

# EFEK PEMANASAN PADA ALGA *LAMINARIA DIGITATA* TERHADAP PRODUKSI METHAN DAN POTENSI *LAMINARIA DIGITATA* SEBAGAI CO-SUBSTRAT DENGAN MANURE SAPI PADA DIGESTER BIOGAS

*(Warming Effects On The Algae Methane Production Laminaria Digitata Laminaria Digitata Potential And As Co-Substrate Withcattle On Manure Biogas Digester)*

Sutaryo<sup>1\*</sup> dan Agung Purnomoadi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan dan Pertanian, Undip, Semarang

\*email: soeta@undip.ac.id

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek pre-treatment dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 4, 8 dan 16 jam terhadap produksi metan dari makro alga *Laminaria digitata*. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya efek positif dari metode pre-treatment tersebut terhadap produksi metan. Namun demikian metode pre-treatment ini mampu meningkatkan laju produksi metan diawal inkubasi. Hal ini menandakan bahwa dengan pemanasan dihasilkan senyawa-senyawa yang mudah didekomposisi oleh mikroorganisme. Pemanasan pada temperatur 70°C selama 4 jam mempunyai efek yang paling baik dibanding pemanasan pada suhu serupa selama 8 dan 16 jam. Evaluasi penggunaan *Laminaria digitata* sebagai co-substrat dengan manure sapi perah pada digester biogas menunjukkan bahwa makro alga ini efektif untuk meningkatkan produksi metan per ton berat substrat.

**Kata kunci:** biogas, alga, co-digesti, manure

## ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the effect of thermal pre-treatment at 70°C for 4, 8 and 16 hours on the methane yield of macro algae Laminaria digitata. The result showed that low temperature thermal pre-treatment can increased the methane production rate in early of incubation but there was no positive effect on the ultimate methane yield of Laminaria digitata. This phenomenon indicated that application of this pre-treatment can produce easily degradable organic material. Thermal pre-treatment on 70°C for 4 hours produced the highest methane yield than that for 8 and 16 hours. Evaluation of application Laminaria digitata as co-substrate with dairy cow manure showed that this macro algae was potential to increase methane production per tonne substrate.*

*Keywords: biogas, algae, co-digestion, manure*

## PENDAHULUAN

Upaya penanganan limbah dapat dilakukan secara aerob maupun anaerob. Salah satu keunggulan metode penanganan limbah secara anaerob adalah dihasilkannya metan yang dapat digunakan sebagai sumber energi terbarukan yang ramah lingkungan. Methan yang dihasilkan pada industri biogas bukan hanya dapat mensuplai kebutuhan energi pada instalasi penanganan limbah tetapi juga dapat dijual secara komersial. Bahkan pada sebagian besar industri biogas sebagian besar (lebih

dari 90%) energi yang mereka hasilkan sudah bisa diekspor ke lingkungan disekitarnya.

Proses biokonversi bahan organik dari substrat pada digesti secara anaerob yang terjadi pada digester biogas melalui berbagai tahapan yang sangat kompleks dan melibatkan berbagai jenis konsorsium mikroorganisme. Berbagai tahapan tersebut pada intinya dapat dikelompokkan menjadi tahap: hidrolisis, acidogenesis, acetogenesis dan methanogenesis (Park dan Ahn, 2011). Tahap hidrolisis merupakan tahap penguraian bahan organik yang kompleks menjadi senyawa

penyusunnya yang lebih sederhana sehingga senyawa hasil penguraian tersebut bisa menembus dinding sel dan bisa dimanfaatkan oleh mikroorganisme pengurai sebagai sumber nutrisi. Tahap hidrolisis ini dapat menjadi faktor pembatas pada digesti bahan organik secara anaerob apabila substrat yang kita digunakan mempunyai tingkat pencernaan yang rendah atau mempunyai kandungan serat kasar yang tinggi (Rico et al., 2009; Hidalgo et al., 2012). Upaya yang dapat ditempuh untuk meningkatkan pencernaan dari bahan-bahan tersebut adalah antara lain adalah dengan melakukan pre-treatment sebelum digunakan sebagai substrat pada digester biogas.

Berbagai metode pre-treatment yang dapat diterapkan untuk meningkatkan pencernaan bahan organik antara lain dengan pemanasan, pemanasan yang dikombinasikan dengan penggunaan tekanan yang tinggi, penggunaan senyawa asam/basa, pengecilan ukuran partikel substrat yang dapat dilakukan dengan maserasi dan ekstrusi, penggunaan gelombang ultrasonik, pre-treatment dengan proses biologis seperti penggunaan jamur pelapuk putih dan penambahan enzim dan lain sebagainya.

Pemanasan utamanya pemanasan pada temperatur rendah (65-85°) merupakan salah satu metode pre-treatment yang menjanjikan karena pada sebagian besar biogas plant saat ini dikombinasikan dengan pembangkit listrik yang menghasilkan air panas. Air panas tersebut berasal dari air yang digunakan sebagai pendingin generator listrik dan air panas ini dapat dimanfaatkan sebagai media pre-treatment karena temperatur air tersebut dapat mencapai lebih dari 80°C dan pada kebanyakan biogas plant, air panas ini belum dimanfaatkan secara optimal sehingga energi panasnya hanya terbuang percuma ke atmosfer (Menardo et al., 2011).

Diantara sumber biomass yang dapat digunakan sebagai substrat pada industri biogas berupa makro alga. Makro alga sendiri banyak tumbuh subur pada

badan air yang mengalami fenomena eutrofikasi seperti pada wilayah teluk dan danau. Fenomena eutrofikasi ini telah melanda ribuan danau sebagai akibat suburnya badan air oleh akumulasi pencemaran unsur hara utamanya dari penggunaan unsur hara yang berlebihan dari sektor pertanian dan dari berbagai aktivitas manusia misalnya dari penggunaan fosfor pada detergent dan lain sebagainya. Dengan demikian penggunaan makro alga sebagai substrat pada digester biogas merupakan salah satu alternatif penggunaan makro alga untuk memproduksi sumber energi yang terbarukan dan ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi penggunaan thermal pre-treatment pada makro alga *Laminaria digitata* pada suhu 70°C selama 4, 8 dan 16 jam terhadap produksi metan dan tinjauan pustaka tentang penggunaan *Laminaria digitata* sebagai co-substrat dengan manure ternak sapi perah sebagai bahan baku pada industri biogas.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Inoculum/Starter

Inoculum diperoleh dari fasilitas post digestion di biogas research centre Foulum Denmark dengan nilai pH 7,74; volatile fatty acid (VFA) 111,4 mg/L; kandungan bahan kering (BK) 2,63% dan kandungan volatile solid (VS) 1,44%. Starter tersebut kemudian dikemas, dikondisikan secara anaerob dan disimpan pada inkubator dengan temperatur 35°C selama kurang lebih tiga minggu. Langkah ini ditempuh dengan tujuan untuk meminimalkan produksi biogas dari starter. Dengan tujuan yang sama starter tersebut kemudian disaring secara manual dengan menggunakan saringan dengan ukuran 500 µm (serial number 5564470 D-42759 Haan, Germany) dan hanya bagian cairnya saja yang digunakan sebagai starter untuk penelitian.

### Pre-treatment

Pre-treatment dengan metode pemanasan dilakukan dengan mengemas

alga *Laminaria digitata* pada botol gelas kemudian ditutup rapat dengan tutup karet dan diklem dengan aluminium. Setiap botol diisi dengan  $\pm$  150 g alga. Botol yang telah diisi dengan alga kemudian ditempatkan pada waterbatch dimana pada temperatur pada waterbatch sebelumnya telah diatur pada suhu 70°C. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan yang diberikan berupa lama pre-treatment, yang meliputi:

T0: kontrol (tanpa pemanasan)

T1: 4 jam

T2: 8 jam

T3: 16 jam

Sampel alga yang telah dipanaskan kemudian didinginkan dengan cara merendam botol yang berisi sampel pada air dingin. Setelah mencapai suhu lingkungan sampel alga dikeluarkan dari tabung gelas kemudian dikemas dengan tabung plastik, ditutup rapat dan disimpan di dalam freezer sambil menunggu persiapan digester yang akan digunakan untuk penelitian.

### Digester

Penelitian ini dilaksanakan dengan digesti secara anaerob dengan menggunakan digester batch dengan protokol yang dikembangkan oleh (Møller *et al.*, 2004). Digester berupa botol kaca bervolume 500 ml. Digester diisi dengan  $\pm$  200 g inoculum kemudian ditambahkan substrat berupa alga. Perbandingan VS antara inoculum dan sampel alga adalah sebesar 1 : 1. Digester kemudian ditutup rapat dengan penutup karet dan diklem dengan menggunakan aluminium. Langkah selanjutnya dengan tujuan untuk menciptakan kondisi anaerob dengan menggunakan jarum bagian atas digester dialiri dengan gas nitrogen murni selama 2 menit. Digester kemudian ditempatkan pada inkubator dengan temperatur 35°C selama 45 hari. Biogas diukur volumenya secara berkala dengan metode liquid displacement method dengan menggunakan larutan asam (asam sulfat yang dilarutkan dengan air dengan pH < 2). Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mencegah larutnya

karbondioksida dari biogas ke air yang digunakan sebagai media pengukur volume biogas (Møller *et al.*, 2014). Produksi biogas dari sampel dihitung dengan mengkurangkan produksi biogas dari digester yang berisi sampel dengan produksi biogas dari digester yang hanya berisi starter.

### Analisis

Sampel biogas diambil bersamaan dengan waktu pengukuran volume produksi biogas untuk dianalisis kandungan CO<sub>2</sub> dan CH<sub>4</sub> menggunakan Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph dengan kondisi operasinal seperti yang diuraikan oleh Sutaryo *et al.*, (2012). Kandungan VFA (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>: acetat, propionat, butirat dan valerat) ditentukan dengan menggunakan gas cromatografi (Hewlett Packard 6850A) dengan kondisi operasional seperti yang diuraikan oleh Sutaryo *et al.*, (2012). Kandungan bahan kering pada starter dan pada sampel ditentukan dengan pengeringan sampel pada temperatur 105°C selama 24 jam. Kandungan abu diukur dengan mengabukan BK yang dihasilkan dari langkah sebelumnya dengan menggunakan tanur pada suhu 550°C selama 5 jam. Sedangkan kandungan VS diukur dengan cara mengurangkan BK dengan abu.

Data produksi methan yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dianalisis sidik ragam yang dilanjutkan dengan uji jarak ganda duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan menurut Gomez dan Gomez (2007).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Methan

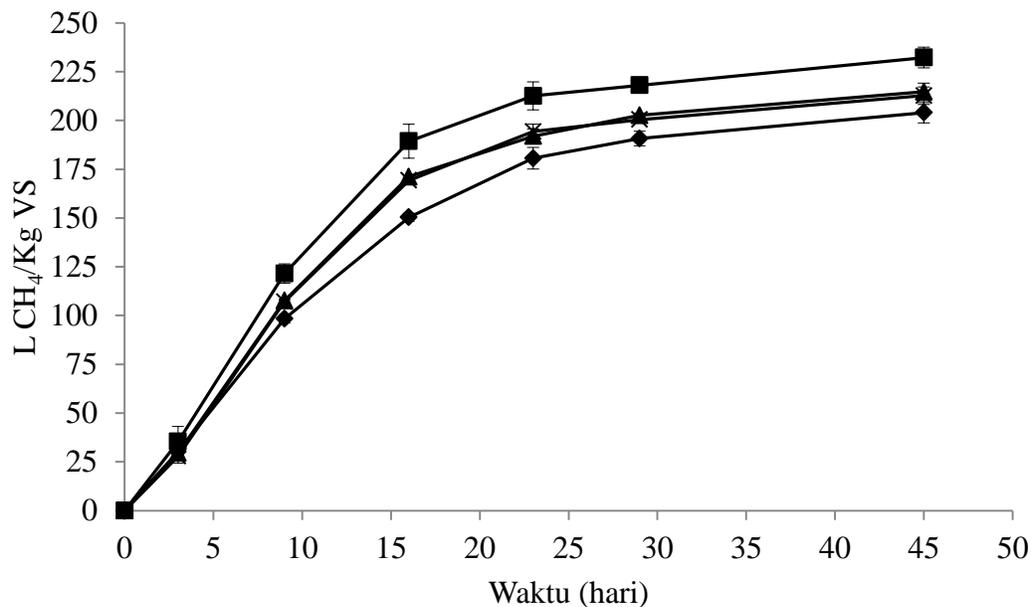
Produksi methan dari alga baik perlakuan kontrol maupun dari tiap perlakuan pemanasan dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1. Nilai produksi methan secara berturut-turut adalah sebagai berikut: 203,99; 232,24; 214,67 dan 212,74 L CH<sub>4</sub>/Kg VS untuk perlakuan kontrol, pemanasan 4, 8 dan 16 jam.

Sebagai perbandingan hasil penelitian dari Nielsen dan Heiske (2011) menunjukkan produksi metan dari berbagai jenis makro alga yaitu sebesar 132 L CH<sub>4</sub>/Kg VS untuk *Gracillaria vermiculophylla*; 152 L CH<sub>4</sub>/Kg VS untuk *Ulva lactuca*; 166 L CH<sub>4</sub>/Kg VS untuk *Chaetomorpha linum* 166 L CH<sub>4</sub>/Kg VS dan 340 L CH<sub>4</sub>/Kg VS untuk *Saccharina latissima* setelah 34 hari inkubasi pada temperatur 53°C. Perbedaan produksi metan dari berbagai jenis makro alga ini bisa diakibatkan karena perbedaan kandungan nutrisi dari berbagai jenis makro alga tersebut mengingat kandungan nutrisi pada inilah yang nantinya dapat dicerna oleh mikroorganismenya dan dihasilkannya metan sebagai produk akhirnya.

Perlakuan pemanasan pada makro alga *Laminaria digitata* tidak memberikan efek positif untuk meningkatkan produksi metan setelah 45 hari inkubasi tetapi

memberikan efek positif dapat meningkatkan laju produksi metan secara nyata ( $p < 0,05$ ) setelah 9 dan 16 hari inkubasi. Peningkatan produksi metan setelah 9 hari inkubasi berkisar antara 8,83 – 33,55% dibandingkan kontrol yang tanpa pemanasan. Sedangkan setelah 16 hari inkubasi terjadi

peningkatan produksi metan yang berkisar antara 12,57 – 25,91% dibandingkan dengan dengan kontrol. Peningkatan produksi metan yang terbesar ditemukan pada perlakuan pemanasan pada suhu 70°C selama 4 jam. Tidak adanya efek positif setelah 45 hari inkubasi dapat disebabkan dengan lamanya waktu inkubasi tersebut maka mikroorganismenya yang terdapat di dalam digester sudah dapat mencerna sebagian besar nutrisi yang ada pada alga karena lamanya waktu tinggal substrat di dalam digester.



**Gambar 1.** Kumulatif produksi metan selama inkubasi (L CH<sub>4</sub>/Kg VS)

**Tabel 1.** Produksi metan untuk tiap perlakuan (L CH<sub>4</sub>/Kg VS).

Lama pemanasan	Produksi metan (L CH <sub>4</sub> /Kg VS)				
	Hari ke-9	Kenaikan (%)	Hari ke-16	Kenaikan (%)	Hari ke-45
Kontrol	98,33 ± 2,15 <sup>a</sup>	-	150,38 ± 2,08 <sup>a</sup>	-	203,99 ± 5,17 <sup>a</sup>
4	121,49 ± 4,99 <sup>b</sup>	23,55	189,35 ± 8,73 <sup>b</sup>	25,91	232,24 ± 5,29 <sup>a</sup>
8	107,59 ± 3,74 <sup>a</sup>	9,42	171,16 ± 4,89 <sup>b</sup>	13,82	214,67 ± 2,02 <sup>a</sup>
16	107,02 ± 0,75 <sup>a</sup>	8,83	169,29 ± 0,40 <sup>b</sup>	12,57	212,74 ± 4,46 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>: Rerata yang diikuti superskrip yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata (p>0,05)

Kandungan nutrisi tersebut selanjutnya dapat dikonversi menjadi metan. Sehingga perlakuan pre-treatment pemanasan pada temperatur ini tidak memberikan efek positif terhadap total produksi metan.

Adanya efek positif dari pre-treatment dengan pemanasan pada temperatur 70°C setelah 9 dan 16 hari inkubasi (Tabel 1) mengindikasikan terjadinya peningkatan laju produksi metan pada awal inkubasi, tetapi tidak berpengaruh terhadap produksi total metan pada akhir inkubasi. Peningkatan laju produksi metan diawal inkubasi bisa diakibatkan karena diproduksi senyawa yang mudah terdekomposisi selama proses pre-treatment dan senyawa tersebut segera dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme (Sutaryo *et al.*, 2014). Hal ini diperkuat dengan hasil analisis kandungan VFA terutama kandungan acetat yang menunjukkan peningkatan pada alga yang mendapatkan perlakuan pemanasan. Kandungan acetat pada perlakuan kontrol, pemanasan 4, 8 dan 16 jam berturut-turut sebesar 52,22; 1754,19; 2515 dan 2445,45 mg/L. Senyawa acetat ini dapat dimanfaatkan secara langsung oleh acetoclastic methanogens untuk memproduksi metan (Bruni *et al.*, 2010).

Perlakuan pemanasan pada temperatur 70°C selama 4 jam mempunyai produksi metan yang tertinggi disepanjang periode pengukuran produksi metan (Tabel 1) dibandingkan perlakuan serupa selama 8 dan 16 jam kemungkinan disebabkan bahwa pada pemanasan

selama 8 dan 16 jam terbentuk senyawa maillard yang sulit untuk didekomposisi oleh mikroorganisme bahkan dapat bersifat sebagai senyawa inhibitor (Müller, 2000). Kemungkinan yang lain adalah bahwa pada perlakuan pemanasan pada temperatur 70°C selama 8 dan 16 jam tersebut terbentuk lebih banyak VFA dibanding pemanasan pada 4 jam dan selanjutnya senyawa tersebut menguap selama preparasi sampel (Sutaryo *et al.*, 2014).

Peningkatan laju produksi metan diawal inkubasi tersebut juga merupakan indikasi bahwa perlakuan pre-treatment pada alga ini menarik untuk kemudian diterapkan sebagai co-subtrat pada digester model kontinyu. Hal ini karena sebagian besar digester biogas merupakan digester model kontinyu dan masa tinggal substrat di dalam digester pada waktu yang relatif singkat. Digester biogas dapat dioperasikan pada kondisi mesophilik dimana temperatur di dalam digester di atur pada kisaran suhu 30-35°C dan masa tinggal substrat di dalam digester berkisar antara 15-30 hari, sedangkan pada kondisi thermophilik digester dioperasikan pada suhu 55°C dan masa tinggal substrat di dalam digester berkisar antara 12-14 hari (Singh and Prerna, 2009). Sementara itu menurut Ward *et al.* (2010), bahwa digester biogas yang beroperasi pada temperatur thermophilik dengan substrate manure babi tanpa kombinasi dengan substrat yang lain menggunakan *hydraulic retention time* (HRT) atau masa tinggal substrat pada suatu sistem digester yang kontinyu yang relatif pendek yaitu sekitar 12 hari.

## **Laminaria digitata sebagai Co-Substrat dengan Manure Sapi Perah pada Digester Biogas**

Pemanfaatan makro alga *Laminaria digitata* sebagai co-substrat pada digester kontinyu pada skala laboratorium telah diinvestigasi oleh Sarker *et al.* (2014) yang mengevaluasi penggunaan *Laminaria digitata* sebagai co-substrat dengan manure sapi perah baik dalam kondisi operasional mesophilik (35°C) maupun pada kondisi operasional thermophilik (50°C). Level substitusi manure sapi perah dengan *Laminaria digitata* sebesar 15, 24 dan 41% berbasis kandungan VS substrat. Pada digester yang dikondisikan pada temperatur mesophilik (35°C) dengan substitudi manure sapi perah dengan alga *Laminaria digitata* sebesar 24%, produksi metan meningkat sebesar 19% per satuan berat substrat. Parameter yang lain seperti total VFA dan pH dari keluaran slurry menunjukkan bahwa digester biogas tersebut dapat berfungsi dengan baik. Namun demikian ketika level substitusi dinaikkan hingga 41% (berbasis VS substrat) terjadi kenaikan produksi total VFA dan kenaikan produksi metan tidak linear lagi dengan peningkatan konsentrasi *Laminaria digitata* bahkan pada hari ke-21 setelah peningkatan konsentrasi alga ini terjadi peningkatan yang cukup drastis pada konsentrasi propionat yang mengindikasikan terjadinya inhibisi akibat penggunaan alga yang terlalu tinggi.

Pada digester yang dioperasionalkan pada suhu 50°C, pada level substitusi manure sapi perah dengan *Laminaria digitata* sebesar 24% (berbasis kandungan VS substrate) terjadi peningkatan produksi metan sebesar 39% per berat substrat dibandingkan dengan digester kontrol yang hanya menggunakan manure sapi perah sebagai substratnya. Namun demikian ketika level *Laminaria digitata* dinaikkan menjadi 41% terjadi fenomena yang sama dengan digester yang dioperasikan pada kondisi mesophilik, yaitu terjadi peningkatan konsentrasi

propionat yang sangat mencolok dan kejadian ini merupakan pertanda bahwa kondisi digester biogas tidak dalam kondisi yang sehat (Sarker *et al.*, 2014). Kondisi ini bisa disebabkan akibat kandungan bahan organik pada substrate yang terlalu banyak atau karena adanya peningkatan konsentrasi bahan-bahan inhibitor yang berasal dari substrat yang terakumulasi di dalam digester biogas.

Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Laminaria digitata* sangat potensial untuk dapat digunakan sebagai co-substrat dengan manure sapi perah. Walaupun produksi metan dari *Laminaria digitata* pada kisaran produksi manure sapi perah yaitu sebesar 281 L CH<sub>4</sub>/Kg VS (Sutaryo *et al.*, 2012) sedangkan produksi metan pada *Laminaria digitata* utamanya dari perlakuan kontrol yang dihasilkan dari penelitian ini sebesar 203,99 CH<sub>4</sub>/Kg VS. Namun jenis alga ini sangat potensial untuk dapat meningkatkan produksi metan per ton berat substrat segar. Hal ini mengingat *Laminaria digitata* mempunyai kandungan VS yang lebih tinggi daripada kandungan VS pada manure ternak sapi. Manure sapi khususnya dengan sistem perkandangan yang diterapkan Eropa di mana urine, tumpahan air minum dan sisa-sisa pakan bergabung menjadi satu sehingga limbahnya berbentuk slurry manure yang dihasilkan mempunyai kandungan VS berkisar antara 7-9% (Angelidaki and Ellegaard, 2003), sedangkan *Laminaria digitata* dari hasil perhitungan pada penelitian ini mempunyai kandungan VS sebesar 12%.

### **KESIMPULAN**

Perlakuan pemanasan pada temperatur rendah (70°C) selama 4, 8 dan 16 jam pada *Laminaria digitata* tidak memberikan efek positif terhadap total produksi metan, namun demikian pre-treatment ini dapat meningkatkan laju produksi metan diawal masa inkubasi. Adanya fenomena ini menggambarkan bahwa perlakuan pre-treatment ini dapat memberikan efek positif apabila substrat

yang telah mengalami pre-treatment digunakan sebagai co-substrat pada digester biogas model kontinyu mengingat pada digester tersebut masa tinggal substrat di dalam digester relatif singkat. Walaupun produksi metan *Laminaria digitata* di bawah produksi metan manure sapi per berat bahan organik yang sama, namun alga jenis ini berpotensi untuk dapat digunakan sebagai co-substrat dengan manure sapi perah dan dapat digunakan untuk meningkatkan produksi metan per ton substrat. Hal ini dikarenakan *Laminaria digitata* pada berat segar yang sama mempunyai kandungan bahan organik yang lebih tinggi dibanding manure sapi perah. Dengan demikian *Laminaria digitata* berpotensi untuk digunakan sebagai substrat digester biogas.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Angelidaki, I., Ellegaard, L. (2003). Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 109, 95–105.
- Bruni, E., Jensen, A.P., Angelidaki, I. (2010). Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresour. Technol.* 101, 8713-8717
- Gomez, K.A., dan Gomez, A.A. (2007). *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. UI-Press, Jakarta.
- Hidalgo, D., Sastre, E., Gómez, M., Nieto, P. (2012). Evaluation of pretreatment processes for increasing biodegradability of agrofood wastes. *Environ. Technol.* 33, 1497–1503.
- Menardo, S., Balsari, P., Dinuccio, E., Gioelli, F. (2011). Thermal pre-treatment of solid fraction from mechanically-separated raw and digested slurry to increase methane yield. *Bioresour. Technol.* 102, 2026-2036.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fraction of manure. *Biomass Bioenergy* 26, 485–495.
- Møller, H.B., Moset, V, Brask, M., Weisbjerg, M.R., Lund, P. (2014). Feces composition and manure derived methane yield from dairy cows: Influence of diet with focus on fat supplement and roughage type. *Atmospheric Environment.* 94, 36-43.
- Müller, J. A. (2000). Pretreatment processes for the recycling and reuse of sewage sludge. *Water Sci. Technol.* 42, 167-174
- Nielsen, H.B., and Heiske, S., (2011). Anaerobic digestion of macroalgae: methane potentials, pre-treatment, inhibition and co-digestion. *Water Sci. Technol.* 64 (8), 1723-1729.
- Park ,W.J., Ahn, J.H. (2011). Optimization of microwave pretreatment conditions to maximize methane production and methane yield in mesophilic anaerobic sludge digestion. *Environ. Technol.* 32, 1533–1540.
- Rico, C. García, H. Rico, J.L. Fernández, J. Renedo, J. (2009). Evolution of composition of dairy manure supernatant in a controlled dung pit. *Environ. Technol.* 30, 1351–1359.
- Sarker, S., Møller, H.B., Bruhn, A. (2014). Influence of variable feeding on mesophilic and thermophilic co-digestion of *Laminaria digitata* and cattle manure. *Energy Convers. Manag.* 87, 513-520.

- Singh, S.P., and Prerna, P. (2009). Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1569–1575.
- Sutaryo, S., Ward, A.J., Møller, H.B. (2012). Thermophilic anaerobic co-digestion of separated solids from acidified dairy cow manure. *Bioresour. Technol.* 114, 195-200.
- Sutaryo, Ward, A.J., Møller, H.B. (2014). The Effect of Low-Temperature Thermal Pre-Treatment on Methane Yield of Pig Manure Fractions. *J. Anim. Production*. In press.
- Ward, A. J. Møller, H.B. Raju, C.S. (2010). Extreme thermophilic pre-treatment of manures for improved biogas production. In: *Proceeding 14<sup>th</sup> Ramiran international conference*. Lisboa. September 2010.