g/mol)

Jika diketahui $\rho \text{H}_2\text{SO}_4 = 1,8 \text{ g/mL}$ dan $M_r \text{H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g/mol}$, maka:

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 98\%} \Rightarrow M = \frac{98}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{18 \text{ M}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,25\%} \Rightarrow M = \frac{0,25}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{0,046 \text{ M}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,50\%} \Rightarrow M = \frac{\frac{0,5}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1}}{98 \text{ g mol}^{-1}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{0,092 \text{ M}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1,00\%} \Rightarrow M = \frac{\frac{1}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1}}{98 \text{ g mol}^{-1}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{0,184 \text{ M}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1,50\%} \Rightarrow M = \frac{\frac{1,5}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1}}{98 \text{ g mol}^{-1}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{0,276 \text{ M}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 2,00\%} \Rightarrow M = \frac{\frac{2}{100} \times 1,8 \text{ g mL}^{-1}}{98 \text{ g mol}^{-1}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{0,368 \text{ M}}$$

Sehingga:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = \mathbf{0,046 \text{ M}} \times 100 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = \mathbf{0,26 \text{ mL}}$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = \mathbf{0,092 \text{ M}} \times 100 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = \mathbf{0,51 \text{ mL}}$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = \mathbf{0,184 \text{ M}} \times 100 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = \mathbf{1,02 \text{ mL}}$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = \mathbf{0,276 \text{ M}} \times 100 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = \mathbf{1,53 \text{ mL}}$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = \mathbf{0,368 \text{ M}} \times 100 \text{ mL} \Rightarrow V_1 = \mathbf{2,04 \text{ mL}}$$

4. Optimasi Komposisi Hidrolisat Sabut Kelapa dan Media Fermentasi

Media fermentasi: *Nutrient Broth*

Komposisi Hidrolisat (% v/v)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) ke			OD_{600} rata-rata
	1	2	3	
100	0,135	0,127	0,131	0,131
90	0,167	0,164	0,166	0,166
80	0,576	0,572	0,580	0,576
70	1,001	1,010	1,005	1,005
60	1,020	1,005	1,012	1,012
50	1,130	1,140	1,150	1,140

Media Fermentasi: *Reinforced Clostridial Medium*

Komposisi Hidrolisat (% v/v)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) ke			OD_{600} rata-rata
	1	2	3	
100	0,130	0,132	0,134	0,132
90	0,382	0,406	0,394	0,394
80	0,801	0,797	0,803	0,800
70	1,216	1,224	1,220	1,220
60	1,386	1,390	1,394	1,390
50	1,484	1,487	1,488	1,486

Pengukuran densitas optik dilakukan setelah 24 jam waktu pengadukan dengan kecepatan pengadukan sebesar 150 rpm.

5. Densitas Optik Kurva Pertumbuhan *Clostridium acetobutylicum*

Media: *Nutrient Broth*

Waktu (jam)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD ₆₀₀) ke			OD ₆₀₀ rata-rata
	1	2	3	
0	0,070	0,070	0,070	0,070
2	0,073	0,074	0,074	0,074
4	0,131	0,135	0,131	0,132
6	0,136	0,135	0,135	0,135
8	0,170	0,171	0,171	0,171
10	0,168	0,172	0,176	0,172
12	0,268	0,276	0,281	0,275
14	0,633	0,622	0,641	0,632
16	0,978	0,987	0,992	0,986
18	1,004	1,019	1,021	1,015
20	1,092	1,097	1,086	1,092
22	1,119	1,116	1,123	1,119
24	1,135	1,147	1,135	1,139
26	1,102	1,114	1,108	1,108
28	0,594	0,593	0,593	0,593
30	0,534	0,531	0,532	0,532

Media: *Reinforced Clostridial Medium*

Waktu (jam)	Densitas Optik pada $\lambda = 600$ nm (OD ₆₀₀) ke			OD ₆₀₀ rata-rata
	1	2	3	
0	0,230	0,230	0,230	0,230
2	0,235	0,236	0,237	0,236
4	0,240	0,238	0,242	0,238
6	0,245	0,245	0,246	0,245
8	0,257	0,258	0,258	0,258
10	0,294	0,295	0,297	0,295
12	0,320	0,316	0,312	0,316
14	0,379	0,380	0,380	0,380
16	0,440	0,441	0,439	0,440
18	0,515	0,520	0,530	0,522
20	1,238	1,256	1,245	1,246
22	1,374	1,387	1,403	1,388
24	1,439	1,446	1,450	1,445
26	1,400	1,402	1,402	1,401
28	1,358	1,363	1,363	1,361
30	0,956	0,958	0,960	0,958

6. Analisis Kadar Glukosa

Hidrolisat Sabut Kelapa

Konsentrasi H ₂ SO ₄ (%)	Absorbansi	Konsentrasi dari Kurva Standar (ppm)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar (%)
0,25	0,359	39,565	5	19,78
0,50	0,374	41,196	5	20,60
1,00	0,405	44,565	5	22,28
1,50	0,439	48,261	5	24,13
2,00	0,454	49,891	5	24,95

Sampel Hasil Fermentasi

Media fermentasi: *Nutrient Broth*

Waktu Fermentasi (jam)	Absorbansi	Konsentrasi dari Kurva Standar (ppm)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar (%)
0	0,418	45,978	5	22,99
24	0,296	32,717	5	16,36
48	0,248	27,500	5	13,75
72	0,204	22,717	5	11,36
96	0,190	21,196	5	10,60

Media fermentasi: *Reinforced Clostridial Medium*

Waktu Fermentasi (jam)	Absorbansi	Konsentrasi dari Kurva Standar (ppm)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar (%)
0	0,418	45,978	5	22,99
24	0,230	25,544	5	12,77
48	0,179	20,000	5	10,00
72	0,859	93,913	1	9,39
96	0,722	79,022	1	7,90

Berdasarkan kurva standar glukosa yang telah dibuat, diperoleh persamaan regresi linear:

$$y = 0,0092x - 0,005$$

Keterangan:

y = absorbansi

x = konsentrasi (ppm)

Kadar glukosa diukur menggunakan persamaan:

$$\text{Kadar (\%)} = \left(\frac{c \times FP}{1.000 \text{ ppm}} \times 100 \right) \% \quad (\text{Yuliani, 2017})$$

Keterangan:

c = konsentrasi glukosa dari kurva standar (ppm)

FP = faktor pengenceran

Contoh perhitungan kadar glukosa (analisis pada hidrolisat sabut kelapa dengan adanya penambahan larutan H_2SO_4 0,25% (b/v)):

Absorbansi (y) yang terbaca adalah 0,359, maka konsentrasi (x) berdasarkan persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva standar glukosa yang telah dibuat adalah:

$$\begin{aligned} y &= 0,0092x - 0,005 \\ 0,359 &= 0,0092x - 0,005 \\ 0,364 &= 0,0092x \Rightarrow x = 39,565 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Kadar glukosa yang diperoleh, jika konsentrasi (c) = 39,565 ppm dan faktor pengenceran (FP) = 5, adalah:

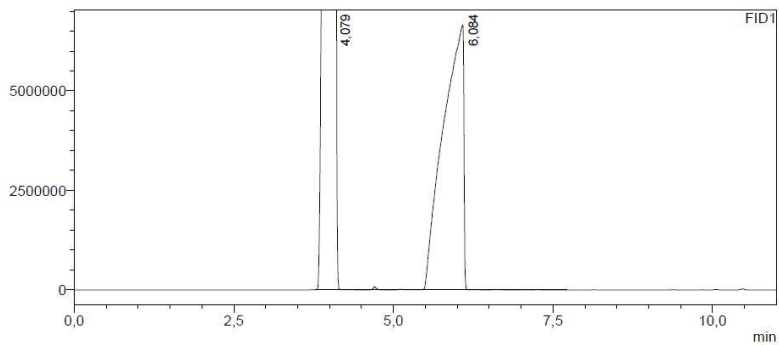
$$\text{Kadar (\%)} = \left(\frac{39,565 \text{ ppm} \times 5}{1.000 \text{ ppm}} \times 100 \right) \% = \mathbf{19,78\%}$$

7. Kromatogram

Larutan Standar Etanol dan Butanol

<Chromatogram>

uV



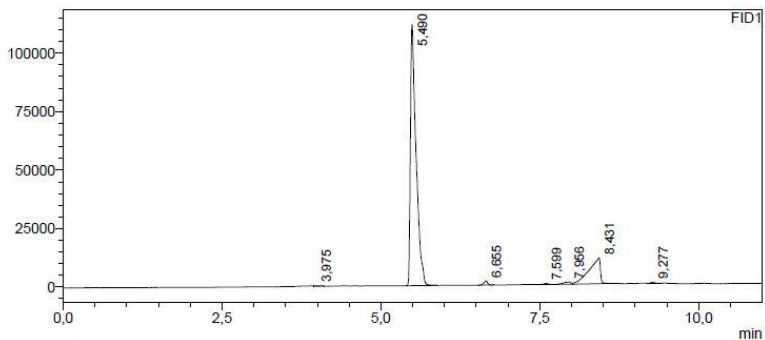
<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4.079	263850720	22615551	75.000	%	SV	ETANOL
2	6.084	147893845	6649955	25.000	%	SV	BUTANOL
Total		411744565	29265506				

Sampel 24 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis *Nutrient Broth*

<Chromatogram>

uV



<Peak Table>

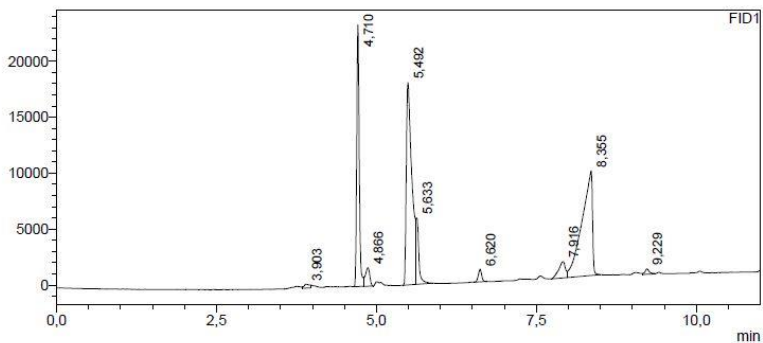
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,975	1539	244	0,000	%	V	ETANOL
2	5,490	691018	111591	0,000			
3	6,655	6832	1747	0,000			
4	7,599	2182	452	0,000			
5	7,956	7726	944	0,000			
6	8,431	135358	11008	0,000		V	
7	9,277	2836	624	0,000		V	
Total		847492	126610				

Sampel 48 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis *Nutrient Broth*

<Chromatogram>

uV



<Peak Table>

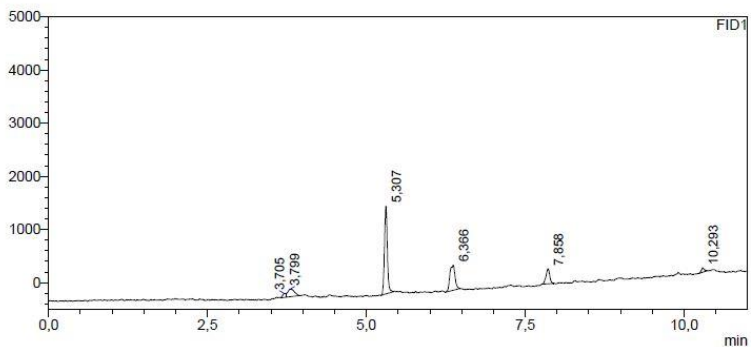
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,903	1994	341	0,001	%	V	ETANOL
2	4,710	63504	23206	0,000		V	
3	4,866	8219	1657	0,000		V	
4	5,492	109209	18067	0,000			
5	5,633	19159	5934	0,000		V	
6	6,620	4090	1120	0,000			
7	7,916	10600	1452	0,000			
8	8,355	106758	9353	0,000		V	
9	9,229	2281	479	0,000		V	
Total		325815	61609				

Sampel 72 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis *Nutrient Broth*

<Chromatogram>

uV



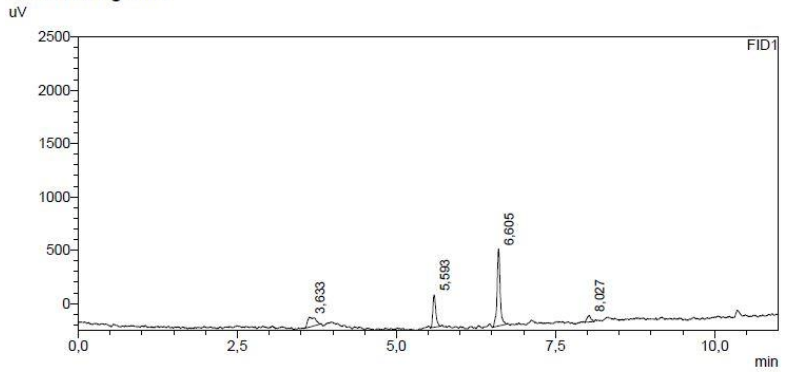
<Peak Table>

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,705	298	74	0,000			
2	3,799	1011	142	0,000		V	
3	5,307	5188	1641	0,000			
4	6,366	2664	471	0,000	%		BUTANOL
5	7,858	1150	284	0,000			
6	10,293	258	85	0,000			
Total		10568	2697				

Sampel 96 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis *Nutrient Broth*

<Chromatogram>



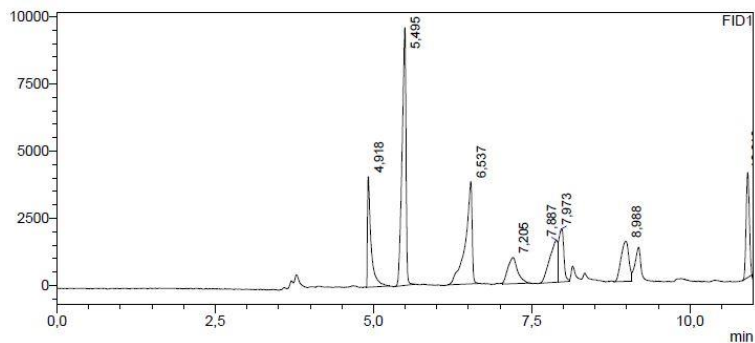
<Peak Table>

FID1							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,633	744	92	0,000			
2	5,593	973	303	0,000			
3	6,605	2438	720	0,000			
4	8,027	259	62	0,000			
Total		4413	1177				

Sampel 24 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis
Reinforced Clostridial Medium

<Chromatogram>

uV



<Peak Table>

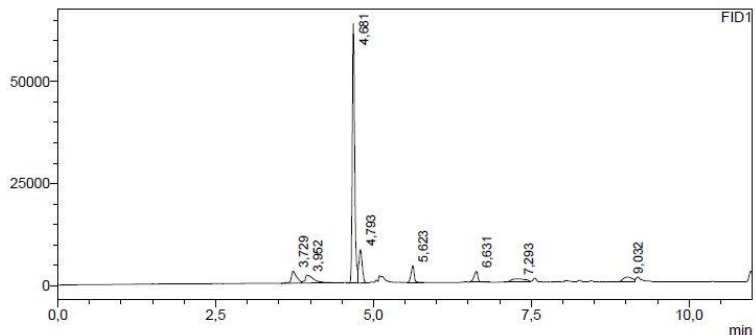
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4.918	16235	4093	0,000			
2	5.495	40993	9574	0,000			
3	6.537	27811	3793	0,000			
4	7.205	10447	978	0,000		V	
5	7.887	13561	1568	0,000			
6	7.973	11012	1972	0,000		V	
7	8.988	12869	1487	0,000			
8	10.913	13836	3903	0,000			
Total		146764	27368				

Sampel 48 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis
Reinforced Clostridial Medium

<Chromatogram>

uV



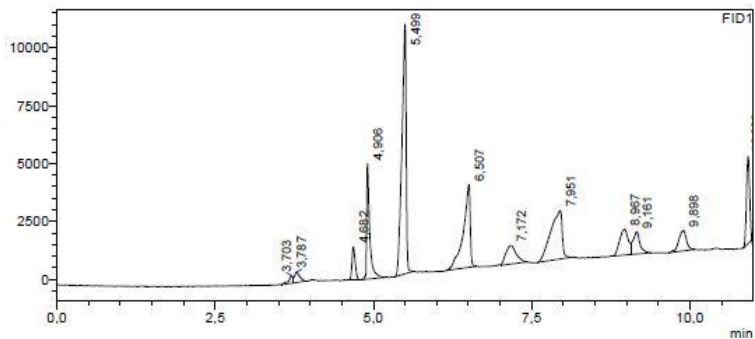
<Peak Table>

FID1							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.729	17482	2921	0,000			
2	3.952	17978	1929	0,005	%	V	ETANOL
3	4.681	168006	62781	0,000			
4	4.793	29118	8067	0,000		V	
5	5.623	13854	4069	0,000			
6	6.631	11592	2652	0,000		SV	
7	7.293	12493	794	0,000			
8	9.032	11928	1175	0,000			
Total		282451	84389				

Sampel 72 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis
Reinforced Clostridial Medium

<Chromatogram>

uV



<Peak Table>

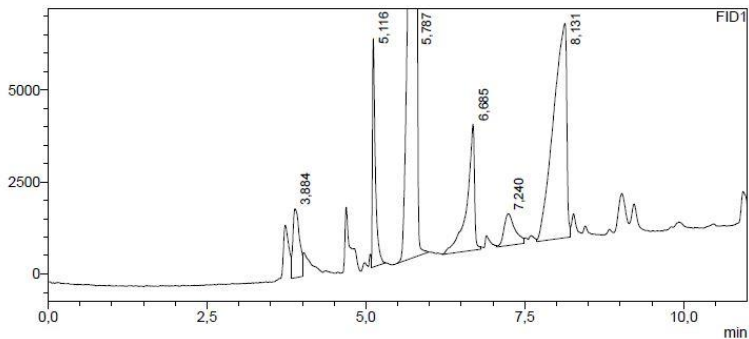
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,703	1578	333	0,000			
2	3,787	2514	449	0,000		V	
3	4,682	4958	1424	0,000			
4	4,906	16846	4951	0,000			
5	5,499	49952	10756	0,000			
6	6,507	26857	3574	0,000			
7	7,172	9051	800	0,000		V	
8	7,951	26785	2094	0,000			
9	8,967	10346	1118	0,000			
10	9,161	7598	961	0,000		V	
11	9,898	7428	881	0,000			
12	10,920	13075	3753	0,000			
Total		176987	31094				

Sampel 96 jam Waktu Fermentasi, Media Berbasis
Reinforced Clostridial Medium

<Chromatogram>

uv



<Peak Table>

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3,884	13385	1872	0,004	%	V	ETANOL
2	5,116	19687	6168	0,000		V	
3	5,787	176542	26287	0,030	%	S	BUTANOL
4	6,685	28118	3428	0,000			
5	7,240	10219	860	0,000		V	
6	8,131	85214	5827	0,000		V	
Total		333165	44442				

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Zakesa Ekky Kautsar. Penulis dilahirkan di Surabaya pada tanggal 19 Desember 1997 dan merupakan anak tunggal dari pasangan Zaenuri dan Sukei. Penulis telah menempuh beberapa pendidikan formal, yaitu di SD Negeri Pakis X Surabaya (2003-2009), SMP Negeri 4 Surabaya (2009-2012), dan SMA Negeri 2 Surabaya (2012-2015). Penulis melanjutkan jenjang pendidikan S-1 dan diterima di Departemen Kimia FSAD ITS pada tahun 2015 melalui jalur SNMPTN serta terdaftar dengan Nomor Registrasi Pokok (NRP) 01211540000020. Selama menempuh perkuliahan, penulis aktif di beberapa organisasi kemahasiswaan yang ada di ITS. Penulis menjadi anggota Paduan Suara Mahasiswa ITS (2015-2016), staf bidang pengajaran Departemen Sosial Masyarakat Himpunan Mahasiswa Kimia FSAD ITS (2016-2017), staf bidang kaderisasi (2016-2017) dan ketua (2018-2019) Departemen Pembinaan Lembaga Dakwah Sektor *Chemistry Islamic Studies* – Tim Pembina Kerohanian Islam ITS, serta anggota *American Institute of Chemical Engineers* (AIChE) ITS *Student Chapter* (2017-2018). Selain di dalam kampus, penulis juga pernah menjadi *volunteer* di *Save Street Child Surabaya* (2017) dan Gerakan Peduli Sekitar Region Surabaya (2019). Penulis menyelesaikan program sarjana dengan mengambil skripsi di bidang Biokimia dengan topik fermentasi di bawah bimbingan Drs. Refdinal Nawfa, M.S. Penulis dapat dihubungi melalui surat elektronik (surel): zakesaekky97@gmail.com.