

# Evaluasi Faktor Kritis Penyebab Kegagalan Fermentasi ABE dalam Produksi Biobutanol dari Molase Menggunakan *Clostridium acetobutylicum*

Agung Sugiharto<sup>1</sup>, Muhammad Alhadilansa Salsabil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta

Korespondensi: agung.sugiharto@ums.ac.id

## Abstrak

Fermentasi Aseton-Butanol-Etanol (ABE) menggunakan *Clostridium acetobutylicum* merupakan jalur utama produksi biobutanol dari bahan lignoselulosa dan gula industri seperti molase. Namun keberhasilan fermentasi ABE sangat sensitif terhadap sejumlah faktor teknis yang apabila tidak terpenuhi akan menyebabkan kegagalan total. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi dan mengidentifikasi faktor-faktor kritis penyebab kegagalan fermentasi ABE pada media molase dengan variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 °Brix. Fermentasi dilakukan pada suhu 37°C, pH 6,5, inokulum 10% (v/v), selama 14 hari dalam kondisi anaerob menggunakan erlenmeyer tertutup rapat dengan sumbat karet dan outlet selang ke water-lock. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya produksi biobutanol, aseton, maupun etanol pada seluruh variasi konsentrasi yang dianalisis menggunakan GC-FID. Tidak adanya aktivitas gelembung gas (CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>) sejak hari pertama dan stabilnya nilai pH sepanjang fermentasi mengindikasikan kematian atau inaktivasi bakteri sebelum proses dimulai. Evaluasi sistematis terhadap prosedur penelitian mengidentifikasi empat faktor kritis utama penyebab kegagalan: (1) viabilitas inokulum yang tidak terverifikasi, (2) kondisi anaerob yang tidak sempurna, (3) potensi degradasi substrat molase akibat sterilisasi panas, dan (4) kerentanan protokol inokulasi terhadap paparan oksigen. Hasil ini memberikan panduan evaluasi prosedural bagi peneliti dalam merancang protokol fermentasi ABE yang lebih andal, khususnya saat menggunakan substrat molase di laboratorium dengan fasilitas anaerob terbatas.

**Kata Kunci:** biobutanol; fermentasi ABE; *Clostridium acetobutylicum*; molase; faktor kritis; kegagalan fermentasi

## Abstract

Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium acetobutylicum* is one of the main pathways for biobutanol production from lignocellulosic biomass and industrial sugar sources such as molasses. However, the success of ABE fermentation is highly sensitive to several technical factors, and failure to meet these conditions may lead to complete fermentation failure. This study aimed to evaluate and identify the critical factors causing failure in ABE fermentation using molasses media at concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50 °Brix. Fermentation was conducted at 37°C, pH 6.5, with 10% (v/v) inoculum for 14 days under anaerobic conditions using tightly sealed Erlenmeyer flasks equipped with rubber stoppers and outlet tubing connected to a water-lock system. The results showed no production of biobutanol, acetone, or ethanol at all concentration variations, as confirmed by GC-FID analysis. The absence of gas bubble activity (CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>) from the first day and the stable pH values throughout fermentation indicated bacterial death or inactivity prior to the fermentation process. A systematic evaluation of the experimental procedure identified four major critical factors contributing to fermentation failure: (1) unverified inoculum viability, (2) incomplete anaerobic conditions, (3) potential molasses substrate degradation due to heat sterilization, and (4) the susceptibility of the inoculation protocol to oxygen exposure. These findings provide procedural evaluation guidelines for researchers in designing more reliable ABE fermentation protocols, particularly when using molasses as

substrate in laboratories with limited anaerobic facilities.

**Keywords:** biobutanol; ABE fermentation; *Clostridium acetobutylicum*; molasses; critical factors; fermentation failure.

## 1. PENDAHULUAN

Biobutanol ( $C_4H_9OH$ ) diproduksi melalui fermentasi Aseton-Butanol-Etanol (ABE) oleh bakteri *Clostridium acetobutylicum* dan merupakan kandidat bahan bakar terbarukan yang menjanjikan. Dibandingkan bioetanol, biobutanol memiliki nilai kalor lebih tinggi (33,1 MJ/kg vs 26,8 MJ/kg), tekanan uap lebih rendah, bersifat non-higroskopis, serta dapat dicampur dengan bensin tanpa modifikasi mesin (Roy and Dahman, 2023; Obergruber et al., 2021). Hal ini menjadikan biobutanol relevan dengan target Kebijakan Energi Nasional (KEN) yang menghendaki kontribusi energi terbarukan minimal 23% pada tahun 2025 (Kussuryani et al., 2015).

Molase (tetes tebu) merupakan substrat yang umum digunakan dalam fermentasi ABE karena kandungan gulanya yang tinggi (40–55%), kaya nutrisi mikro, dan harganya relatif murah (Reno et al., 2023). Meski demikian, literatur menunjukkan bahwa fermentasi ABE dari molase sangat rentan terhadap kegagalan, terutama di laboratorium dengan fasilitas anaerob yang terbatas. Li et al. (2020) menegaskan bahwa viabilitas inokulum dan integritas kondisi anaerob merupakan prasyarat mutlak yang tidak dapat dikompromikan dalam fermentasi ABE.

Sejumlah penelitian sebelumnya telah berhasil memproduksi biobutanol dari molase dan substrat gula serupa dengan yield 0,15–0,25 g/g gula (Suprihatin, Sofiati and Prastiyo, 2020; Plaza et al., 2022). Namun demikian, laporan mengenai kegagalan fermentasi beserta analisis faktor penyebabnya masih sangat terbatas dalam literatur, padahal informasi ini sangat bernilai bagi komunitas peneliti terutama di institusi dengan keterbatasan fasilitas anaerob.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan: (1) mendokumentasikan secara sistematis kegagalan fermentasi ABE pada media molase berbagai konsentrasi; (2) mengidentifikasi dan mengevaluasi faktor-faktor kritis penyebab kegagalan berdasarkan bukti empiris yang diperoleh; serta (3) merumuskan rekomendasi protokol yang dapat mencegah kegagalan serupa pada penelitian selanjutnya.

## 2. METODE

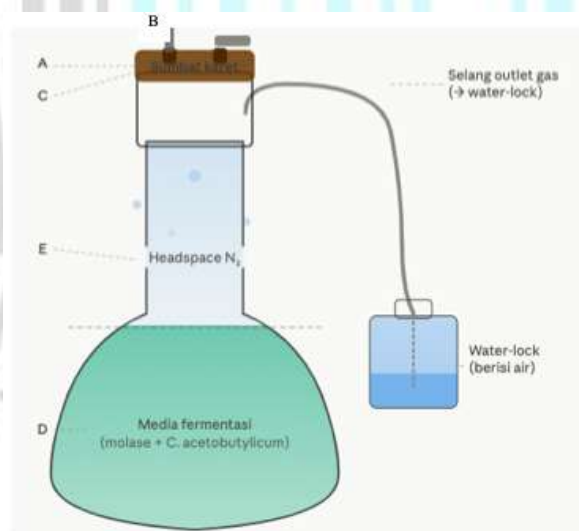
### 2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dirancang sebagai studi eksperimental deskriptif. Variabel bebas adalah konsentrasi molase (10, 20, 30, 40, dan 50 °Brix). Variabel yang diamati meliputi aktivitas gelembung gas, perubahan pH, dan konsentrasi produk ABE (butanol, aseton, etanol) yang dianalisis dengan GC-FID. Variabel kontrol: inokulum 10% (v/v), suhu 37°C, pH awal 6,5, waktu fermentasi 14 hari, kondisi anaerob.

### 2.2 Bahan dan Alat

Bahan: molase dari industri gula lokal, inokulum *C. acetobutylicum*, media RCM (*Reinforced Clostridial Medium*), NaOH, HCl, akuades, gas N<sub>2</sub>.

Alat: erlenmeyer 250 mL sebagai fermentor anaerob (ditutup rapat dengan sumbat karet berlubang dua: satu untuk inokulasi dan satu sebagai outlet gas menuju water-lock), refraktometer brix, pH meter digital, GC-FID (suhu kolom 50–250°C, gas pembawa N<sub>2</sub> 1,0 mL/menit), autoclave, inkubator, kolom destilasi, neraca analitik.



Gambar 1. Desain fermentor anaerob berbasis erlenmeyer yang digunakan dalam penelitian ini.

[Gambar 1 – Skema erlenmeyer 250 mL sebagai fermentor anaerob: (A) sumbat karet berlubang dua, (B) port inokulasi ditutup jarum dan septum, (C) selang outlet gas menuju botol water-lock berisi air, (D) media fermentasi, (E) headspace N<sub>2</sub>]

*Catatan: Fermentasi tidak menggunakan fermentor anaerob komersial. Sistem yang digunakan adalah erlenmeyer tertutup rapat dengan sumbat karet dan water-lock sederhana untuk mencegah masuknya udara luar. Keterbatasan desain ini diidentifikasi sebagai salah satu faktor yang berkontribusi terhadap kegagalan fermentasi (lihat Bagian 3.3).*

## 2.3 Persiapan Substrat

Larutan molase dibuat pada konsentrasi 10–50 °Brix menggunakan akuades, disaring dengan kertas Whatman No. 1, pH diatur ke 6,5, kemudian disterilisasi dengan autoclave (121°C, 15 menit).

## 2.4 Persiapan dan Inokulasi Bakteri

*C. acetobutylicum* ditumbuhkan pada media RCM dalam kondisi anaerob (37°C, 24–48 jam) hingga fase eksponensial. Kondisi anaerob dijaga dengan purging N<sub>2</sub> selama 10 menit sebelum inokulasi. Bakteri diinokulasikan sebesar 10% (v/v) secara aseptis.

## 2.5 Fermentasi dan Pemantauan

Fermentasi dijalankan pada 37°C selama 14 hari. Pemantauan dilakukan setiap tiga hari meliputi: (1) pengamatan visual aktivitas gelembung gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>, dan (2) pengukuran pH. Setelah fermentasi, seluruh sampel dianalisis dengan GC-FID dan didestilasi untuk verifikasi keberadaan komponen volatil.

# 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

## 3.1 Hasil Pemantauan Fermentasi

Pemantauan selama 14 hari menunjukkan tidak adanya aktivitas gelembung gas pada seluruh variasi konsentrasi molase (Tabel 1). Gelembung CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> merupakan produk wajib fase asidogenesis fermentasi ABE yang seharusnya muncul dalam 12–24 jam pertama setelah inokulasi pada kondisi normal (Lin, Cong and Zhang, 2023; Jones, 2024). Ketiadaannya sejak hari pertama merupakan indikasi awal kegagalan yang kuat.

Nilai pH seluruh sampel tidak menunjukkan penurunan signifikan selama 14 hari fermentasi (Tabel 1). Pada fermentasi ABE aktif, pH normalnya turun dari 6,5 ke 4,5–5,0 akibat akumulasi asam asetat dan asam butirat di fase asidogenesis (Li et al., 2020). Stabilitasnya pH pada konsentrasi 10–30 °Brix secara khusus mengindikasikan ketiadaan aktivitas metabolisme apapun, bukan sekadar inhibisi.

Tabel 1. Hasil Pemantauan pH dan Aktivitas Gelembung Gas Selama 14 Hari Fermentasi

Konsentrasi (°Brix)	pH Awal	pH Hari-7	pH Hari-14	Aktivitas Gelembung	Status Fermentasi
10	6,5	6,5	6,5	Negatif	Gagal
20	6,5	6,5	6,5	Negatif	Gagal
30	6,5	6,5	6,5	Negatif	Gagal
40	6,5	6,4	6,4	Negatif	Gagal

50	6,5	6,4	6,3	Negatif	Gagal
----	-----	-----	-----	---------	-------

*Negatif = tidak terdeteksi aktivitas gelembung gas CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> secara visual*

### 3.2 Hasil Analisis GC-FID

Analisis GC-FID pada hari ke-14 mengkonfirmasi tidak adanya produk ABE pada seluruh sampel (Tabel 2). Batas deteksi instrumen adalah 0,01 g/L, sehingga nilai nol yang diperoleh bermakna bahwa fermentasi benar-benar tidak menghasilkan senyawa target. Temuan ini konsisten dengan pengamatan visual yang tidak menunjukkan perubahan apapun selama proses berlangsung.

Tabel 2. Hasil Analisis GC-FID terhadap Produk Fermentasi ABE pada Hari ke-14

Konsentrasi (°Brix)	Butanol (g/L)	Aseton (g/L)	Etanol (g/L)	Keterangan
10	t.d.*	t.d.*	t.d.*	Tidak ada produk ABE
20	t.d.*	t.d.*	t.d.*	Tidak ada produk ABE
30	t.d.*	t.d.*	t.d.*	Tidak ada produk ABE
40	t.d.*	t.d.*	t.d.*	Tidak ada produk ABE
50	t.d.*	t.d.*	t.d.*	Tidak ada produk ABE

*t.d. = tidak terdeteksi (< batas deteksi 0,01 g/L)*

Proses destilasi juga tidak menghasilkan fase organik. Kondensat yang terkumpul pada suhu 78–100°C (rentang titik didih etanol hingga air) hanya berupa air jernih tanpa warna maupun aroma alkohol yang khas, dengan volume ± 5–10 mL per sampel. Tidak ditemukan lapisan organik terpisah maupun perubahan warna yang mengindikasikan keberadaan senyawa volatil selain air. Hal ini memperkuat bukti bahwa fermentasi ABE tidak berlangsung pada kondisi penelitian yang diterapkan.

### 3.3 Evaluasi Faktor Kritis Penyebab Kegagalan

Berdasarkan bukti empiris yang diperoleh dan tinjauan literatur, empat faktor kritis diidentifikasi sebagai penyebab kegagalan fermentasi. Evaluasi sistematis terhadap masing-masing faktor disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Evaluasi Faktor Kritis Penyebab Kegagalan dan Rekomendasi Perbaikan

Faktor Kritis	Indikasi dalam Penelitian Ini	Rekomendasi Perbaikan
Viabilitas Inokulum	Tidak ada gelembung CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> sejak hari pertama; pH stabil (tidak turun)	Uji OD <sub>600</sub> dan pewarnaan gram sebelum inokulasi; gunakan stok spora terbaru
Kondisi Anaerob	Purgin N <sub>2</sub> 10 menit mungkin tidak cukup; oksigen terlarut	Gunakan anaerobic chamber; tambahkan resazurin sebagai indikator redoks

	dalam media dan headspace	
Kualitas Substrat	Molase berkonsentrasi tinggi rentan karamelisasi saat autoklaf (121°C, 15 mnt)	Filter sterilisasi (0,22 µm) untuk molase; atau sterilisasi pada 110°C
Protokol Inokulasi	Inokulasi terbuka berpotensi paparan O <sub>2</sub> sesaat yang fatal bagi anaerob obligat	Inokulasi dalam anaerobic chamber; pre-reduce media dengan L-sistein HCl 0,05%
Desain Fermentor	Erlenmeyer dengan sumbat karet dan water-lock sederhana digunakan sebagai pengganti fermentor anaerob khusus. Tanpa pengukuran DO dan uji kebocoran, integritas kondisi anaerob tidak dapat dikonfirmasi selama 14 hari fermentasi (Gambar 1).	Gunakan fermentor dengan water-lock seal dan one-way valve CO <sub>2</sub> yang tervalidasi; lakukan pressure test sebelum fermentasi; monitor DO menggunakan probe terlarut atau indikator resazurin

### a) Viabilitas Inokulum yang Tidak Terverifikasi

Faktor paling kritis yang diduga menyebabkan kegagalan adalah ketiadaan verifikasi viabilitas inokulum sebelum fermentasi dimulai. Apabila inokulum yang diinokulasikan telah mengalami kematian sel atau kehilangan aktivitas, tidak ada kondisi fermentasi apapun yang dapat memulihkannya. Indikasi terkuat adalah ketiadaan gelembung gas sejak hari pertama—bahkan pada konsentrasi molase rendah (10 °Brix) yang tidak berpotensi inhibitorik.

Li et al. (2020) menegaskan bahwa verifikasi viabilitas melalui pengukuran OD<sub>600</sub> (target  $\geq 0,8$  untuk fase eksponensial) dan pewarnaan gram merupakan langkah wajib sebelum inokulasi pada fermentasi skala laboratorium. Jones (2024) juga merekomendasikan uji tumbuh paralel pada media RCM cair sebelum digunakan sebagai inokulum untuk fermentasi utama.

### b) Kondisi Anaerob yang Tidak Memadai

*Clostridium acetobutylicum* adalah anaerob obligat dengan toleransi oksigen yang sangat rendah—paparan O<sub>2</sub> bahkan pada konsentrasi 0,01% selama beberapa menit dapat bersifat letal bagi sel vegetatif (Li et al., 2020). Pada penelitian ini, purging N<sub>2</sub> selama 10 menit sebelum inokulasi diterapkan, namun prosedur ini dilakukan di luar anaerobic chamber. Proses transfer inokulum dari botol stok ke erlenmeyer fermentor dilakukan secara terbuka di udara laboratorium menggunakan pipet steril, sehingga bakteri berpotensi terpapar oksigen atmosfer pada saat inokulasi berlangsung.

Penggunaan indikator resazurin (0,0001% w/v) dalam media fermentasi merupakan praktik standar untuk memantau kondisi redoks secara visual: media berwarna biru (teroksidasi) → merah muda → tidak berwarna (tereduksi sempurna, siap fermentasi) (Zhang et al., 2018). Ketiadaan indikator ini dalam protokol penelitian ini menjadi kelemahan prosedural yang signifikan karena kondisi anaerob tidak dapat dikonfirmasi sebelum inokulasi dimulai.

### c) Potensi Degradasi Substrat Molase akibat Sterilisasi Panas

Sterilisasi molase menggunakan autoclave (121°C, 15 menit) berpotensi menyebabkan karamelisasi sukrosa dan reaksi Maillard, menghasilkan senyawa inhibitor berupa furfural dan 5-hydroxymethylfurfural (HMF), terutama pada konsentrasi tinggi ( $\geq 30$  °Brix) (Zhang et al., 2018). Meski kegagalan pada konsentrasi rendah (10–20 °Brix) menunjukkan bahwa ini bukan satu-satunya faktor, degradasi substrat dapat memperburuk kondisi yang sudah tidak optimal.

Plaza et al. (2022) merekomendasikan sterilisasi molase pada suhu lebih rendah (110–115°C) atau menggunakan filtrasi membran (0,22  $\mu\text{m}$ ) untuk mencegah degradasi komponen gula yang sensitif panas.

### d) Kerentanan Protokol Inokulasi terhadap Paparan Oksigen

Proses inokulasi yang dilakukan secara terbuka di luar anaerobic chamber merupakan titik paling rentan terhadap paparan  $\text{O}_2$  dalam seluruh alur kerja fermentasi ABE. Meskipun inokulasi dilakukan secara aseptis untuk mencegah kontaminasi mikroba lain, prosedur tersebut tidak memberikan perlindungan terhadap paparan oksigen atmosfer yang dapat bersifat letal bagi *C. acetobutylicum*. Li et al. (2020) menegaskan bahwa seluruh manipulasi inokulum seharusnya dilakukan dalam anaerobic chamber atau minimal menggunakan teknik Hungate.

## 3.4 Perbandingan dengan Studi Berhasil

Suprihatin, Sofiati and Prastiyo (2020) berhasil memproduksi biobutanol dari glukosa off-grade menggunakan *C. acetobutylicum* dengan titer butanol 5,2 g/L pada kondisi anaerob yang dikontrol ketat menggunakan anaerobic chamber. Plaza et al. (2022) melaporkan titer butanol hingga 8,5 g/L dari spent grain brewery dengan sistem fermentor khusus bersegel ganda dan purging  $\text{CO}_2$  terus-menerus. Perbedaan mendasar antara studi-studi berhasil tersebut dengan penelitian ini adalah penggunaan sistem anaerob yang tervalidasi dan verifikasi viabilitas inokulum yang ketat sebelum inokulasi.

## 3.5 Implikasi untuk Penelitian Lanjutan

Temuan negatif dalam penelitian ini memiliki nilai ilmiah yang penting. Kegagalan fermentasi ABE yang terdokumentasi dengan baik memberikan peta jalan bagi peneliti selanjutnya untuk menghindari kesalahan prosedural serupa. Berdasarkan evaluasi ini, penelitian lanjutan harus memprioritaskan:

- Verifikasi viabilitas inokulum ( $\text{OD}_{600} \geq 0,8$ ; pewarnaan gram; uji tumbuh paralel pada RCM) sebelum inokulasi ke media utama.
- Penggunaan anaerobic chamber untuk seluruh tahapan preparasi inokulum dan inokulasi,

dilengkapi indikator resazurin dalam media.

- Fermentor dengan water-lock seal, one-way valve, dan pre-reducing media menggunakan L-sistein HCl (0,05%) untuk memastikan kondisi redoks yang optimal.
- Sterilisasi molase pada suhu lebih rendah (110°C) atau filtrasi membran untuk mencegah degradasi gula dan pembentukan inhibitor HMF/furfural.

#### 4. PENUTUP

Fermentasi ABE dari molase menggunakan *C. acetobutylicum* pada seluruh variasi konsentrasi yang diujikan (10–50 °Brix) tidak menghasilkan produk biobutanol, aseton, maupun etanol yang terdeteksi. Tidak adanya aktivitas gelembung gas sejak hari pertama dan stabilnya nilai pH selama 14 hari fermentasi secara konsisten mengindikasikan inaktivasi atau kematian bakteri sebelum atau segera setelah inokulasi.

Evaluasi sistematis mengidentifikasi empat faktor kritis penyebab kegagalan: (1) viabilitas inokulum yang tidak terverifikasi, (2) kondisi anaerob yang tidak sempurna akibat prosedur purging dan inokulasi yang tidak memadai, (3) potensi degradasi substrat molase akibat sterilisasi autoklaf suhu tinggi, dan (4) kerentanan protokol inokulasi terbuka terhadap paparan oksigen.

Berdasarkan hasil evaluasi di atas, penelitian ini merumuskan panduan evaluasi prosedural berikut yang dapat digunakan sebagai checklist oleh peneliti sebelum memulai fermentasi ABE:

Tabel 4. Panduan Evaluasi Prosedural Fermentasi ABE (Checklist Pra-Fermentasi)

No.	Aspek yang Dievaluasi	Kriteria Keberhasilan	Tindakan jika Tidak Terpenuhi
1	Viabilitas inokulum: OD <sub>600</sub> diukur sebelum inokulasi	OD <sub>600</sub> ≥ 0,8 (fase eksponensial)	Subkultur ulang pada RCM segar; tunda inokulasi
2	Morfologi inokulum: pewarnaan gram dilakukan	Sel batang gram-positif, tidak terkontaminasi	Buang inokulum; aktifkan stok spora baru
3	Uji tumbuh paralel: inokulum ditumbuhkan pada RCM cair kontrol	Terjadi kekeruhan dan/atau gelembung gas dalam 24 jam	Jangan gunakan inokulum untuk fermentasi utama
4	Kondisi redoks media: resazurin ditambahkan ke media fermentasi	Media tidak berwarna (tereduksi sempurna) sebelum inokulasi	Purging N <sub>2</sub> lebih lama; tambahkan L-sistein HCl 0,05%
5	Prosedur inokulasi: transfer dilakukan dalam anaerobic chamber atau teknik Hungate	Tidak ada paparan udara selama inokulasi berlangsung	Gunakan jarum suntik steril melalui septum; minimalkan waktu paparan
6	Integritas segel fermentor: uji kebocoran sebelum fermentasi	Tidak ada gelembung udara saat fermentor direndam air	Ganti sumbat karet; perkuat sambungan selang

7	Kualitas substrat: molase tidak mengalami perubahan warna berlebihan setelah sterilisasi	Warna cokelat muda, tidak hitam pekat, tidak berbau gosong	Turunkan suhu sterilisasi ke 110°C atau gunakan filtrasi 0,22 µm
---	--	--	--

Checklist di atas dirancang untuk digunakan sebagai instrumen verifikasi mandiri sebelum fermentasi ABE dimulai. Penelitian lanjutan yang mengimplementasikan seluruh kriteria pada Tabel 4 diperkirakan akan memberikan kondisi yang jauh lebih kondusif bagi keberhasilan fermentasi *C. acetobutylicum* dari substrat molase.

#### DAFTAR PUSTAKA (styleHeading Daftar Pustaka)

- Jones, D.T. (2024) 'The Industrial Fermentation Process and Clostridium Species Used to Produce Biobutanol', *Applied Microbiology*, 4(2), pp. 894–917.  
<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4020061>.
- Kussuryani, Y. et al. (2015) 'Produksi Biobutanol Sebagai Bahan Bakar Terbarukan Melalui Proses Fermentasi', *Jurnal Publikasi Minyak dan Gas Bumi*, 49(2), pp. 2–5.
- Li, S. et al. (2020) 'Pathway dissection, regulation, engineering and application: Lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia', *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), pp. 1–25.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01674-3>.
- Lin, Z., Cong, W. and Zhang, J. (2023) 'Biobutanol Production from Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation: Developments and Prospects', *Fermentation*, 9(9), pp. 1–17.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9090847>.
- Obergruber, M. et al. (2021) 'Physicochemical properties of biobutanol as an advanced biofuel', *Materials*, 14(4), pp. 1–21. <https://doi.org/10.3390/ma14040914>.
- Plaza, P.E. et al. (2022) 'Bioprocess intensification for acetone-butanol-ethanol fermentation from brewer's spent grain', *Biomass and Bioenergy*, 156.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106327>.
- Reno et al. (2023) 'Analisis Ekonomi Awal Proses Produksi Biobutanol dari Tandan Kosong Sawit', *Jurnal Teknik: Media Pengembangan Ilmu dan Aplikasi Teknik*, 21(2), pp. 124–134.
- Roy, P. and Dahman, Y. (2023) 'Mutagenesis of Novel Clostridial fusants for Enhanced Green Biobutanol Production from Agriculture Waste', *Fermentation*, 9(2).  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9020092>.
- Suprihatin, Sofiati, N. and Prastiyo, N.E. (2020) 'Biobutanol dari Glucose Off Grade dengan Proses Fermentasi Menggunakan Clostridium Acetobutylicum', *Seminar Nasional Teknik Kimia Soebardjo Brotohardjono XVI*.
- Zhang, J. et al. (2018) 'A Brief Review of Some Current Improvements in ABE Production', *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 12(5), pp. 405–414.