

PENGARUH PENGENDALIAN pH TERHADAP PEMBENTUKAN ETANOL DAN PERGESERAN PRODUK ASIDOGENESA DARI FERMENTASI LIMBAH CAIR INDUSTRI MINYAK SAWIT

(The Influence of pH Control on Ethanol and Switch of Acidogenic Products Formation from Palm Oil Mill Effluent)

David Andrio^{1*}, Mindriany Syafila², Marisa Handajani² dan Dessy Natalia³

¹Program Doktor Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Lingkungan, Institut Teknologi Bandung. Jln. Ganesha No. 10, Bandung, 40132.

²Kelompok Keahlian Rekayasa Air dan Limbah Cair, Fakultas Teknik Sipil dan Lingkungan, Institut Teknologi Bandung. Jln. Ganesha No. 10, Bandung, 40132.

³Kelompok Keahlian Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Institut Teknologi Bandung. Jln. Ganesha No. 10, Bandung, 40132.

*Penulis korespondensi. No Tel: 081268531099. Email: davidandrio2009@gmail.com.

Diterima: 9 September 2014

Disetujui: 23 Februari 2015

Abstrak

Limbah cair industri minyak sawit memiliki potensi sebagai substrat pembentukan etanol. Pemanfaatan kultur campuran dalam pembentukan etanol memiliki keuntungan karena tidak memerlukan sterilisasi substrat, namun akan dihasilkan berbagai produk samping dan sebaliknya pada *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pengaturan pH terhadap pembentukan etanol dan produk asidogenesis. Rancangan penelitian terdiri dari reaktor bakteri anaerob dan ragi dengan perlakuan pengendalian pH pada rentang 6-6,5 dan tanpa pengendalian pH dengan pH awal fermentasi 6-6,5. Hasil penelitian menunjukkan *Degree Acidification* (DA), Total Asam Volatil (TAV) dan etanol tertinggi berurutan sebesar 0,32; 808,03 mg/L dan 24,03 mg/L pada reaktor bakteri dengan pengendalian pH; 0,23; 522,43 mg/L dan 23,12 mg/L pada reaktor tanpa pengendalian pH; 0,25; 775,78 mg/L dan 34,11 mg/L pada reaktor ragi dengan pengendalian pH dan 0,32; 866,71 mg/L dan 29,17 mg/L pada reaktor ragi tanpa pengendalian pH. Pengendalian pH fermentasi meningkatkan pembentukan produk asetil-KoA dari 4,35% menjadi 7,34% pada reaktor bakteri dan dari 17,92% menjadi 18,78% pada reaktor ragi dan tidak berpengaruh terhadap pembentukan etanol.

Kata kunci: asam lemak volatil, bakteri kultur campuran anaerob, degree acidification, etanol, keasaman, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

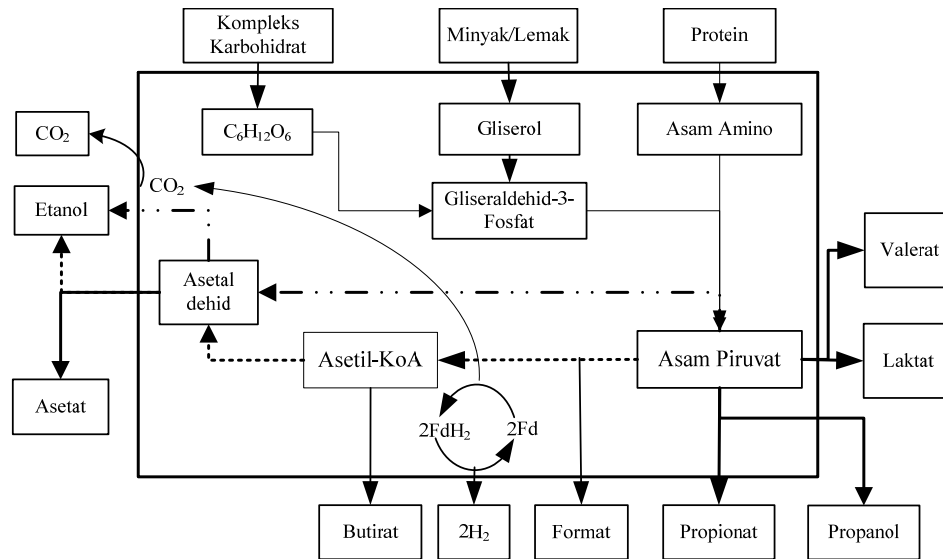
Palm oil mill effluent has potentiation for substrate to ethanol formation. Utilization of anaerobic mixed culture bacteria to form ethanol has advantages i.e not requiring sterilization of the substrate and vice versa in Saccharomyces cerevisiae, but resulting side products. The aims of this research are to study effect of controlling pH on ethanol formation and acidogenic products. Design experiment consisted of anaerobic bacteria and yeast reactor with the pH control in the range of pH 6 - 6.5 and initial pH 6-6.5 for without pH control treatment. The results showed the highest Degree Acidification (DA), Total Volatile Fatty Acid (TVFA) and ethanol are 0.32; 808.03 mg/L and 24.03 mg/L for bacteria reactor with pH control; 0.23; 522.43 mg/L and 23.12 mg/L for bacteria reactor without pH control; 0.25; 775.78 mg/L and 34.11 mg/L for yeast reactor with pH control and 0.32; 866.71 mg/L and 29.17 mg/L for yeast reactor without pH control. Controlling pH increasing acetyl-CoA product formation from 4.35% to 7.34% for bacteria reactor and from 17.92% to 18.78% for yeast one and not affect to rising ethanol formation.

Keywords: acidity, degree acidification, ethanol volatile fatty acids, mixed culture anaerobic bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*.

PENDAHULUAN

Peningkatan kebutuhan sumber energi dan semakin terbatasnya cadangan bahan bakar fosil menuntut pengembangan bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dan terbarukan. Salah satunya adalah etanol yang merupakan bahan bakar yang banyak diteliti (Wu dkk, 2007; Murdiyatmo, 2006; Demirbas, 2005). Umumnya, bahan baku

pembuatan etanol di Indonesia berasal dari ubi kayu dan gula yang masih tergolong sebagai bahan pangan manusia (Murdiyatmo, 2006). Hal ini akan menimbulkan persaingan antara konsumsi sebagai bahan pangan dan atau sebagai bahan baku produksi etanol yang akan berdampak pada peningkatan nilai jual bioetanol. Salah satu alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan pemanfaatan limbah cair organik



Gambar 1. Jalur metabolik asidogenesis dari glukosa dan substrat senyawa organik kompleks (modifikasi Temudo dkk., 2007; Tang dkk., 2005; Kosaric dan Sukan 2001; Ren dkk., 1997).

..... : Jalur pembentukan etanol oleh bakteri kultur campuran anaerob

- - - - : Jalur pembentukan etanol oleh organisme yang memiliki enzim *pyruvate decarboxylase* (PDC)

yang mengandung *Chemical Oxygen Demand* (COD) di atas 4.000 mg/L melalui proses anaerob (Grady dkk., 1999). Posisi Indonesia sebagai penghasil minyak mentah sawit, karet alam dan kakao berturut-turut nomor satu, dua dan tiga di dunia (Anonim, 2011; Mohammadi dkk., 2010; Ardhana dan Fleet, 2003) memungkinkan pemanfaatan limbah cair tersebut. Kandungan senyawa organik yang tinggi dalam limbah cair sawit berkisar 50.000-70.000 mg COD/L (Poh dan Chong, 2009; Ahmad dkk., 2003; Syafila dkk., 1998), kakao 50.000-100.000 mg COD/L (Syafila dkk., 2010) dan karet alam 3.500-14.000 mg COD/L (Mohammadi dkk., 2010; Tekasakul dan Tekasakul, 2006) sangat memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai alternatif substrat produksi etanol.

Sebagai produk antara pada tahap asidogenesis, etanol terbentuk melalui reduksi asetaldehid dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase. Mikro organisme penghasil etanol dapat dibedakan dari jalur konversi asam piruvat menjadi asetaldehid (Gambar 1). Jalur konversi asam piruvat menjadi asetil-KoA dan selanjutnya ke asetaldehid digunakan oleh bakteri kultur campuran anaerob. Bakteri ini terdiri dari berbagai konsorsium bakteri yang dapat memanfaatkan limbah cair sebagai substrat. Selain etanol, jalur ini akan menghasilkan berbagai produk samping berupa asam lemak volatil dan non volatil sehingga akan mempengaruhi produksi etanol (Andrio dkk., 2012; Syafila dkk., 2010; Ren dkk., 2007; Ren dkk., 2006; Wang dkk., 2006; Ren dkk., 1997).

Sementara itu, jalur konversi langsung asam piruvat menjadi asetaldehid digunakan oleh mikro

organisme yang memiliki enzim piruvat dekarboksilase seperti *Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora*, bakteri penghasil asam asetat dan *Saccharomyces cerevisiae* (Roger dkk., 2006; Kosaric dan Sukan, 2001). Jalur ini membutuhkan sterilisasi substrat untuk mencegah kontaminasi dan pengolahan pendahuluan untuk substrat yang sulit terbiodegradasi (Lin dkk., 2011; Chotineeranat dkk., 2010; Zhao dkk., 2009; Yamashita dkk., 2008; Demirbas, 2005; Lewis dkk., 2005).

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, etanol yang dihasilkan oleh kultur campuran bakteri anaerob akan diikuti dengan berbagai produk samping, sehingga untuk meningkatkan efisiensi pembentukan etanol maka pembentukan produk samping harus diminimalkan. Secara umum, pH medium tidak hanya mempengaruhi pertumbuhan dan laju fermentasi tetapi juga mempengaruhi *yield* produk (Zhu dan Yang, 2004). Beberapa hasil penelitian menyatakan kondisi optimal pembentukan etanol oleh bakteri kultur campuran anaerob pada substrat molase dan atau glukosa terjadi dalam rentang pH 4-5 (Wang dkk., 2006^a; Wang dkk., 2006^b; Yu dan Fang, 2003; Ren dkk., 1997), rentang pH 5-5,5 (Ren dkk., 2007; Ren dkk., 2006; Han dkk., 2003) dan pada rentang pH 6-8 (Lu dkk., 2008; Temudo dkk., 2007; Fang dan Liu, 2002). Meskipun demikian, pada kompleks substrat yang mengandung pati, protein dan minyak/lemak belum banyak diteliti sehingga perlu diteliti lebih lanjut pengaruh pengendalian pH terhadap pembentukan etanol dan distribusi produk asidogenesis.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh pengendalian pH terhadap pembentukan dan pergeseran produk asidogenesis dari biodegradasi limbah cair agro industri sebagai upaya pemanfaatan limbah cair yang mengandung senyawa organik konsentrasi tinggi. Dari penelitian ini akan diketahui pengaruh pengendalian pH terhadap efektivitas pembentukan etanol dan pergeseran pembentukan produk samping. Efektivitas produksi etanol oleh bakteri kultur campuran anaerob akan dibandingkan dengan produksi etanol oleh ragi *S. cerevisiae*.

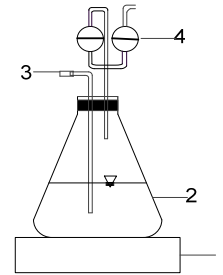
METODE PENELITIAN

Biomassa dan Limbah Cair

Bibit bakteri anaerob berasal dari lumpur kolam pengolahan limbah cair industri minyak sawit dan rumen sapi dengan perbandingan 1:1 (%v/v). Sebagai pembanding produksi etanol, ragi *S. cerevisiae* diperoleh dari Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung, Indonesia. Pengayaan bakteri dilakukan dalam media menurut Yenigun dkk. (1996), terdiri dari glukosa (20 g/L) dan *trace mineral* yang terdiri dari 448 mg/L K_2HPO_4 ; 2,256 mg/L NH_4HCO_3 ; 85 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 4,83 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,444 mg/L $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,402 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ dan 0,036 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. Untuk media pertumbuhan ragi mengandung 30 g/L dekstros, 5 g/L ekstrak ragi dan 3 g/L pepton (Shen dkk., 2010). Penelitian ini menggunakan limbah cair organik artifisial dengan karakteristik yang merepresentasikan limbah cair industri minyak sawit yang terdiri dari pati 2.000 mg/L; pepton 5.100 mg/L; minyak 6.390 mg/L dan *trace mineral* seperti 3,95 mg/L NH_4HCO_3 ; 0,06743 mg/L K_2HPO_4 ; 0,5661 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 2,466 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,721 mg/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1571 mg/L $NaHCO_3$; 0,0140 mg/L $MnCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,0056 mg/L $ZnCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,0047 mg/L $CuCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,0020 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,00078 mg/L $CrCl_2 \cdot 6H_2O$ dan 0,00003 mg/L $CdCl_2 \cdot 6H_2O$ (Wong and Chin, 1985 dalam Ahmad, 2001). Aklimatisasi biomassa dilakukan secara bertahap dengan meningkatkan konsentrasi limbah cair artifisial secara bertahap dimulai dari 0, 30, 50 dan 100% (v/v). Semua bahan kimia yang digunakan *Pro Analytic Grade*, Merck.

Operasional Reaktor

Bioreaktor (Gambar 2) yang digunakan berupa erlemeyer dengan volume kerja 1 L dan kecepatan shaker 100 rpm, 25 °C. Reaktor diisi dengan campuran media yang terdiri dari 20% (v/v) biomassa dan 80% (v/v) substrat. Penelitian dilaku-



Gambar 2. Rangkaian reaktor penelitian. (1) shaker, (2) erlenmeyer flask; (3) titik sampling; (4) leher angsa (air sealer).

kan secara *batch* dengan dua kali ulangan. Rancangan penelitian terdiri dari reaktor dengan pengendalian pH dalam rentang 6-6,5 (R1, reaktor bakteri dengan pengendalian pH dan R3, reaktor ragi dengan pengendalian pH) dan tanpa pengendalian pH (R2, reaktor bakteri tanpa pengendalian pH dan R4, reaktor ragi tanpa pengendalian pH). pH awal seluruh reaktor diatur dalam rentang 6-6,5 dan pengaturan pH R1 dan R3 dilakukan setiap 12 jam setelah pengambilan sampel dengan menginjeksikan larutan 2 M HCl dan atau 2 M NaOH ke dalam reaktor. Untuk menciptakan kondisi anaerob dilakukan *flushing* N_2 selama 10 menit. Pengamatan fermentasi dilakukan setiap 12 jam dengan parameter yang diamati COD total dan terlarut, Total Asam Volatil (TAV), Asam-asam Volatil (AV) dan non volatil serta etanol.

Metoda Analisis

Preparasi sampel untuk analisis COD terlarut, TAV, AV dan etanol dilakukan dengan *sentrifuge* sampel pada kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit dan disaring dengan Whatman no. 42. Analisis individu asam volatil dan non volatil menggunakan *High-Performance Liquid Chromatographic* (HPLC) mengikuti metoda de Sa dkk (2011). Preparasi sampel dengan menyaring sampel menggunakan *nyllon acrodisc syringe* ukuran 0,22 μ m milipore dan dilanjutkan proses ultrasonifikasi selama 10 menit untuk menghilangkan gas.

HPLC yang digunakan tipe Hitachi interface D-7000 HSM dilengkapi dengan UV-Vis detektor (Hitachi L-7400) dan pompa (Hitachi L-7100). Kolom analitik Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm dan ukuran partikel 9 μ m). Fase gerak terdiri dari 5 mM H_2SO_4 , metanol dan aquabides. Kondisi operasi pada 55 °C, laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 1 μ L. Deteksi asam laktat, format, asetat, propionat, butirat dan valerat menggunakan UV-Vis pada panjang gelombang 210 nm. Pembuatan kurva kalibrasi standar pada konsentrasi 10, 30, 50, 70 dan 100 mM.

Analisis etanol menggunakan Gas Chromatography Shimadzu 17-A, kolom analitik

DB-Wax (*prophylene glycol*) (30 m x 0,25 mm). Preparasi sampel dilakukan dengan mengekstrak campuran 1 mL sampel + 0,5 mL *paraxylene*. Selanjutnya pelarut dipisahkan dan 1 μ L sampel diinjeksi. Kondisi operasi pada suhu kolom 80 °C, suhu injektor dan detektor 250 °C, tekanan N₂ 68 kpa, laju alir nitrogen 0,7 L/min, split ratio 1:20. Kurva kalibrasi standar etanol dibuat pada konsentrasi 25, 50, 100 dan 200 ppm. Analisis konsentrasi COD (total dan terlarut) dan VSS menggunakan *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* berurutan 5220C, SM 2540E dan SM 5560.

Perhitungan

Analisis data fermentasi dengan menghitung (Bengtsson dkk, 2008), *Degree acidification* pada kondisi *batch*,

$$DA = \frac{\text{Total Asam volatil} \text{ [mgCOD/L]}}{\text{COD terlarut influen} \text{ [mgCOD/L]}} \quad (1)$$

$$\text{Total asam volatil (TAV)} = (\text{format} + \text{asetat} + \text{propionat} + \text{butirat} + \text{valerat, mg/L}) \quad (2)$$

$$\text{Yield produk, } Y_p =$$

$$\frac{[\text{Produk outlet}] - [\text{Produk Inlet}]}{[\text{COD terlarut in} - \text{produk in}] - [\text{COD terlarut out} - \text{produk out}]} \frac{[\text{mg COD/L}]}{[\text{mg COD/L}]} \quad (3)$$

$$\text{Laju pembentukan produk asidogenesis} = \frac{(\text{produk maksimum} - \text{produk influen})}{\text{waktu}} \quad (4)$$

Analisis neraca massa digunakan untuk mengetahui pengaruh pengaturan pH terhadap jalur pembentukan produk asidogenesis. Perhitungan dilakukan dengan mengonversi setiap produk asidogenesis terhadap equivalen COD terlarut teoritis menggunakan persamaan menurut Bengtsson, dkk (2009):

$$\text{COD}_{\text{teoritical}} = 8 \cdot (4x + y - 2z) / (12x + y + 16z) \text{ gCOD.g}^{-1} \text{ C}_x\text{H}_y\text{O}_z \quad (5)$$

Di mana $x = \text{C}$; $y = \text{H}$ dan $z = \text{O}$.

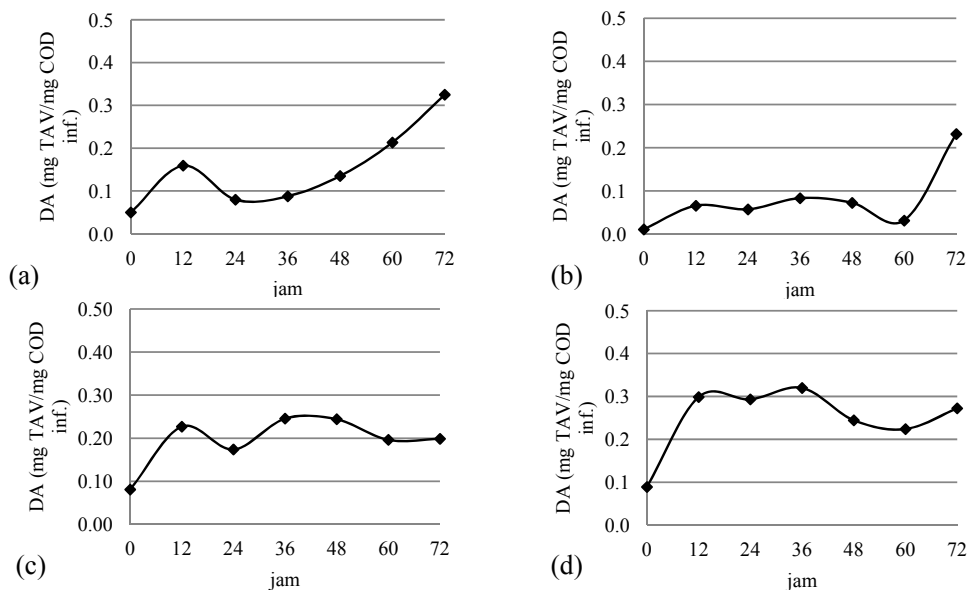
HASIL DAN PEMBAHASAN

Asidogenesis Limbah Cair Organik Konsentrasi Tinggi

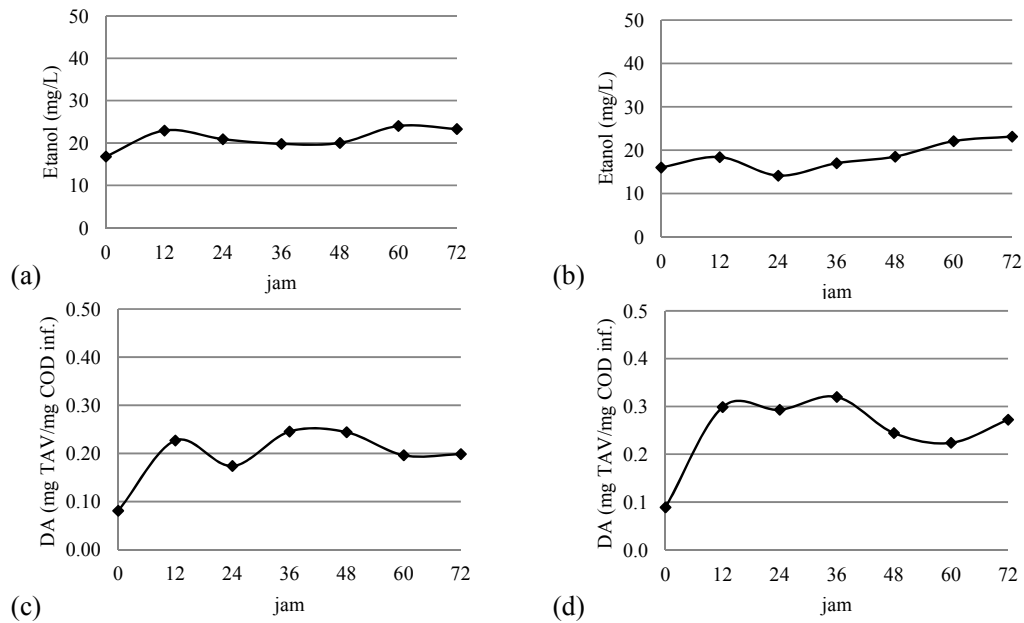
Proses biodegradasi asidogenesis ditandai dengan pembentukan asam-asam volatil, non volatil dan alkohol serta penurunan pH media. Hasil penelitian disajikan dalam Gambar 3 yang menunjukkan pembentukan total asam lemak volatil (*degree acidification/DA*) pada reaktor bakteri baik dengan dan tanpa pengendalian pH mencapai puncak pada jam ke-72. DA tertinggi R1 sebesar 0,32 dengan produk utama berupa format, asetat, propionat dan valerat berturut-turut sebesar 87,15; 338,57; 85,57 dan 296,74 mg/L. Pada R2, DA tertinggi sebesar 0,23 dengan produk utama berupa format, asetat, propionat dan valerat berurutan sebesar 98,76; 88,09; 99,53 dan 236,05 mg/L. Sementara itu, DA tertinggi pada R3 sebesar 0,25 dengan produk utama fermentasi berupa format, asetat, propionat dan valerat berurutan sebesar 105,55; 340,50; 126,72 dan 203,01 mg/L dan 108,32; 348,68; 90,95 dan 244,31 mg/L pada R4 dengan DA tertinggi sebesar 0,27.

Pengaruh Pengendalian pH Terhadap Jalur Pembentukan Etanol

Pembentukan etanol pada R1 mencapai puncak pada jam ke-60 sebesar 24,03 mg/L dan pada jam ke-72 sebesar 23,12 mg/L pada R2. Pada reaktor teroksidasi menjadi asetat atau tereduksi membentuk etanol. Pada jam ke-48 dan 60, asetaldehid



Gambar 3. Pengaruh pengendalian pH terhadap *degree acidification/DA*. (a) R1; (b) R2; (c) R3 dan (d) R4.



Gambar 4. Pengaruh pengendalian pH terhadap pembentukan etanol. (a). R1; (b). R2; (c). R3 dan (d). R4.

Tabel 1. Produk asidogenesis yang terbentuk saat etanol tertinggi.

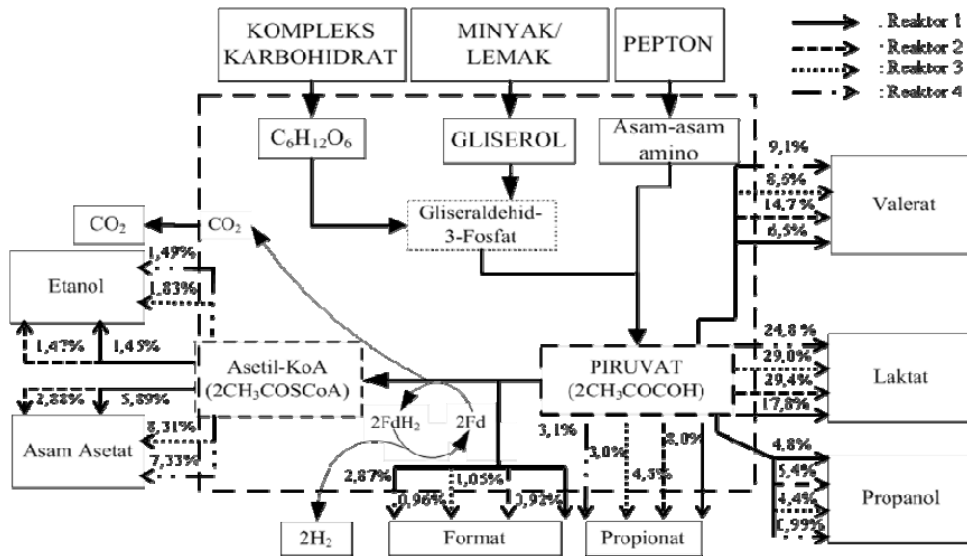
Parameter	Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
<i>Yield ethanol</i>	0,03	0,02	0,02	0,08
<i>Degree acidification</i>	0,21	0,23	0,20	0,22
Produk metabolisme (mg/L)				
Total asam lemak volatil	739,73	522,43	651,70	665,66
Asam laktat (CH ₃ CHOHCOOH)	577,12	899,49	1.055,38	1.083,37
Asam format (HCOOH)	91,69	98,76	106,77	117,87
Asam asetat (CH ₃ COOH)	191,01	88,09	302,74	280,98
Asam propionat (CH ₃ CH ₂ COOH)	183,73	99,53	77,18	83,65
Asam valerat (CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH)	110,70	236,05	165,01	183,16
Etanol (CH ₂ CH ₂ OH)	24,03	23,12	34,11	29,1
Propanol (CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH)	59,72	74,08	72,09	40,65
pH	5,78	5,17	5,92	5,78

lebih cenderung teroksidasi yang ditandai dengan peningkatan asetat yang dihasilkan (Gambar 4(c)). *S. cerevisiae* juga mengonsumsi etanol pada kondisi glukosa menurun dan atau dikonsumsi bersama dengan glukosa (Raamsdonk dkk., 2001). Hasil penelitian menunjukkan pengendalian pH baik pada reaktor bakteri maupun ragi tidak dapat meningkatkan pembentukan etanol, namun mempengaruhi konsentrasi komposisi asam volatil (Tabel 1). Pada reaktor bakteri dan ragi, pengendalian pH menghambat pembentukan asam laktat, propionat dan valerat serta peningkatan pembentukan asetat dan etanol.

Data hasil pembentukan produk fermentasi disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan analisis neraca massa (Gambar 5), pada R1, persentase COD terlarut yang terkonversi menjadi turunan langsung asam piruvat sebesar 37,11%, terdiri dari laktat, propionat, valerat dan propanol berurutan sebesar 17,81; 8,00; 6,51; dan 4,80% dan turunan asetil-KoA sebesar 7,34 % yang terdiri dari format, asetat

dan etanol berurutan sebesar 0,92; 5,89 dan 1,45%. Pada R2, produk turunan asam piruvat yang terbentuk sebesar 54,07%, terdiri dari laktat, propionat, valerat dan propanol berurutan sebesar 29,37; 4,59; 14,69; dan 5,43% dan produk turunan asetil-KoA sebesar 4,35% yang terdiri dari asetat dan etanol berurutan sebesar 2,88 dan 1,47%.

Sementara itu, pada R3, pembentukan produk turunan asam piruvat sebesar 36,41% COD terlarut influen yang terdiri dari laktat, propionat, valerat dan propanol berurutan sebesar 28,98; 2,99; 8,64 dan 4,44% dan produk turunan asetil-KoA sebesar 18,78% terdiri dari format, asetat dan etanol berurutan sebesar 0,96; 8,31 dan 1,83%. Pada R4, produk turunan piruvat sebesar 28,91 terdiri dari laktat, propionat, valerat dan propanol berurutan sebesar 24,84; 3,08; 9,11 dan 0,99% dan turunan asetil-KoA sebesar 17,92% yang terdiri dari format, asetat dan etanol berurutan sebesar 2,87; 7,33 dan 1,49%.



Gambar 5. Neraca masa pembentukan produk asidogenesis saat etanol tertinggi.

Tabel 2. Rekapitulasi hasil pembentukan produk fermentasi.

Reaktor	Produk piruvat (%)	Produk asetil-KoA (%)	Produk terukur (%)	Produk tidak terukur (%)
R1	37,11	7,34	44,45	55,55
R2	54,07	4,35	58,43	41,57
R3	36,41	18,78	55,19	44,81
R4	28,91	17,92	46,83	53,17

Hasil penelitian menunjukkan pengendalian pH baik pada reaktor bakteri maupun reaktor ragi dapat menggeser jalur degradasi substrat ke arah pembentukan produk asetil-KoA yang ditandai dengan peningkatan pembentukan produk asetil-KoA dari 4,35% menjadi 7,34% pada reaktor bakteri dan dari 17,92% menjadi 18,78% pada reaktor ragi. Hal ini dapat disebabkan karena terjadi peningkatan asetat yang dihasilkan, sedangkan pembentukan etanol tidak terpengaruh. Rose dkk. (1954) menyatakan aktivitas enzim asetat kinase (AK) mengalami peningkatan pada seiring peningkatan pH dari 5,5-7,4 dan optimal pada pH 7,4. Pada penelitian ini, reaktor dengan pengendalian pH berada dalam rentang 6-6,5 dan mendekati pH optimal enzim AK. Sementara itu, nilai pH pada reaktor tanpa pengendalian pH berada dalam rentang pH 5,13-5,36 untuk reaktor bakteri dan 5,64-5,75 pada reaktor ragi.

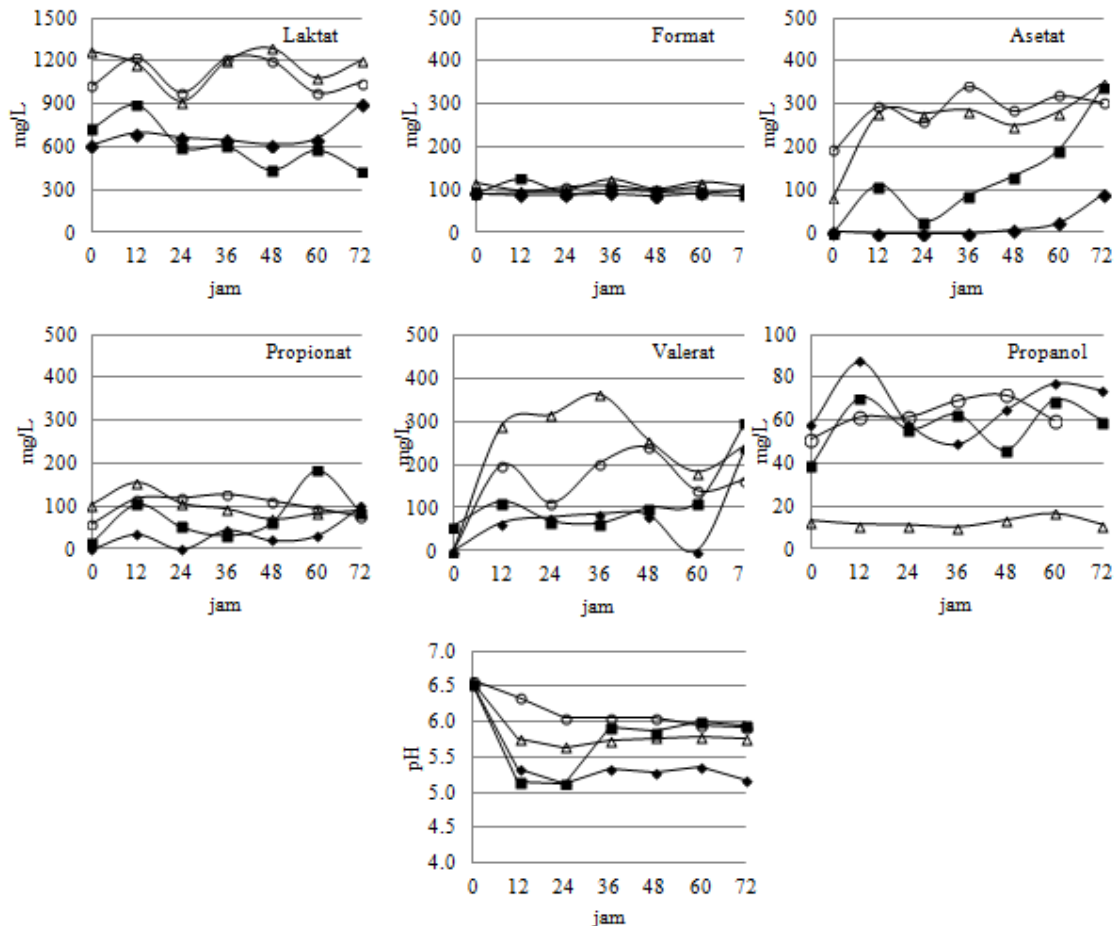
Pengaruh Pengendalian pH terhadap Distribusi Pembentukan Produk Asidogenesis

Berdasarkan hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 6, diketahui pola penurunan pH, pembentukan produk fermentasi reaktor bakteri dan ragi baik dengan maupun tanpa pengendalian pH. Etanol tertinggi pada R1 terbentuk pada jam ke-60 sebesar 24,03 mg/L dengan laju produksi 0,12 mg/L/jam dan sebesar 23,12 mg/L, laju pembentukan 0,10 mg/L/jam pada jam ke-72 R2.

Produksi etanol kedua reaktor bakteri tidak jauh berbeda menunjukkan pembentukan etanol tidak dipengaruhi oleh pengaturan pH reaktor. Pengaruh rentang pH terhadap perubahan pembentukan produk utama fermentasi dapat disebabkan karena perubahan metabolisme populasi yang sama atau perubahan populasi itu sendiri atau dapat juga gabungan kedua faktor tersebut (Yu dan Fang, 2002). Pengendalian pH dalam rentang 6-6,5 dalam penelitian ini tidak menjadi faktor utama dalam pembentukan etanol namun lebih mempengaruhi konsentrasi asam lemak volatil yang dihasilkan.

Peningkatan konsentrasi asam asetat pada R1 terjadi seiring dengan waktu reaksi yang diikuti penurunan konsentrasi format, propionat, valerat dan etanol dari jam ke-12 hingga 48 percobaan. Produksi asetat tertinggi terjadi pada jam ke-72 dengan konsentrasi 338,57 mg/L, pH 5,95 dan laju produksi 4,70 mg/L/jam. Pada R2, pembentukan asetat terhambat dengan produksi tertinggi pada jam ke-72 sebesar 88,09 mg/L, pH 5,17 dan laju pembentukan 1,16 mg/L/jam. Pengaturan pH ke dalam rentang 6-6,5 pada penelitian ini dapat meningkatkan produksi asetat dan masuk dalam rentang pH optimal pembentukan asam asetat dari substrat glukosa (Fang dan Liu, 2002; Temudo dkk., 2007; Ren dkk., 2007; Syafila, 1993) dan gelatin (Yu dan Fang, 2003).

Kondisi pH pada R1 turun drastis mencapai $5,14 \pm 0,1$ pada 24 jam pertama penelitian dan



Gambar 6. Profil pembentukan produk asidogenesis pada reaktor bakteri dan reaktor *S. cerevisiae*. Arti tanda ■ : R1; ◆ : R2; ○ : R3 dan △ : R4.

setelah itu penurunan pH yang terjadi sangat kecil dengan nilai pH dalam kisaran $5,88 \pm 0,6$. Penurunan pH di awal fermentasi asidogenesis menyebabkan pembentukan asam propionat dalam jumlah yang besar dan optimal terbentuk pada pH 4-5,5 (Wang dkk., 2006a; Wang dkk., 2006b; Yu dan Fang, 2003). Namun pada penelitian ini, pengaturan pH dalam rentang 6-6,5 menghasilkan propionat lebih besar dari pada reaktor tanpa pengendalian pH. Propionat tertinggi pada reaktor anaerob dengan pengendalian pH terbentuk pada jam ke-60 sebesar 183,73 mg/L, pH 6,01 dan laju produksi 0,96 mg/L/jam. Sedangkan pada R2, produksi tertinggi terjadi pada jam ke-72 sebesar 99,53 mg/L dengan pH 5,17 dan laju produksi sebesar 1,38 mg/L/jam.

Asam propionat yang terbentuk selalu disertai asetat. Ren dkk (1997) dan Wang dkk (2006b) menyatakan dalam fermentasi anaerob yang berlangsung kontinyu, rasio NADH/NAD⁺ di dalam sel harus dalam jumlah yang tepat dan propiogenesis dapat menghasilkan NAD⁺ lebih banyak dibandingkan butirogenesis dalam proses anaerob. Dalam kondisi *yield* NADH tinggi, fermentasi asam propionat akan mengganti

fermentasi asam butirat secara spontan untuk menjaga rasio NADH/NAD⁺ dalam jumlah yang tepat, khususnya pada pH 5-6.

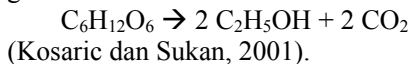
Valerat tertinggi R1 terbentuk pada jam ke-72 sebesar 296,74 mg/L dengan laju produksi 3,33 mg/L/jam. Pada R2, produksi tertinggi terjadi pada jam ke-72 sebesar 236,05 mg/L dengan laju produksi 3,28 mg/L/jam. Pembentukan asam valerat pada penelitian ini dipengaruhi oleh jenis sumber nitrogen yang digunakan. Asam valerat yang terbentuk pada reaktor anaerob tanpa dan dengan pengendalian pH diduga berasal dari degradasi asam amino (pepton) oleh bakteri penghasil propionat dan diperkuat dengan produk utama asidogenesis berupa asetat, propionat dan valerat. Degradasi asam amino oleh bakteri strain *Propionibacterium freudenreichii* mempengaruhi pembentukan valerat dengan peningkatan konsentrasi valerat 3-10 kali lebih besar dibandingkan dengan kontrol. Pembentukan valerat menggunakan jalur degradasi L-leucine menjadi asam α -ketoisokaproat dengan bantuan asam α -ketoglutarik (Thierry dkk., 2002; Thierry dkk., 2004). Selanjutnya ketokaproat didegradasi menjadi

valeratdehide dan terdegradasi menjadi valerat dengan bantuan enzim aldehyd dehidrogenase (Dhande dkk., 2012).

Pembentukan asam butirat tidak terjadi. Hal ini dapat disebabkan karena sumber biomassa yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kolam pengolahan limbah cair industri minyak sawit dan rumen sapi yang memungkinkan untuk pertumbuhan bakteri anaerob fakultatif. Secara umum, asam butirat merupakan produk utama asidogenesis yang hanya dihasilkan oleh bakteri obligat anaerob seperti *Butyribacterium methylotrophicum*, *Butyriovibrio fibrisolvens*, *Clostridium butyricum*, *C. kluyveri*, *C. pasteurianum*, *Eubacterium limosum*, *Fusobacterium nucleatum* (Kim dan Gadd, 2006).

Perbandingan Produksi Etanol dan Asam Volatil oleh Bakteri Kultur Campuran Anaerob dan *S. cerevisiae*

Produksi etanol tertinggi pada R3 terbentuk pada jam ke-72 sebesar 34,11 mg/L dengan laju produksi 0,25 mg/L/jam. Pada R4, etanol tertinggi terbentuk pada jam ke-60 sebesar 29,17 mg/L dengan laju produksi 0,10 mg/L/jam. Efektivitas konversi COD terlarut menjadi etanol pada R3 sebesar 1,83% dan 1,49 % pada R4 dan tergolong sangat kecil jika dibandingkan dengan substrat glukosa menurut reaksi:



Produksi etanol oleh ragi dengan jalur konversi langsung asam piruvat menjadi asetaldehid menghasilkan etanol lebih tinggi dibandingkan produksi etanol oleh bakteri anaerob yang menggunakan jalur konversi piruvat ke asetil-CoA dan asetaldehid. Selain etanol, fermentasi ragi menghasilkan asam volatil asetat, propionat dan valerat. Karakteristik substrat akan mempengaruhi jenis produk samping yang terbentuk dari fermentasi asidogenesis oleh ragi. Degradasi glukosa oleh ragi akan menghasilkan produk samping berupa gliserol, asam asetat, suksinat dan laktat (Alfenore dkk., 2004; Thomas dkk., 1995; Oura, 1977). Produk samping tersebut juga terbentuk dari substrat selain glukosa seperti *softwood* (Söderström dkk., 2005; Talebnia dkk., 2005) dan tepung jagung (Lu dkk., 2003) yang disertai dengan pembentukan propionat, butirat dan valerat. Asam volatil rantai panjang seperti isovalerat, butanoat, oktanoat dan dekanat juga dihasilkan oleh *S. cerevisiae* proses fermentasi pembuatan anggur (Vilanova dkk., 2012; Varela dkk., 2012; Sun dkk., 2011; Orte dkk., 2006).

Produksi asam asetat tertinggi R3 sebesar 340,50 mg/L/jam dengan laju produksi 4,12

mg/L/jam dan 348,68 mg/L/jam dengan laju produksi 3,67 mg/L/jam pada R4. Produksi propionat tertinggi sebesar 126,72 mg/L/jam, laju produksi 1,85 mg/L/ pada R3 dan 153,92 mgCOD/L, laju produksi 4,08 mg/L/jam pada R4. Sedangkan untuk asam valerat, produksi tertinggi sebesar 240,02 mg/L dengan laju produksi 5,00 mg/L/jam pada R3 dan 362,88 mg/L dengan laju produksi 10,08 mg/L/jam pada R4.

KESIMPULAN

Pengaturan pH pada reaktor bakteri dan ragi tidak efektif meningkatkan pembentukan etanol dan hanya mempengaruhi pembentukan asam-asam volatil. Diperlukan metoda lain untuk mengoptimalkan pergeseran jalur metabolisme bakteri kultur campuran anaerob ke arah pembentukan asetil-KoA dengan menekan pembentukan produk turunan piruvat seperti laktat, propionat dan valerat, sehingga dapat membantu peningkatan pembentukan etanol.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Program Riset dan Inovasi Kelompok Keahlian ITB, No. Kontrak : FTSL. PN-6-03-2012, tahun 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., 2001. Biodegradasi Limbah Cair dalam Industri Minyak Sawit dalam Sistem Bioreaktor Anaerob. *Disertasi*, Program Doktor, Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Ahmad, A.L, Ismail, S., dan Bhatia, S., 2003. Water Recycling from Palm Oil Mill Effluent (POME) Using Membrane Technology. *Desalination*, 157:87-95.
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarra, J.L., Goma, G., Molina-Jouve, C., dan Guillouet, S.E., 2004. Aeration strategy: A Need for Very High Ethanol Performance in *Saccharomyces cerevisiae* Fed-batch Process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63:537-542.
- Andrio, D., Handajani, M., dan Syafila, M., 2012. The Potential of Ethanol Production from High Strength Organic Wastewater on Acidogenic Phase : A Preliminary Study. *The 5th AUN/SEED-Net Regional Conference on Global Environment*, Bandung, November 21st-22nd 2012.
- Anonim, 2011. Indonesian Palm Oil Exports Surge by 8,9 Percent in H1. Website : <http://www.gapki.or.id/news/detail/269/Indone>

- sian-Palm-Oil-Exports-Surge-by-8.9-Percent-in-H1. Diunduh 12 September 2011.*
- Ardhana, M.M., dan Fleet, G.H., 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86:87–99.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., dan Welander, T., 2008. Acidogenic Fermentation of Industrial Wastewaters: Effects of Chemostat Retention Time and pH on Volatile Fatty Acids Production. *Biochemical Engineering Journal*, 40:492–499.
- Chotineerant, S., Wansuksri, R., Piyachomkwan, K., Chatakanonda, P., Weerathaworn, P., dan Sriroth, K., 2010. Effect of Calcium Ions on Ethanol Production from Molasses by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sugar Technology* 12(2):120-124.
- de Sa, L.R.V., de Oliveira, M.A.L., Cammarota, M.C., Matos, A., dan Ferreira-Leitao, V.S., 2011. Simultaneous Analysis of Carbohydrates and Volatile Fatty Acids by HPLC for Monitoring Fermentative Biohydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:15177-15186.
- Dhande, Y.K., Xiong, M., dan Zhang, K., 2012. Production of C5 Carboxylic Acids in Engineered *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 47:1965–1971.
- Dillon, H.S., Laan, T., dan Dillon, H.S., 2008. Biofuels - at What Cost?: Government Support for Ethanol and Biodiesel in Indonesia. One of A Series of Reports Addressing Subsidies for Biofuels in Developing Countries. Prepared for: *The Global Subsidies Initiative (GSI) of the International Institute for Sustainable Development (IISD) Geneva, Switzerland*. 28-35.
- Demirbas, A., 2005. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, 27:327–337.
- Fang, H.H.P., dan Liu, H., 2002. Effect of pH on Hydrogen Production from Glukosa by a Mixed Culture. *Bioresource Technology*, 82:87-93.
- Grady, L.C.P.Jr., Daigger, G.T., dan Lim, H.C., 1999. *Biological Wastewater Treatment*, 2nd Edition. Marcel Dekker, New York. p32.
- Han, S.K., Kim, H.S., Sung, S., dan Shin, H.S., 2003. Effect of pH and Repeated Heat-Shock Treatment on Hydrogen Fermentation of Sucrose by a Mixed Culture. *Env. Eng. Res. Korean Society of Environmental Engineers*. 8(4):202-211.
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., dan Ferreira, V., 2006. Impact of Ammonium Additions on Volatile Acidity, Ethanol, and Aromatic Compound Production by Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Fermentation in Controlled Synthetic Media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12:150–160.
- Kim, B.H., dan Gadd, G.M., 2008. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge. p252-289.
- Kosaric, N., dan Sukan, F.V., 2001. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications, Part II. Potential Source of Energy. *WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim*, 89-181.
- Lewis, R.S., Datar, R.P., dan Huhnke, R., 2005. Biomass to Ethanol. *Encyclopedia of Chemical Processing*, 1(1):143-51.
- Lin, Y.H., Chien, W.S., Duan, K.J., dan Chang, P.R., 2011. Short Communication: Effect of Aeration Timing and Interval During Very-High-Gravity Ethanol Fermentation. *Process Biochemistry*, 46:1025–1028.
- Lu, X., Li, Y., Duan, Y., Shi, Z., dan Mao, Z., 2003. A Novel, Repeated Fed-Batch, Ethanol Production System with Extremely Long Term Stability Achieved by Fully Recycling Fermented Supernatants. *Biotechnology Letters*, 25:1819-1826.
- Mohammadi, M., Man, H.C., Hassan, M.A., dan Yee, P.L., 2010. Review: Treatment of Wastewater from Rubber Industry in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9(38):6233-6243.
- Murdiyatmo, U., 2006. Pengembangan Industri Etanol: Prospek, Kendala dan Tantangan. *Workshop Nasional Bisnis Biodiesel dan Bioetanol di Indonesia*. Jakarta, 21 November, 80-86.
- Oura, E., 1977. Reaction Products of Yeast Fermentation. *Process Biochem.* 12(3):19.
- Poh, P.E., dan Chong, M.F., 2009. Review: Development of Anaerobic Digestion Methods for Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment. *Bioresource Technology*, 100:1–9.
- Raamsdonk, L.M., Diderik, J.A., Kuiper A., van Gaalen, M., dan Kruckberg, A.L., 2001. Co-consumption of Sugars or Ethanol and Glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Deleted in the HXK2. *Yeast*, 18:1023-1033.
- Ren, N.Q., Wang, B., dan Huang, J.C., 1997. Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(5):428-433.

- Ren, N.Q., Chua, H., Chan, S.Y., Tsang, Y.F., Wang, Y.J., dan Sin, N., 2006. Assessing Optimal Fermentation Type for Bio-hydrogen Production in Continuous-Flow Acidogenic Reactors. *Bioresource Technology*, 98(9): 1774-1780.
- Ren, N.Q., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T., dan Zhao, X., 2007. Microbial Community Structure of Ethanol Type Fermentation in Bio-hydrogen Production. *Environmental Microbiology*, 9(5):1112-1125.
- Rose, L.A., Grunberg-Manago, M., Korey, R.S., dan Ochoa, S., 1954. Enzymatic Phosphorylation of Acetate. *Journal Biol. Chem.*, 211:737-756.
- Shen, Y., Ge, X.M., dan Bai, F.W., 2010. Application of Oscillation for Efficiency Improvement of Continuous Ethanol Fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae* under Very-High-Gravity Conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:103-108.
- Söderström, J., Galbe, M., dan Zacchi, G., 2005. Separate Versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 25(3):187-202.
- Sun, S.Y., Jiang, W.G., dan Zhao, Y.P., 2011. Evaluation of Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains on the Profile of Volatile Compounds and Polyphenols in Cherry Wines. *Food Chemistry*, 127:547-555.
- Syafila, M., 1993. Anaerobic Degradation of Glucose of Acidogenic Phase in Circulating Bed Reactor (CBR). *Jurnal Teknik Lingkungan*, 2(1):12-20.
- Syafila, M., Wisjnuaprpto, dan Susanti, S., 1998. The Influence of Hydrogen Concentration on End Product Formation in Acidogenic Phase of Anaerobic Treatment of Palm Oil Mill Effluent Using Circulating Bed Reactor. *Prosiding ITB*, 30(1):17-20.
- Syafila, M., Handajani, M., dan Prayascitra, A., 2010. The Effect of Nitrogen Gas Flushing on Intermediate Products Formation in Acidogenic Stage of Anaerobic Process of Cocoa Sweetings. *Institut Teknologi Bandung Journal of Engineering Science*, 42(2):129-136.
- Talebna, F., Niklasson, C., and Taherzadeh, M.J., 2005. Ethanol Production from Glucose and Dilute-Acid Hydrolyzates by Encapsulated *S. Cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(3):345-353.
- Tang, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K., 2005. Microbial Community Analysis of Mesophilic anaerobic Protein Degradation Process Using Bovine Serum Albumin (BSA)-Fed Continuous Cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(2):150-164.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., dan van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (Open) Mixed Culture Fermentation of Glucose: A Chemostat Study. *Biotechnology and Bioengineering*, 1(98):69-79.
- Temudo, M.F., Poldermans, R., Kleerebezem, R., dan van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Glycerol Fermentation by (Open) Mixed Cultures: A Chemostat Study. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(6):1088-1098.
- Tekasakul, P., dan Tekasakul, S., 2006. Environmental Problem Related to Natural Rubber Production in Thailand. *Journal Aerosol Resource*, 21(2):122-129.
- Thierry, A., Maillard, M.B., dan Yvon, M., 2002. Conversion of L-Leucine to Isovaleric Acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL 34 and ITGP23. *Applied and Environmental Microbiology*, 2:608-615.
- Thierry, A., Richoux, R., dan Kerjean, R.R., 2004. Isovaleric Acid is Mainly Produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss Cheese. *International Dairy Journal*, 14:801-807.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., dan Ingledew, W.M., 1996. Practical and Theoretical Considerations in the Production of High Concentrations of Alcohol by Fermentation. *Process Biochem.*, 31:321-331.
- Van Haandel, A., and Van Der Lubbe, J., 2012. *Handbook of Biological Wastewater Treatment Design and Optimization of Activated Sludge*, IWA Publishing, London. pp 8-10.
- Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., dan Henschke, P.A., 2012. Effect of Oxygen and Lipid Supplementation on the Volatile Composition of Chemically Defined Medium and Chardonnay Wine Fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 135:2863-2871.
- Vilanova, M., Siebert, T.E., Varela, C., Pretorius, I.S., dan Henschke, P.A., 2012., Effect of Ammonium Nitrogen Supplementation of Grape Juice on Wine Volatiles and Volatile Composition of the Aromatic Grape Variety Albariño. *Food Chemistry*, 133:124-131.
- Wang, L., Zhou, Q., dan Zheng, G.H., 2006^a. Comprehensive Analysis of the Factors for Propionic Acid Accumulation in Acidogenic

- Phase of Anaerobic Process. *Environmental Technology*, 27(3):269-276.
- Wang, L., Zhou, Q., dan Li, F.T. 2006^b. Avoiding Propionic Acid Accumulation in the Anaerobic Process for Biohydrogen Production. *Biomass and Bioenergy*, 30:177–182.
- Wu, K.J., Chang, C.F., dan Chang, J.S., 2007. Simultaneous Production of Biohydrogen and Bioethanol with Fluidized-Bed and Packed-Bed Bioreactors Containing Immobilized Anaerobic Sludge. *Process Biochemistry*, 42:1165–1171.
- Zhao, X.Q., Xue, C., Ge, X.M., Yuan, W.J. Wang, J.Y., dan Bai, F.W., 2009. Impact of Zinc Supplementation on the Improvement of Ethanol Tolerance and Yield of Self-flocculating Yeast in Continuous Ethanol Fermentation. *Journal of Biotechnology*, 139:55–60.
- Zhu, Y., dan Yang, S.T., 2005. Effect of pH on Metabolic Pathway Shift in Fermentation of Xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*, 110:143–157.
- Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C., dan Nakamura, Y., 2008. Ethanol Production from Paper Sludge by Immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 42:314–319.
- Yenigün, O., Kizilgün, F., dan Yilmazer, G., 1996. Inhibition Effects of Zinc and Copper on Volatile Fatty Acid Production During Anaerobic Digestion. *Environmental Technology*, 17(11):1269-1274.
- Yu, H.Q., dan Fang, H.H.P., 2003. Acidogenesis of Gelatin-rich Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor: Influence of pH and Temperature. *Water Research*, (37):55–66.