

**PENGARUH KONSENTRASI GULA DAN *Enterobacter aerogenes* ADH43
PADA PRODUKSI BIOHIDROGEN DARI LIMBAH PADAT TAPIOKA
(ONGGOK) DENGAN METODE *SEPARATE HYDROLYSIS
FERMENTATION* (SHF)**

Anggi Mopri Sahata Siregar

Fakultas Teknobiologi
anggi.siregar@gmail.com

Tjandra Pantjajani

Fakultas Teknobiologi
tjandra@staff.ubaya.ac.id

Yusnita Liasari

Fakultas Teknobiologi
yusnita@staff.ubaya.ac.id

Abstrak - Biohidrogen adalah salah satu sumber energi terbarukan yang menjanjikan karena merupakan sumber energi yang ramah lingkungan. Onggok merupakan limbah padat industri tepung tapioka yang memiliki kandungan pati sebesar 65,4% dari berat totalnya. Proses hidrolisis pati menggunakan enzim α -amilase dan glucoamilase untuk menghasilkan glukosa. Selanjutnya glukosa dapat digunakan oleh bakteri penghasil hidrogen sebagai substrat fermentasi untuk memproduksi biohidrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi onggok sebagai substrat, pengaruh konsentrasi gula dari hidrolisat onggok, dan *Enterobacter aerogenes* ADH43 untuk menghasilkan yield biohidrogen/glukosa paling tinggi dengan menggunakan metode *Separate Hydrolysis Fermentation* (SHF). Onggok digiling dan diayak sehingga menghasilkan tepung onggok berukuran 140 mesh. Tepung onggok ini kemudian digelatinasi pada suhu 90-100⁰C dan selanjutnya diliquifaksi dengan menggunakan enzim α -amilase. Hasil liquifaksi berupa bubur disakarifikasi dengan menggunakan enzim glucoamilase selama 48 jam, kemudian ditambahkan substrat lalu disterilisasi pada suhu 110⁰C dan tekanan 1,5 atm selama 10 menit. Media hasil sterilisasi ini difermentasi dengan menggunakan *Enterobacter aerogenes* ADH43. Variabel dalam penelitian ini adalah konsentrasi gula dari hidrolisat onggok sebesar 1,5%; 3,0%; dan 4,5% (b/v%) dan *Enterobacter aerogenes* ADH43 sebesar 5%, 10%, dan 15% (v/v%). Yield biohidrogen/glukosa paling tinggi didapat dari variasi konsentrasi gula dari hidrolisat onggok 3,0% dengan konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 10%, yaitu sebesar 2,8317.

Kata kunci : biohidrogen, onggok, *Enterobacter aerogenes* ADH43, *Separate Hydrolysis Fermentation* (SHF).

Abstract – Biohydrogen is one of the promising renewable energy sources because it could be categorized as an eco-friendly energy sources. Onggok is solid waste material from tapioca flour industry which containing 65,4% starch from its total mass. Starch is hydrolysed by α -amylase and glucoamilase to produce glucose. Furthermore, glucose can be used by hydrogen producing bacteria as the

fermentation substrate to produce biohydrogen. The purposes of this research were to identify the potential of onggok as the fermentation substrate and the effect of initial sugar as well as *Enterobacter aerogenes* ADH43 in producing the highest yield biohydrogen/glucose using Separate Hydrolysis Fermentation (SHF) method. Onggok was milled and sieved to produce 140 mesh size onggok flour. Onggok flour was gelatinized at 90-100⁰C and then liquefied by adding α -amylase enzyme for 2 hour. The resulted slurry was used in saccharification process by adding glucoamylase for 48 hour. Saccharification result was sterilized on 110⁰C; 1,5atm for about 10 minutes. The sterilized media was then fermented by *Enterobacter aerogenes* ADH43. The variables on this research were concentration of initial sugar from hydrolysed onggok 1,5%; 3,0%; and 4,5% (b/v%) and *Enterobacter aerogenes* ADH43 5%, 10% dan 15% (v/v%). The highest yield biohydrogen/glucose was 2,8317 which was produced from combination of 3,0% initial sugar concentration from hydrolysed onggok with 10% *Enterobacter aerogenes* ADH43 in the production process.

Keywords : biohydrogen, onggok, *Enterobacter aerogenes* ADH43, Separate Hydrolysis Fermentation (SHF).

PENDAHULUAN

Energi menjadi komponen penting bagi kelangsungan hidup manusia karena hampir semua aktivitas kehidupan manusia sangat tergantung pada ketersediaan energi yang cukup. Beberapa tahun ke depan, manusia masih akan tergantung pada sumber energi fosil karena sumber energi fosil inilah yang mampu memenuhi kebutuhan energi manusia dalam skala besar. Sedangkan sumber energi alternatif/terbarukan belum dapat memenuhi kebutuhan energi manusia dalam skala besar karena fluktuasi potensi dan tingkat ekonomis yang belum bisa bersaing dengan energi konvensional. Selama ini, dalam pemanfaatan energi fosil untuk memenuhi kebutuhan tanpa disadari menyisakan sejumlah persoalan terhadap perubahan iklim global, kerusakan lingkungan, dan masalah kesehatan (Bockris, 2002). Oleh karena itu, perlu dikembangkan sumber energi alternatif. Salah satu sumber energi alternatif yang sampai saat ini belum mendapat perhatian khususnya di Indonesia adalah biohidrogen (Ren, *et al.*, 2009).

Hidrogen diproyeksikan oleh banyak negara akan menjadi bahan bakar masa depan yang ramah lingkungan dan lebih efisien. Dimana suplai energi yang dihasilkan sangat bersih karena hanya menghasilkan uap air sebagai emisi selama berlangsungnya proses, dan tidak disertai karbon dioksida maupun karbon

monoksida. Selain itu, keunggulan dari hidrogen adalah kalor pembakaran hidrogen (120 MJ/kg) yang lebih tinggi dari kalor pembakaran batu bara (15-19 MJ/kg) (Vijayaraghavan & Soom, 2006).

Hidrogen dapat diproduksi melalui proses kimia-fisik dan biologi. Secara biologis, gas hidrogen dapat diproduksi dengan fotosintetis dan fermentatif yang menghasilkan produk akhir gas hidrogen yang ramah lingkungan dan lebih menguntungkan karena dapat berproduksi cepat dan mudah walaupun tidak membutuhkan energi yang besar dalam prosesnya dibandingkan proses elektrokimia. Selain itu, produksi gas hidrogen secara fermentasi lebih menguntungkan karena tetap dapat berproduksi walaupun tidak ada cahaya (Pattra *et al.*, 2008). Berdasarkan jenis prosesnya, yang memiliki kelebihan paling baik dalam proses produksi biohidrogen adalah fermentasi menggunakan mikroorganisme secara non-fotosintetik atau *dark fermentation*. Kelebihan yang dimiliki dalam proses ini misalnya dapat memproduksi hidrogen tanpa membutuhkan cahaya matahari, substrat yang digunakan bervariasi dan tidak membutuhkan biaya besar (Das & Veziroglu, 2008).

Jika digunakan mikroorganisme anaerobik obligatif seperti *Clostridium spp.*, diperlukan zat untuk mengeluarkan oksigen dari reaktor seperti argon, nitrogen, dan sebagainya, sedangkan dari dalam media dapat digunakan HCl. Penggunaan *Enterobacter aerogenes* lebih menguntungkan karena tidak memerlukan bahan untuk mengeluarkan oksigen dari reaktor (Yokoi, *et al.*, 2001)

Jenis substrat yang biasa digunakan untuk fermentasi hidrogen adalah glukosa (Fang & Liu, 2002), sukrosa (Chung, *et al.*, 2007), pati (Akutsu, *et al.*, 2009) dan lignoselulosa (Qi Ren, *et al.*, 2010). Jenis substrat pati perlu dilakukan proses hidrolisis supaya dapat digunakan sebagai substrat untuk fermentasi biohidrogen. Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia maupun enzimatik. Salah satu enzim yang berperan dalam menghidrolisis pati menjadi glukosa adalah enzim amilase, terutama α -amilase dan glucoamilase (Richana, 2000).

Komposisi substrat dan media, temperatur, dan jenis serta konsorsium kultur mikroba juga merupakan parameter penting yang mempengaruhi lamanya fase lag (Kapdan & Kargi, 2006). Menurut Jo, *et al.* (2007), konsentrasi glukosa sebesar 118,06 mM (21,2508 g/L) merupakan kondisi optimum dalam produksi

biohidrogen menggunakan bakteri *Enterobacter aerogenes* ATCC29007. Dalam penelitian Jitwung (2010), penambahan inokulum *Enterobacter aerogenes* ATCC35029 sebesar 18% merupakan kondisi optimum dalam produksi biohidrogen menggunakan substrat berupa limbah yang mengandung gliserol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi gula dan *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dalam produksi biohidrogen dari limbah padat tapioka (onggok).

METODE PENELITIAN

Alat

Botol vial 125 ml, tutup karet, peralatan gelas, *filler*, pipet ukur, pipet mikro, ayakan, kompor listrik, *water bath*, lemari asam, oven, autoklaf, timbangan digital, *vorteks*, *hot plate stirrer*, pH meter, spektrofotometer, *Electric Bacteria Colony Counter*, respirometer, crammer, CTR room, dan *laminar air flow cabinet*.

Bahan

- *Enterobacter aerogenes* ADH43 diperoleh dari Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), BPPT Pupiptek, Serpong, Tangerang, Banten.
- Onggok diperoleh dari perusahaan tepung tapioka di Kajen, Margoyoso, Pati, Jawa Tengah.
- Enzim α -amilase (133 KNU/g) dan glukoamilase (400 AGU/g) dari Laboratorium Teknologi Bioproses dan Proses Lingkungan Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Surabaya dari Novozymes, Jakarta.
- Bahan kimia yang digunakan untuk media kompleks selektif adalah Glukosa, Pepton, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.
- NA (*Nutrient Agar*) dan media kompleks selektif dengan agar untuk media stok serta NB (*Nutrient Broth*) dan media kompleks selektif untuk media pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH 43.
- Bahan analisa yang digunakan adalah (1) uji total gula (metode *acid phenol*) yaitu fenol 5%, dan H_2SO_4 pekat (2) uji gula reduksi (metode DNS) yaitu

asam dinitrosalisilat 1% dan kalium natrium tartrat 40% (3) uji pati (metode kolorimetri) yaitu iodin.

- Bahan untuk pembuatan kurva standar (1) uji total gula yaitu sukrosa (2) uji gula reduksi yaitu glukosa (3) uji pati yaitu pati.
- Bahan untuk pembuatan larutan pengatur pH yaitu NaOH 1N dan HCl 1N.
- Bahan untuk respirometer NaCl dan Ca(OH)₂.
- Bahan habis pakai lainnya adalah etanol 70%, spiritus, aluminium foil, akuades, kapas, cover glass, tip, kuvet, dan segel aluminium.

Variasi Percobaan

Tabel 1 menunjukkan variasi yang dilakukan dalam penelitian ini.

Tabel 1 Variasi Percobaan

		Konsentrasi <i>Enterobacter aerogenes</i> ADH43 (v/v%)		
		5	10	15
Konsentrasi Hidrolisat onggok (b/v%)	1,5	Variasi ke-1	Variasi ke-2	Variasi ke-3
	3	Variasi ke-4	Variasi ke-5	Variasi ke-6
	4,5	Variasi ke-7	Variasi ke-8	Variasi ke-9

Pembuatan Tepung Onggok

Onggok yang sudah kering digiling halus menggunakan gilingan tepung hingga menjadi serbuk onggok. Serbuk onggok diayak dengan ayakan 140 mesh supaya menghasilkan tepung onggok 140 Mesh. Tepung onggok 140 Mesh ini kemudian dilakukan analisa kadar pati, gula total, dan gula reduksi.

Hidrolisis Onggok

1. Proses Gelatinasi

Sebanyak 15 gram tepung onggok 140 mesh ditambahkan akuades sebanyak 100 ml. Campuran diaduk sampai rata. Kemudian campuran dipanaskan pada suhu 90°C-100°C selama 30 menit atau hingga teksturnya menyerupai *gelatin*.

2. Proses Liquifaksi

Hasil gelatinisasi didinginkan hingga suhunya mencapai 80-85°C. Kemudian dilakukan pengaturan pH hingga pH 5 dengan penambahan HCl 1N. Setelah itu ditambahkan enzim α -amilase sebanyak 2 μ l/100 ml media onggok. Suhu dijaga pada 80-85°C selama 120 menit.

3. Proses Sakarifikasi

Bubur hasil liquifikasi diatur pH-nya sampai pH 4.3 dengan penambahan HCl 1N. Kemudian ditambahkan enzim glukoamilase dengan konsentrasi 20 μ L/100 ml. Proses ini dilakukan pada suhu 60-61°C selama 48 jam. Sirup hasil sakarifikasi dilakukan analisa kadar pati, gula total, dan gula reduksi.

Pembuatan Kultur Starter

1. Pembuatan Media *Pre-culture*

Media *Pre-culture* mengandung 1,5% glukosa; 0,5% pepton; 1,4% Na₂HPO₄; 0,6% KH₂PO₄; 0,2% (NH₄)₂SO₄; 0,1% C₆H₈O₇.H₂O; dan 0,02% MgSO₄.7H₂O (b/v%) dilarutkan dalam akuades, pH ditetapkan menjadi 6,8. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media steril dan bersuhu \pm 37°C siap digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

2. Pembuatan *Pre-culture E. aerogenes* ADH 43

Dari stok kultur *Enterobacter aerogenes* ADH 43 diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan dalam 9 ml media *pre-culture* steril untuk pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH 43. Selanjutnya media yang telah berisi 1 ose bakteri diinkubasi pada suhu 37°C dengan *shaker* 120 rpm selama 13 jam. Kultur awal (*pre-culture*) siap digunakan.

3. Pembuatan Media *Starter*

Media *starter* mengandung 0,5% pepton; 1,4% Na₂HPO₄; 0,6% KH₂PO₄; 0,2% (NH₄)₂SO₄; 0,1% C₆H₈O₇.H₂O; dan 0,02% MgSO₄.7H₂O (b/v%) dan ditambahkan 2% hidrolisat onggok (v/v%). Media tersebut diset pH hingga 6,8 dengan penambahan HCl 1N sebelum diautoklaf pada 121°C selama 15 menit. Media starter ini dibuat sebanyak 81 ml. Media yang sudah bersuhu \pm 37°C siap digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

4. Pembuatan Kultur Starter *E. aerogenes* ADH 43

Kultur awal (*pre-culture*) yang siap digunakan diinokulasi dalam 81 ml media *starter* steril untuk pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH 43. Selanjutnya media yang telah berisi 9 ml kultur awal (*pre-culture*) diinkubasi pada suhu 37°C dengan *shaker* 120 rpm selama 9 jam (awal fase *stationer*).

Produksi Biohidrogen

1. Persiapan Media Fermentasi

Volume akhir sebelum fermentasi, setelah penambahan inokulum dibuat sebanyak 60 ml. Adapun komposisi media fermentasi ini antara lain hidrolisat onggok dengan variasi konsentrasi 1,5; 3; dan 4,5 (b/v%) dan media *pre-culture*. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Awal Fermentasi

Media fermentasi yang telah disterilisasi ditambahkan kultur starter dengan variasi konsentrasi 5, 10, dan 15 (v/v%). Fermentor yang digunakan adalah botol kaca kapasitas 125 ml yang dilengkapi dengan tutup karet dan segel aluminium.

Dari 60 ml media fermentasi diambil 10 ml untuk pengukuran yang dilakukan antara lain jumlah sel (metode Angka Lempeng Total *Pour-Plate*), pH menggunakan pH meter, kadar total gula (metode *acid phenol*), dan kadar gula reduksi (metode DNS), sehingga hanya tersisa 50 ml di botol fermentasi.

Sebelum ditutup dengan tutup karet, mulut botol dipanaskan agak lama di dekat api untuk mengusir oksigen di dalam botol. Kemudian disegel dengan segel aluminium inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan shaker berkecepatan 120 rpm selama 24 jam.

3. Akhir Fermentasi

Setelah 24 jam inkubasi selesai, dilakukan pengukuran volume H₂ terlebih dahulu menggunakan respirometer. Kemudian botol dibuka segel dan tutup karetnya untuk pengujian jumlah sel (metode Angka Lempeng Total *Pour-Plate*), pH menggunakan pH meter, kadar total gula (metode *acid phenol*), dan kadar gula reduksi (metode DNS).

Pengukuran yang Dilakukan

1. Jumlah Sel (Metode Angka Lempeng Total *Pour-Plate*)

Dilakukan resuspensi dan ambil 1 ml sampel perlakuan. Serial pengenceran dilakukan menggunakan 9 ml pelarut (minimal 3 seri pengenceran). Dari tiap seri pengenceran diambil 1 ml, lalu dimasukkan ke cawan petri steril dan ditambahkan media tumbuh agar steril yang masih cair untuk dilakukan teknik *pour-plate* dan dibiarkan agar menjadi memadat. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 48 jam dan jumlah CFU dihitung menggunakan *colony counter* dan dicatat hasilnya untuk tiap seri pengenceran. Dari data tersebut, perkiraan jumlah sel dapat dihitung sesuai ketentuan TPC.

Setelah inkubasi, dilakukan perhitungan jumlah sel bakteri yang berjumlah 30-300. Jumlah bakteri yang terhitung dimasukkan dalam rumus untuk mendapatkan nilai log CFU/ml

$$\log \text{CFU/ml} = \text{pangkat pengenceran} + \log \text{jumlah sel yang terhitung}$$

2. pH Menggunakan pH Meter

pH meter dikalibrasi dan selanjutnya elektroda pH meter tersebut dicelupkan ke dalam larutan sampel yang ingin diukur nilai pH-nya. Kemudian nilai pH dari larutan sampel akan tertera pada monitor pH meter tersebut.

3. Kadar Total Gula (Metode *Acid Phenol*)

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 ml fenol 5% dan dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan 5 ml asam sulfat pekat dan dihomogenkan. Campuran dibiarkan hingga mencapai suhu ruang dan kemudian dihomogenkan lagi untuk selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 488 nm. Hasil absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan garis kurva standar untuk mengetahui kadar total gula dalam sampel.

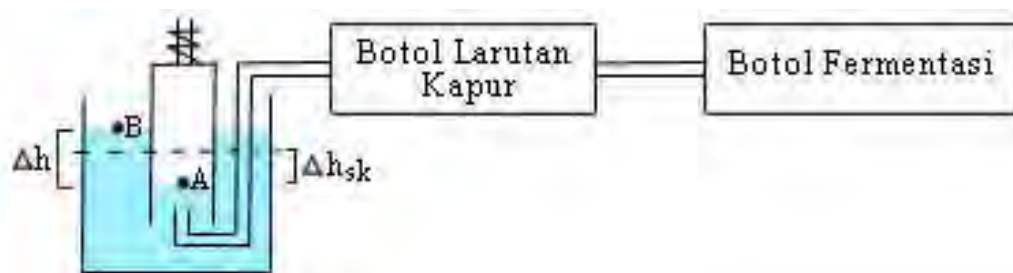
4. Kadar Gula Reduksi (Metode DNS)

Sebanyak 3 ml larutan reagen DNS dimasukkan ke dalam 3 ml sampel yang ada di tabung reaksi. Campuran larutan dipanaskan sampai pada suhu 90°C selama 5-15 menit hingga larutan berwarna merah-coklat. Sebanyak 1 ml larutan kalium natrium tartat 40% ditambahkan untuk menstabilkan warna. Larutan didinginkan sampai suhu kamar. Absorbansi diukur menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 575 nm. Hasil absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan garis kurva standar untuk mengetahui kadar gula reduksi dalam sampel.

5. Pengukuran Volume H₂ yang Terbentuk Menggunakan Respirometer

Untuk mengukur volume hidrogen yang terbentuk, selang respirometer dihubungkan dengan lubang pada bagian atas fermentor. Volume H₂ yang terbentuk ditunjukkan oleh perbedaan volume larutan NaCl antara silinder dalam (silinder kecil) dengan silinder luar (silinder besar) pada respirometer.



Gambar 1 Rangkaian Respirometer yang Digunakan dalam Penelitian

6. Analisa Pati (Metode Kolorimetri)

Sebanyak 50 µl larutan iodine ditambahkan ke dalam 1 ml sampel dan dilakukan vortex. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm (Yazid & Nursanti, 2006). Hasil absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan garis kurva standar untuk mengetahui kadar pati dalam sampel.

Analisa Data

Analisis dan pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji ANOVA *Two way* untuk mengetahui efek dari dua faktor pada variabel dependen dan interaksi antar level yang berbeda pada dua faktor tersebut (Thomas, 2003). Untuk melakukan uji ANOVA *two way* perlu dilakukan dahulu uji normalitas dan homogenitas.

Jika kelompok-kelompok populasi tidak memiliki distribusi yang identik maka dilanjutkan dengan uji *multiple comparison* dengan metode *Tukey* untuk mengetahui kelompok yang berbeda.

Uji Kruskal-Wallis dilakukan jika data dari populasi tidak memenuhi uji normalitas dan homogenitas. Kemudian uji dilanjutkan dengan uji Mood's Median untuk mengetahui kelompok yang berbeda (Thomas, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa Kadar Gula Total, Pati, dan Gula Reduksi dalam Tepung Onggok dan Hidrolisat Onggok

Analisa ini perlu dilakukan untuk mengetahui apakah terjadi proses hidrolisis gula pada pati yang terkandung dalam tepung onggok menjadi glukosa oleh enzim α -amilase dan glukoamilase. Glukosa inilah yang nantinya digunakan oleh *Enterobacter aerogenes* ADH43 untuk memproduksi biohidrogen.

Tabel 2 Hasil Analisa Kadar Gula Total, Pati, dan Gula Reduksi

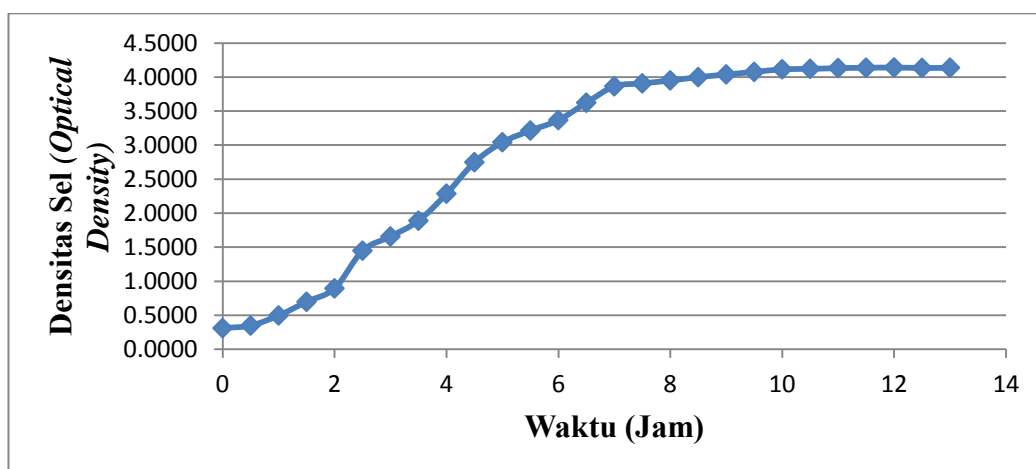
	Kadar Gula Total (g/L)	Kadar Pati (g/L)	Kadar Gula Reduksi (g/L)
Tepung Onggok	106,3399 ± 1,5540	96,9333 ± 2,2069	1,5198 ± 0,0200
Hidrolisat Onggok	108,6275 ± 2,6404	15,2600 ± 2,1103	91,5333 ± 1,2172

Tabel 2 menunjukkan onggok yang digunakan dapat dijadikan substrat pada fermentasi biohidrogen karena kandungan pati dalam onggok cukup tinggi yaitu sebesar 96,9333 ± 2,2069 g/L. Kadar gula total meningkat ± 2 g/L, angka kadar pati menurun ± 81 g/L, dan angka kadar gula reduksi meningkat ± 90 g/L setelah proses hidrolisis. Hal ini menunjukkan hidrolisis terjadi terlihat dari menurunnya kadar pati dan meningkatnya kadar gula reduksi yang merupakan hasil dari hidrolisis. Hidrolisat onggok yang didapat dapat dijadikan substrat pada fermentasi biohidrogen karena kandungan gula reduksi dalam hidrolisat onggok cukup tinggi yaitu sebesar 91,5333 ± 1,2172 g/L. Glukosa yang terkandung dalam hidrolisat onggok inilah yang nantinya menjadi substrat fermentasi biohidrogen oleh *Enterobacter aerogenes* ADH43.

Pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam Media *Pre-culture* dan dalam Media *Starter*

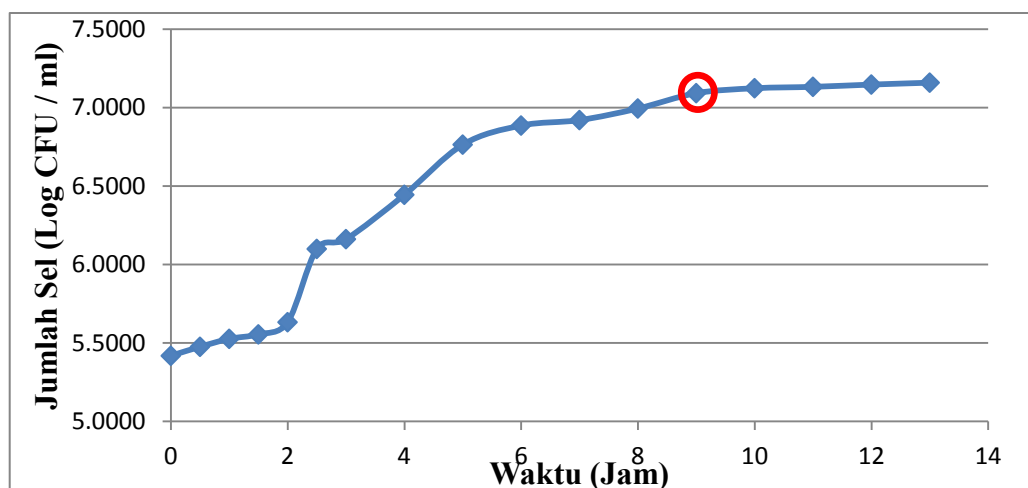
Gambar 2 menunjukkan pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH 43 dalam media *pre-culture*. *Enterobacter aerogenes* ADH43 mengalami fase lag

pada 0 – 2 jam, fase eksponensial terjadi pada jam ke 3 – 9, dan setelah itu memasuki fase stationer.



Gambar 2 Pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam Media Pre-culture

Gambar 3 menunjukkan pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH 43 dalam media starter. Fase lag pada 0 – 2 jam, fase eksponensial pada jam ke 3 – 9, dan setelah itu memasuki fase stationer. *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam media starter pada jam ke-9 akan dijadikan inokulum untuk media fermentasi karena pada jam tersebut merupakan awal fase stationer.



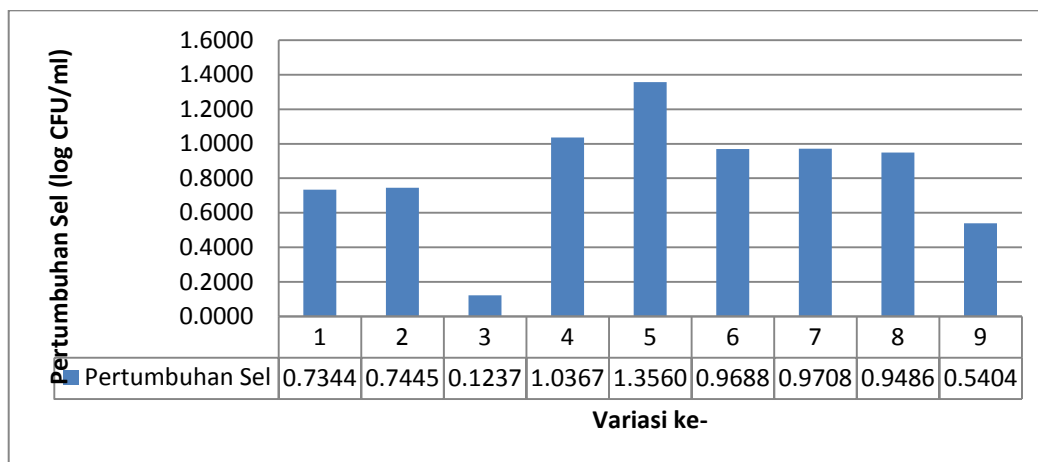
Gambar 3 Pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam Media Starter

Produksi Biohidrogen oleh *Enterobacter aerogenes* ADH43 dalam Media Fermentasi dengan Penambahan Hidrolisat Onggok

1. Pertumbuhan Sel

Gambar 4 menunjukkan pertumbuhan sel yang terukur pada Angka Lempeng Total (ALT) dengan metode *pour-plate*. Pertumbuhan sel dihitung

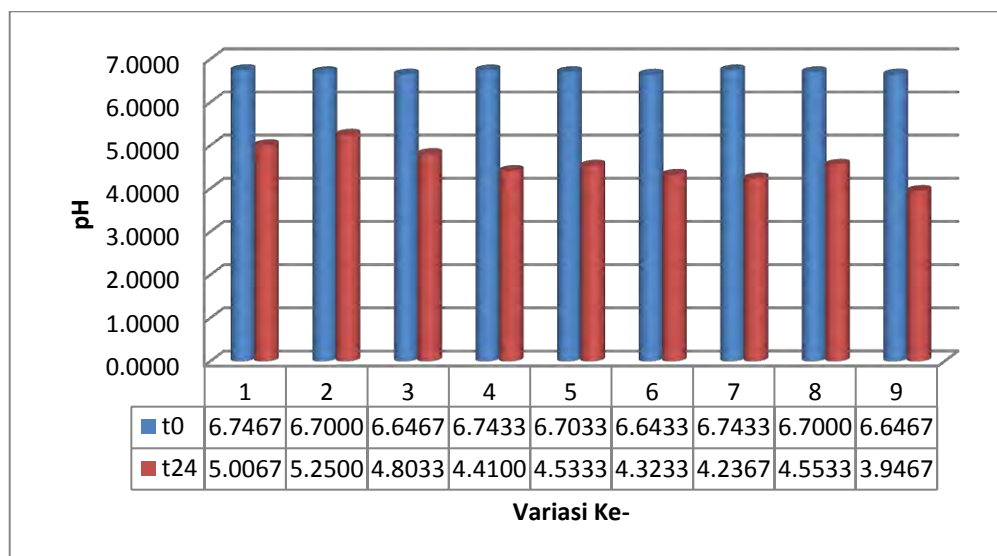
dengan cara menghitung selisih jumlah sel awal fermentasi dengan jumlah sel akhir fermentasi.



Gambar 4 Pertumbuhan Sel

2. pH (Derajat Keasaman)

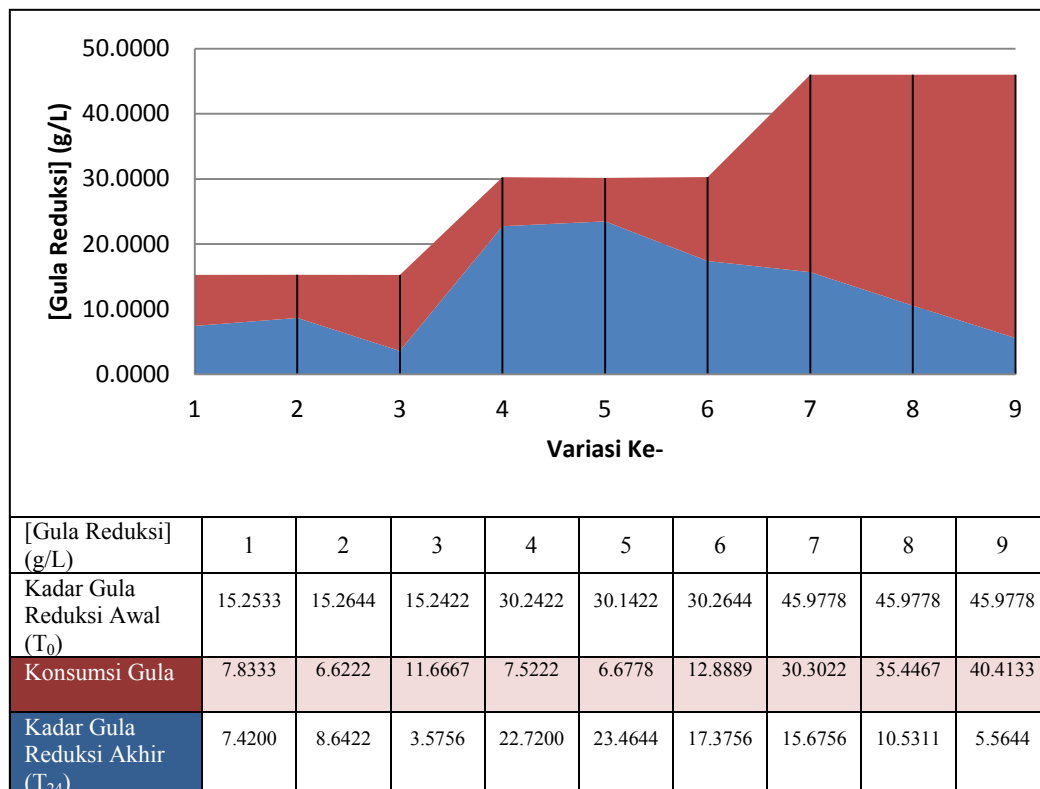
Gambar 5 menunjukkan nilai pH (derajat keasaman) pada awal fermentasi (t_0) dan akhir fermentasi (t_{24}). Terjadi penurunan nilai pH pada semua variasi. Hal ini menandakan terjadinya fermentasi yang ditandai dengan terbentuknya *by-product* berupa asam.



Gambar 5 pH (Derajat Keasaman) Awal Fermentasi (t_0) dan Akhir Fermentasi (t_{24})

3. Konsumsi Gula Reduksi

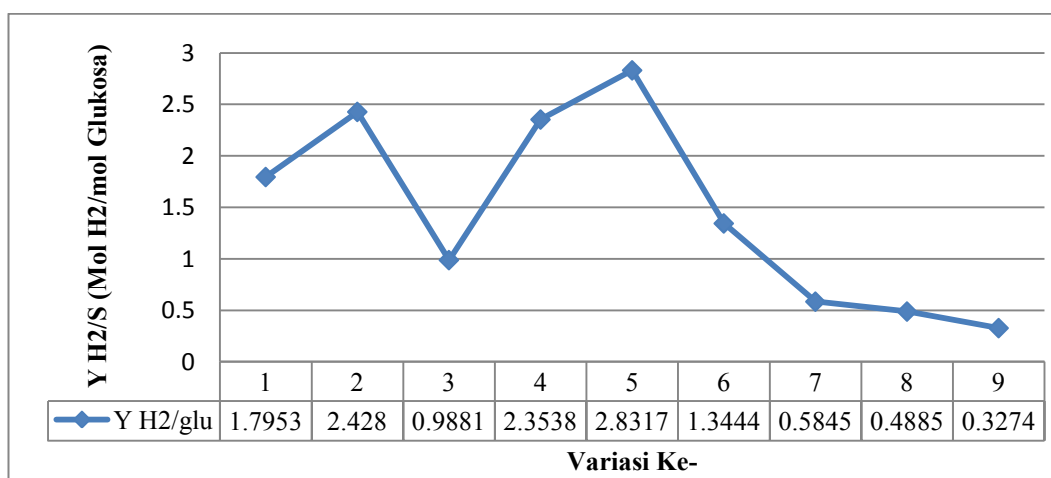
Konsumsi gula reduksi fermentasi didapatkan dengan cara mengurangkan kadar gula reduksi awal fermentasi dengan kadar gula reduksi akhir fermentasi setiap hasil penelitian. Gambar 6 menunjukkan konsumsi gula reduksi.



Gambar 6 Konsumsi Gula Reduksi

4. Yield Biohidrogen

Gambar 7 menunjukkan yield biohidrogen sebagai produk dibandingkan dengan substratnya (glukosa). Dalam hal ini mol biohidrogen yang didapatkan dari pengukuran selisih ketinggian cairan dalam silinder besar dan silinder kecil yang kemudian dimasukkan ke dalam persamaan rumus untuk mendapatkan mol biohidrogen yang terukur. Mol biohidrogen ini dibandingkan dengan mol glukosa dalam hal ini didapatkan dari massa konsumsi gula reduksi dibandingkan massa relatif.



Gambar 7 Yield Biohidrogen terhadap substrat (mol H₂/mol Glukosa)

Fermentasi biohidrogen tergantung pada beberapa faktor antara lain biakan, konsentrasi substrat, pH, suhu, sumber nutrisi, dan kondisi operasional bioreaktor (Alalayah, *et al.*, 2009). Konsentrasi optimum penambahan inokulum didapatkan berdasarkan hasil produk fermentasi secara maksimum. Titik optimum ini didapatkan saat bakteri tidak dapat mentoleransi lebih banyak produk fermentasi lagi di dalam lingkungannya. Karena itu ada batas konsentrasi inokulum maksimum tertentu dimana setelah itu produk fermentasi turun (Wyman, 1996).

Pada level konsentrasi gula dari hidrolisat onggok sebesar 1,5% menunjukkan pertumbuhan sel meningkat namun tidak signifikan seiring bertambahnya konsentrasi inokulum, namun pertumbuhan drastis menurun pada penambahan inokulum sebesar 15%. Hal ini mungkin dikarenakan penambahan substrat yang terlalu sedikit dengan inokulasi bakteri yang terlalu tinggi, sehingga terjadi kompetisi yang berlebihan dalam mengonsumsi substrat.

Pada level konsentrasi gula dari hidrolisat onggok sebesar 3% pertumbuhan sel meningkat secara signifikan seiring bertambahnya konsentrasi inokulum dan menurun pada konsentrasi inokulum sebesar 10-15%. Sedangkan pada level konsentrasi gula dari hidrolisat onggok sebesar 4,5% terjadi penurunan yang tidak signifikan seiring penambahan konsentrasi inokulum 5-10% kemudian terjadi penurunan yang signifikan pada 10-15%. Hal ini mungkin berkaitan erat dengan adanya inhibisi substrat maupun ketahanan sel. Asam asetat dapat masuk ke dalam membran plasma mengakibatkan akumulasi di dalam sitoplasma. Akibatnya energi untuk pertumbuhan sel terbagi untuk menjaga keseimbangan metabolisme internal sel (Lawford & Rousseau, 1993). Hal ini pula dapat menjelaskan mengapa pada penambahan substrat sebesar 4,5% pertumbuhan relatif tidak tinggi, namun memiliki konsumsi gula yang sangat tinggi.

Pada setiap level konsentrasi inokulum *Enterobacter aerogenes* ADH43 terlihat fenomena kenaikan pertumbuhan sel seiring penambahan konsentrasi hidrolisat onggok pada 1,5-3% namun menurun pada konsentrasi hidrolisat 3-4,5%. Pertumbuhan bakteri dan produksi gas hidrogen dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa karena adanya inhibisi di dalam substrat. Laju pertumbuhan

sel dan perolehan biohidrogen menurun dengan terjadinya penurunan pH (Kotay & Das, 2006).

Menurut Fang & Liu (2002), pertumbuhan sel yang terjadi bersesuaian dengan pembentukan gas hidrogen. Berdasarkan yield biohidrogen yang dihasilkan, variasi ke-5 adalah variasi yang memiliki yield biohidrogen tertinggi juga. Hal ini mendukung penarikan kesimpulan bahwa variasi ke-5 merupakan variasi terbaik untuk menghasilkan biohidrogen karena konsentrasi hidrolisat onggok sebesar 3% (b/v%) dengan konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 10% (v/v%) merupakan kondisi yang paling optimum dibandingkan variasi lainnya dalam menghasilkan biohidrogen.

Pada setiap level konsentrasi gula dalam hidrolisat onggok terlihat fenomena kenaikan pH akhir fermentasi (t24) seiring penambahan konsentrasi hidrolisat onggok pada 5-10% namun menurun pada konsentrasi hidrolisat 10-15%. Saat fermentasi, bakteri akan memproduksi juga produk sampingan berupa asam. Semakin tinggi jumlah bakteri, maka kemungkinan semakin banyak asam yang diproduksi yang menyebabkan penurunan pH. Pada pH rendah terlihat bahwa sedikit hidrogen yang terbentuk karena aktivitas bakteri penghasil hidrogen terhambat pada pH rendah dan menyebabkan beberapa asam lemak volatil (VFAs) terbentuk selama produksi hidrogen dan menyebabkan akumulasi asam lemak volatil (VFAs) yang semakin menyebabkan turunnya pH (Zhang, *et al.*, 2009).

Pada setiap level konsentrasi inokulum *Enterobacter aerogenes* ADH43 terlihat fenomena penurunan pH akhir fermentasi (t24) seiring penambahan konsentrasi hidrolisat onggok pada 1,5-4,5%. Hal ini mungkin menunjukkan bahwa produksi produk sampingan yang berupa asam semakin tinggi seiring kenaikan konsentrasi hidrolisat onggok.

Pada level konsentrasi gula 1,5% dan 3,0% konsumsi gula tidak berbeda signifikan pada inokulum 5% dan 10%, namun pada inokulum yang lebih tinggi (15%) terdapat kenaikan konsumsi gula reduksi. Hal ini seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa dalam kondisi inokulum yang tinggi, fermentasi terjadi lebih cepat dan lebih mengarah pada produksi produk sampingan yang berupa alkohol. Alkohol merupakan salah satu bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan sel dengan cara menghambat sintesis dinding sel,

menghambat keutuhan permeabilitas dinding sel, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein, sehingga perlu energi (konsumsi gula reduksi) yang lebih untuk digunakan sebagai pertahanan sel dibandingkan kondisi yang lebih seimbang antara substrat dan inokulum (Madigan & Martinko, 2006). Hal ini juga ditunjukkan pada level konsentrasi hidrolisat onggok 4,5%, konsumsi gula reduksi semakin tinggi seiring penambahan konsentrasi inokulum.

Pada setiap level konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 terlihat pada konsentrasi hidrolisat onggok sebesar 1,5% dan 3,0% tidak berbeda signifikan, namun meningkat pada penambahan konsentrasi hidrolisat onggok sebesar 4,5%. Jika dibandingkan dengan yield biohidrogen, pada variasi ke-7, ke-8, dan ke-9 ini memiliki yield yang relatif paling rendah di antara variasi lainnya. Hal ini mungkin dikarenakan konsumsi gula reduksi bukan mengarah ke produksi biohidrogen melainkan ke produk samping lain.

Konsumsi gula paling tinggi terdapat pada variasi ke-9. Di sisi lain variasi ke-9 ini memiliki pertumbuhan sel yang paling rendah namun dengan pH akhir yang paling rendah pula. Menurut Koskinen, *et al.* (2008), konsentrasi substrat dan laju penambahan substrat pada sistem kontinyu mempengaruhi metabolisme, aktivitas dan komposisi fermentasi. Penambahan substrat yang tinggi memungkinkan menurunkan produksi biohidrogen dan meningkatkan produksi pelarut seperti alkohol hal ini disebut inhibisi substrat dan rasio substrat/mikroorganisme (*food/microorganism*) yang tidak sesuai.

Menurut Pratiwi (2008), apabila konsentrasi nutrisi semakin tinggi, tidak selalu menyebabkan perombakan nutrisi tersebut. Hal ini berkaitan dengan aktifitas bakteri untuk menggunakan nutrisi yang tersedia. Jika mikroorganisme mempunyai kemampuan perombakan yang rendah dan berada pada konsentrasi substrat yang tinggi, maka laju perombakan akan diperlambat.

Menurut Rahman & Dewi (2009), terdapat peningkatan volume biohidrogen seiring dengan meningkatkannya konsentrasi gula substrat, sedangkan mengalami penurunan pada konsentrasi 3-5% gula. Konsentrasi gula awal berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan pembentukan biohidrogen. Pertumbuhan sel yang terjadi bersesuaian dengan pembentukan biohidrogen. Pada variasi ke-7 sampai variasi ke-9 yang mana memiliki level konsentrasi hidrolisat

onggok yang sama yaitu sebesar 4,5 % hidrolisat onggok secara statistik dinyatakan tidak beda signifikan dalam nilai yield biohidrogennya.

Analisa statistik yield biohidrogen, terlihat bahwa tidak ada beda signifikan antara variasi ke-7, ke-8, dan ke-9 yaitu pada level konsentrasi hidrolisat 4,5%. Hal tersebut memperkuat kemungkinan bahwa konsentrasi substrat yang ditambahkan berpengaruh pada produksi biohidrogen. Menurut Kapdan & Kargi (2006), konsentrasi substrat berlebih akan menyebabkan akumulasi VFAs. Jika dilihat yield biohidrogen dibandingkan glukosa untuk variasi ke-7 sampai ke-9, kemungkinan jalur metabolisme yang terjadi adalah bukan fermentasi biohidrogen melainkan produksi asam – asam organik. Hal ini yang memungkinkan konsumsi gula yang tinggi namun yield produk/substrat yang rendah. Menurut Kotay & Das (2006), konsentrasi gula berlebih dapat menghambat pembentukan hidrogen menunjukkan adanya inhibisi oleh substrat.

Yield biohidrogen/glukosa pada variasi ke-3, ke-6, dan ke-9 (inokulum *Enterobacter aerogenes* ADH43 15%) memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan variasi dengan konsentrasi inokulum 5% dan 10%. Hal ini mungkin dikarenakan, konsentrasi inokulum yang terlalu tinggi akan menghambat pertumbuhan sel yang berpengaruh pula pada produksi biohidrogen yang dihasilkan. Hal ini didukung pula pada pertumbuhan sel yang menunjukkan nilai lebih kecil dibandingkan variasi lain dalam level konsentrasi hidrolisat onggok yang sama.

Jika konsentrasi inokulum 5% dibandingkan dengan 10%, yield biohidrogen menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada inokulum 10% kecuali pada konsentrasi hidrolisat onggok sebesar 4,5% yang kemungkinan terjadi inhibisi oleh substrat. Sehingga ada kemungkinan produksi hidrogen bertambah seiring kenaikan konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43, namun menurun saat 10-15%. Hal ini mungkin karena semakin tinggi jumlah sel, dibutuhkan keseimbangan dengan substrat yang lebih untuk mencapai optimal.

Yield biohidrogen/glukosa didapatkan nilai paling tinggi pada variasi ke-5 sebesar 2.8317. Sehingga, variasi 3% konsentrasi hidrolisat onggok dengan 10% konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 merupakan variasi yang paling optimal dalam penelitian ini untuk memproduksi biohidrogen. Angka yield

biohidrogen ini berada di antara yield maksimal teoritis. Jika produk akhir berupa asam asetat, maka hasil akhir maksimal adalah 4 mol gas biohidrogen/mol glukosa. Sedangkan apabila hasil akhir berupa asam butirat, maka kemampuan maksimal hanya 2 mol gas biohidrogen/mol glukosa (Levin, *et al.*, 2004). Produksi biohidrogen juga dimungkinkan disertai dengan kombinasi fermentasi asam asetat dan asam butirat. Secara teori, 1 mol glukosa akan menghasilkan 2,67 mol gas biohidrogen/mol glukosa dengan rasio asam butirat dibandingkan asam asetat (B/A) adalah 1 (Karadag & Puhakka, 2010).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan hasil hidrolisis (hidrolisat) limbah padat tapioka (onggok) dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi biohidrogen oleh *Enterobacter aerogenes* ADH43 menggunakan metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Nilai yield meningkat seiring kenaikan konsentrasi gula 1,5-3%, namun menurun saat 3-4,5%. Nilai yield meningkat seiring kenaikan konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 5-10%, namun menurun saat 10-15%. Interaksi konsentrasi gula sebesar 3% (b/v%) dengan konsentrasi *Enterobacter aerogenes* ADH43 sebesar 10% (v/v%) memberikan pengaruh pada produksi biohidrogen dari limbah padat tapioka (onggok) menggunakan metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dengan menghasilkan nilai yield biohidrogen/glukosa paling tinggi yaitu 2.8317.

Sebagai saran, perlu dilakukan analisa gas hidrogen yang dihasilkan secara kuantitatif dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) sehingga dapat diketahui tingkat kemurniannya, perlu dilakukan optimasi penambahan gula dan *Enterobacter aerogenes* ADH43 yang dapat menghasilkan kadar biohidrogen optimum, perlu dilakukan optimasi waktu fermentasi untuk menghasilkan kadar biohidrogen optimum khususnya setelah 24 jam, dan perlu dilakukan penelitian dalam skala yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

Akutsu, Y., You Li, Y., Harada, H., & Qing Yu, H. (2009), 'Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from

- starch', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 34, pp. 2558 – 2566.
- Alalayah, W. M., Kalil, M. S., Kadhun, A. A. H., Jahim, J. M., Jaapar, S. Z. S., & Alauj, N. M. (2009), 'Bio-hydrogen Production Using a Two-Stage Fermentation Process', *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 12, pp. 1462 – 1467.
- Bockris, J. (2002), 'The Origin of Ideas on a Hydrogen Economy and Its Solution to the Decay of the Environment', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 27, pp. 1185 – 1193.
- Chung L. Y., Ming C. W., Hsiung H. C., Der C. S., & Shu C. J. (2007), 'Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria : feasibility and kinetic studies', *Water Research*, vol. 42, pp. 827 – 842.
- Das, D. & Veziroglu, N. (2008), 'Advances in Biological Hydrogen Production Processes', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, pp. 6046 – 6057.
- Fang, H. P. P. & Liu, H. (2002), 'Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by a Mixed Culture', *Bioresource Technology*, vol. 82, pp. 87 – 93.
- Jitrwung, R. (2010), 'Optimized Continuous Hydrogen Production by *Enterobacter aerogenes* from Glycerol – Containing Waste'. Thesis, Department of Chemical Engineering, McGill University, Quebec.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., Choe, W-S., Park, J. M. (2007), 'Optimization of Key Process Variables for Enhanced Hydrogen Production by *Enterobacter aerogenes* Using Statistical Methods', *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 2061 – 2066.
- Kapdan, K. I. & Kargi, F. (2006), 'Biohydrogen Production from Waste Materials', *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, pp. 569 – 582.
- Karadag, D. & Puhakka, J. A. (2010), 'Effect of Changing Temperature on Anaerobic Hydrogen Production and Microbial Composition in an Open-Mixed Culture Bioreactor', *International Journal Hydrogen Energy*, vol. 35, pp. 10954 – 10959.
- Koskinen, P. E. P, Lay, C-H., Beck, S. R., Tolvanen, K. E. S., Kaksonen, A. H., O'rlygsson, J., Lin, C-Y., & Puhakka, J. A. (2008) 'Bioprospecting Thermophilic Microorganisms from Icelandic Hot Springs for Hydrogen and Ethanol Production', *Energy Fuels*, vol. 22, pp. 134 – 140.
- Kotay, S. M. & Das, D. (2006), 'Microbial Hydrogen Production with *Bacillus coagulans* IIT-BTSl Isolated from Anaerobic Sewage Sludge', *Bioresource Technology*, vol. 98, pp. 1183 – 1190.
- Lawford, H. G. & Rousseau, J. D. (1993), 'Effect of pH and Acetic Acid on Glucose and Xylose Metabolism by a Genetically Engineered

- Ethanologenic *Escherichia coli*', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 39 – 40, pp. 301 – 322.
- Levin, B. D., Pitt, L., & Love, M. (2004), 'Biohydrogen Production : Prospects and Limitations to Practical Application', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 29, pp 173 – 185.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M., (2006), *Biology of Microorganism*. Prentice Hall : New Jersey.
- Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., & Reungsang, A. (2008), 'Bio-hydrogen Production from The Fermentation of Sugarcane Bagasse Hydrolysate by *Clostridium butyricum*', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, pp. 5256 – 5265.
- Pratiwi, A. S. (2008), 'Mutasi *Bacillus pumilus* dengan Mutagen EMS dan PSM Menggunakan Substrat Gliserol untuk Peningkatan Produksi Gas Hidrogen – Etanol'. Tesis, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Al Azhar Indonesia, Jakarta.
- Qi Ren, N., Fei Xu, J., Fang Gao, L., Xin, L., Qiu, J., & Xia Su, D. (2010), 'Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 35, pp. 2742 – 2746.
- Rahman, M. A. & Dewi, E. (2009), 'Inovasi Teknologi Biohidrogen dari Limbah Biomasa ke Energi Listrik dengan Teknologi *Fuel-Cell*', *Jurnal Teknik Lingkungan*, vol. 10, no. 3, hal. 319 – 327.
- Ren, Y., Wang, J., Liu, Z., & Li, G. (2009), 'Hydrogen Production from the Monomeric Sugars Hydrolyzed from Hemicellulose by *Enterobacter aerogenes*', *Renewable Energy*, vol. 34, pp. 2774 – 2779.
- Richana, N. (2000), 'Prospek dan Produksi Enzim Alfa-amilase dari Mikroorganisme', *Buletin AgroBio Jurnal Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian*, vol. 3, no. 2.
- Thomas, R. M. (2003), *Blending qualitative and quantitative research methods in theses and dissertations*, Thousand Oaks: Corwin, CA.
- Vijayaraghavan, K. & Soom, M. A. M. (2006), 'Trends in Biohydrogen Generation – a Review', *Environment Science*, vol. 3, pp. 255 – 271.
- Wyman, C. (1996), *Handbook on Bioethanol : Production and Utilization*, Taylor & Francis : Washington DC.
- Yokoi, H., Saitsu, A., Uchida, H., Hirose, J., & Hayashi, S. (2001), 'Microbiological Hydrogen Producton from Sweet Potato Strach Residue', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 99, pp. 58 – 63.
- Zhang, X., Wei, J., & Liu, Z-T. (2009), 'Biohydrogen Production from Starch Wastewater and Application in Fuel Cell', *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 35, pp. 2949 – 2952.