

**PENGARUH KONSENTRASI ONGGOK INDUSTRI TAPIOKA DAN UREA PADA
PRODUKSI BIOHIDROGEN MELALUI FERMENTASI GELAP**

**INFLUENCE OF CONCENTRATION ONGGOK TAPIOCA INDUSTRY AND UREA IN
BIOHYDROGEN PRODUCTION THROUGH DARK FERMENTATION**

Lailatul Maghfiroh* dan Ruidiana Agustini

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
State University of Surabaya*

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: lailatulmaghfiroh592@yahoo.co.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi onggok industri tapioka terhadap kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis dan pengaruh variasi konsentrasi urea terhadap kadar biohidrogen hasil fermentasi gelap. Untuk uji kadar glukosa, variasi konsentrasi onggok industri tapioka adalah 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Onggok dengan variasi konsentrasi selanjutnya dihidrolisis enzimatis, yaitu dengan menggunakan enzim campuran (α -amilase dan fiberzym). Uji kadar glukosa dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-somogyi. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ada pengaruh konsentrasi onggok industri tapioka terhadap kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis. Kadar glukosa optimum dihasilkan pada penggunaan onggok konsentrasi 35%, yakni sebesar 47,5%. Untuk uji kadar biohidrogen, variasi konsentrasi urea adalah 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Urea dengan variasi konsentrasi selanjutnya ditambahkan pada onggok yang menghasilkan kadar glukosa optimum, yaitu onggok konsentrasi 35%. Onggok yang telah ditambahkan urea selanjutnya difermentasi oleh bakteri *Enterobacter aerogenes* (proses fermentasi gelap). Uji kadar biohidrogen dilakukan menggunakan alat kromatografi gas. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ada pengaruh konsentrasi urea terhadap kadar biohidrogen hasil proses fermentasi gelap dari hidrolisat onggok industri tapioka. Kadar biohidrogen optimum dihasilkan pada penggunaan urea konsentrasi 3%, yakni sebesar 2,8997%.

Kata kunci: onggok industri tapioka, glukosa, urea, biohidrogen.

Abstract. This study aimed to determine influence of concentration variations onggok tapioca industry on enzymatic hydrolysis glucose levels and influence of concentration variation urea on biohydrogen levels through dark fermentation. To test glucose levels, concentration variations of onggok tapioca industry is 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, and 40%. Onggok with concentration variation hydrolyzed enzymatically using mixing enzymes (α -amylase and fiberzym). Glucose levels test is done by using Nelson-somogyi method. Statistical test results showed that there was influence of concentration onggok tapioca industry in enzymatic hydrolysis glucose levels. The optimum glucose levels resulted in using onggok tapioca industry concentration 35%, which is equal to 47.5%. To test biohydrogen levels, concentration variations of urea is 1%, 2%, 3%, 4%, and 5%. Urea added to the onggok tapioca industry in concentration 35%. Onggok which was added by urea subsequently fermented by *Enterobacter aerogenes* bacteria (dark fermentation). Biohydrogen level test performed using a gas chromatography. Statistical test results showed that there was influence of concentration urea in biohydrogen through dark fermentation process results from onggok tapioca industry hydrolyzate. The optimum biohydrogen levels resulted in using urea concentration 3%, which is equal to 2.8997%.

Keywords: onggok tapioca industry, glucose, urea, biohydrogen

PENDAHULUAN

Kebutuhan energi dunia hingga saat ini masih sangat bergantung pada ketersediaan bahan bakar fosil (batubara dan minyak bumi), padahal meningkatnya permintaan bahan bakar fosil menyebabkan terjadinya eksplorasi dan eksploitasi sumber energi tersebut serta dapat menyisakan sejumlah persoalan lingkungan, seperti perubahan iklim global dan kerusakan lingkungan [1]. Ketergantungan terhadap bahan bakar fosil dapat dibuktikan dari pernyataan PT. Pertamina (Persero) yang masih mengimpor minyak mentah untuk selanjutnya diolah di kilang sebesar 98,21 juta barel selama tahun 2012. Selain itu, Badan Pengatur Hilir Minyak dan Gas Bumi memperkirakan konsumsi bahan bakar minyak bersubsidi pada 2013 akan mencapai 49 juta kiloliter [2].

Semakin meningkatnya kebutuhan energi dan semakin menipisnya cadangan energi fosil membuat manusia berusaha untuk mencari energi alternatif baru, yaitu energi alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan. Dari sekian banyak energi alternatif, energi dari biomassa (bioenergi) terutama biohidrogen, menjadi fokus perhatian pengembang energi terbarukan. Menurut Boyles (1984), secara gravimetrik hidrogen memiliki densitas energi tertinggi dari semua jenis bahan bakar yang pernah dikenal. Gas ini memiliki kandungan energi tertinggi (143 GJton⁻¹) per unitnya, dapat disesuaikan dengan proses elektrokimia, dan satu-satunya bahan bakar yang secara kimia tidak terikat dengan karbon [1].

Produksi hidrogen dapat dilakukan melalui beberapa metode, seperti biofolisis langsung, biofotolisis tak langsung, foto-fermentasi, dan fermentasi gelap [3]. Menurut Beneman (1996), diantara metode tersebut yang paling menjanjikan dan ramah lingkungan adalah produksi hidrogen menggunakan metode fermentasi gelap dari limbah organik, karena metode ini menggabungkan proses produksi hidrogen dengan pengolahan limbah [4].

Bumi memiliki pasokan biomassa yang sangat banyak meliputi daerah yang luas, termasuk hutan dan lautan. Total biomassa di dunia sekitar 1.800 miliar ton di darat dan 4 miliar ton di laut [5]. Indonesia menghasilkan kurang lebih 1,2 juta ton limbah padat tapioka yang sering menimbulkan permasalahan lingkungan apabila tidak dilakukan pengolahan lebih lanjut [6].

Pada penelitian yang dilakukan oleh Agustini (2009) menunjukkan bahwa biomassa limbah padat industri tapioka (onggok) memiliki kadar karbohidrat 59,67%, protein 0,88%, serat kasar 30%, amilum 0,32% dan kadar air 20,33%. Kandungan karbohidrat onggok yang lebih tinggi daripada limbah tahu (46,33%) dapat dihidrolisis secara enzimatis untuk menghasilkan glukosa. Glukosa yang dihasilkan tersebut selanjutnya dapat difermentasi

untuk menghasilkan biohidrogen. Kadar biohidrogen yang dihasilkan dari proses degradasi anaerobik onggok sebesar 2,5%, sedangkan pada limbah tahu sebesar 0,74% dan pada tetes tebu sebesar 0,29% [7]. Oleh karena itu, onggok sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pada produksi biohidrogen.

Menurut Hawkes *et al.* (2002), produksi biohidrogen umumnya melibatkan mikroorganisme atau enzim [1]. Banyak kultur murni bakteri yang telah digunakan untuk menghasilkan biohidrogen dari berbagai substrat. *Clostridium* dan *Enterobacter* paling banyak digunakan sebagai inokulum. *Enterobacter aerogenes* dapat menghasilkan biohidrogen melalui fermentasi gelap. Menurut Classen *et al.* (1999), *E. aerogenes* dapat menghasilkan biohidrogen lebih cepat dibandingkan dengan mikroorganisme fotosintetik, karena *E. aerogenes* menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi untuk menghasilkan biohidrogen [3]. Pada penelitian yang dilakukan oleh Widyastuti (2011) menunjukkan bahwa *E. aerogenes* dengan substrat sorgum 4,2% pada reaktor *packed bed* menghasilkan 1,4 mol H₂/mol glukosa [9].

Banyak sedikitnya kadar biohidrogen yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti proses preparasi sampel, jenis dan konsentrasi substrat, jenis dan konsentrasi enzim, jenis mikroorganisme yang digunakan saat fermentasi, dan konsentrasi nitrogen dalam substrat. Kondisi substrat merupakan faktor penting yang mempengaruhi efektivitas bahan (biomassa) pada proses hidrolisis pati menjadi glukosa, karena dari hasil pemecahan glukosa tersebut dihasilkan biohidrogen [8]. Selain itu, kadar biohidrogen yang maksimal dapat dihasilkan dengan memperhatikan konsentrasi nitrogen dalam substrat karena nitrogen merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba. Menurut Muhlign dan Gibbs (1993), nitrogen diperlukan oleh mikroba selama fase pertumbuhan, produksi, dan stationer [9]. Oleh karena itu pada penelitian ini produksi biohidrogen dilakukan dengan memanfaatkan glukosa hasil dari hidrolisis enzimatis onggok industri tapioka sebagai substrat dan sumber energi, sedangkan urea digunakan sebagai sumber nutrisi untuk bakteri *Enterobacter aerogenes* agar dapat menghasilkan biohidrogen dengan kadar optimal.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia FMIPA Unesa untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri, uji kadar glukosa, dan persiapan uji kadar biohidrogen. Selain itu, penelitian juga dilakukan di Laboratorium Energi Institut Teknologi Surabaya untuk

uji kadar biohidrogen. Penelitian ini berlangsung pada bulan Maret-Juli 2013.

Alat

Ayakan 100 mesh, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, labu ukur, spatula, kawat ose, kaca arloji, pipet tetes, mikropipet, tip, termometer, neraca Ohaus, pembakar spiritus, kompor listrik, kasa, mikropipet, stirer, magnetic stirer, autoklaf, cawan petri, kawat ose, spektrofotometer UV-Vis, kromatografi gas, inkubator, oven, aluminium foil, pH meter, tabung sentrifuge, sentrifuge, botol kaca bertutup volume 500 mL, laminar flow, water bath.

Bahan

Onggok industri tapioka, enzim α -amilase, fiberzym, bakteri *Enterobacter aerogenes*, aquades, alkohol, glukosa anhidrat, urea, gliserol 85%, garam rochelle, Na_2CO_3 anhidrat, NaHCO_3 , Na_2SO_4 anhidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , H_2SO_4 pekat, kristal ammonium molibdat, kristal $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nutrient broth, nutrient agar, yeast, agar, reagen biuret.

PROSEDUR PENELITIAN

Tahap Persiapan

Persiapan Sampel

Pada tahap ini dilakukan persiapan biomassa limbah organik (onggok industri tapioka) hingga siap digunakan sebagai sampel. Persiapan dimulai dari proses pengambilan onggok industri tapioka basah dari *home industry* tepung tapioka di Desa Tawangrejo, Kecamatan Ngadiluwih, Kabupaten Kediri. Onggok basah kemudian dikeringkan di bawah cahaya matahari langsung selama \pm 2 hari. Onggok kering selanjutnya digiling, lalu diayak dengan ayakan 100 mesh. Onggok lolos ayakan 100 mesh merupakan sampel yang digunakan untuk tahap selanjutnya.

Pembuatan Substrat Onggok Industri Tapioka

Substrat dibuat dengan menimbang 10, 15, 20, 25 dan 30 gram onggok, kemudian masing-masing dilarutkan dengan air suhu 65°C sebanyak 100 mL. Larutan substrat onggok tersebut selanjutnya dihidrolisis enzimatis menggunakan enzim campuran.

Pembuatan Enzim Campuran

Enzim campuran dibuat dari campuran enzim α -amilase dan fiberzym dengan perbandingan volume 2:1 (α -amilase dan fiberzym).

Hidrolisis Enzimatis Onggok Industri Tapioka

Onggok industri tapioka yang telah dibuat dengan variasi konsentrasi 15, 20, 25, 30, 35, dan 40% (b/v) selanjutnya ditambahkan enzim campuran sebanyak 6,25 mL. Lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C .

Hasil hidrolisis enzimatis menghasilkan filtrat, dimana filtrat dideproteinasi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai sampel untuk diuji kadar glukosanya.

Pembuatan Reagen Nelson-somogyi

a. Pembuatan reagen Nelson A

Menimbang 1,5 gram garam rochelle, 3 gram Na_2CO_3 anhidrat, 2 gram NaHCO_3 , 18 gram Na_2SO_4 anhidrat. Semua bahan tersebut kemudian dilarutkan dengan aquades dengan sedikit air di beaker glass. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditera dengan aquades hingga batas meniskus labu ukur.

b. Pembuatan reagen Nelson B

Menimbang 2 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, lalu dilarutkan dalam sedikit aquades di beaker glass. Ditambah 18 gram Na_2SO_4 dan 2 tetes H_2SO_4 pekat, lalu tera dengan aquades pada labu ukur 100 mL.

c. Pembuatan reagen Cu alkalis

Larutan Cu alkalis merupakan campuran dari reagen Nelson A dan B dengan perbandingan volume 4:1.

d. Pembuatan reagen arsenomolibdat

Melarutkan 5 gram kristal ammonium molibdat dalam 90 mL aquades, kemudian ditambahkan 5 mL H_2SO_4 pekat (a). 0,6 gram kristal $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 5 mL aquades (b). Larutan b dicampurkan dengan larutan a hingga terbentuk larutan berwarna kuning bening. Simpan larutan dalam botol gelap dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 hari.

Pembiakan Bakteri *Enterobacter aerogenes*

a. Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Media padat dibuat dengan mencampurkan 2,3 gram nutrient broth, 0,5 gram yeast, dan 1,5 gram agar ke dalam 100 mL aquades. Media cair dibuat dengan mencampurkan 2,3 gram nutrient broth, 0,5 gram yeast ke dalam 100 mL aquades. Media padat dan cair sebelum digunakan untuk membiakan bakteri disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Peremajaan bakteri pada media padat

Bakteri diremajakan pada media padat dengan cara mengambil 1 ose biakan dari media miring kemudian digoreskan pada media padat steril (peremajaan dilakukan pada laminar flow), selanjutnya biakan tersebut diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator suhu 37°C . Bakteri yang diremajakan dalam media padat selanjutnya dibiakkan kembali dalam media cair.

c. Pemajaan bakteri pada media cair

1 ose koloni tunggal bakteri pada media padat diambil untuk selanjutnya ditumbuhkan pada media cair steril

(peremajaan dilakukan pada laminar flow). Bakteri pada media cair kemudian diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator suhu 37 °C. Bakteri dalam media cair ini selanjutnya diinokulasikan ke dalam larutan substrat onggok yang telah dihidrolisis enzimatis.

Tahap Pelaksanaan

Deproteinasi Sampel

Deproteinasi dilakukan dengan mengambil 2 mL filtrat, lalu ditambahkan dengan larutan Ba(OH)₂ dan ZnSO₄ masing-masing sebanyak 1,5 mL. Campuran tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit hingga terbentuk endapan putih dan filtrat jernih tak berwarna. Filtrat diuji lagi dengan reagen biuret, apabila tidak membentuk warna ungu maka filtrat dapat digunakan sebagai sampel untuk diuji kadar glukosanya.

Pembuatan Larutan Induk dan Standar Glukosa

Larutan induk glukosa dibuat pada konsentrasi 2 mg/mL, yakni dengan menimbang 40 mg glukosa anhidrat dan dilarutkan dalam 20 ml aquades. Larutan standar glukosa dibuat dari larutan induk glukosa. Larutan standar dibuat pada konsentrasi 0,1;0,2;0,3;0,4 dan 0,5 mg/mL. Larutan standar tersebut selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimumnya (744 nm).

Non-aktivasi Enzim

Larutan substrat onggok yang telah diinkubasi (hidrolisat) kemudian dinon-aktifkan enzimnya dengan cara memanaskan hidrolisat di atas *waterbath* pada suhu 99,9°C selama 15 menit lalu didinginkan. Selanjutnya masing-masing hidrolisat diambil filtratnya sebanyak 2 mL untuk diuji kadar gula reduksinya menggunakan metode Nelson-somogy.

Pembuatan Kurva Absorbansi Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa yang telah dibuat pada poin (a) selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 744 nm. Kemudian dilihat regresi linier yang dihasilkan, apabila regresi linier yang dihasilkan lebih dari 0,98 maka dapat dilakukan uji absorbansi sampelnya.

Uji Kadar Glukosa

Filtrat dari hidrolisat digunakan sebagai sampel. 1 mL filtrat selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen Cu alkalis, dikocok lalu dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit (terbentuk endapan merah bata) kemudian didinginkan. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat, dikocok hingga endapan merah

bata larut lalu diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 744 nm hingga diketahui hidrolisat dengan konsentrasi onggok berapa persen yang dapat menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi.

Uji Kadar Biohidrogen

- a. Proses fermentasi gelap

Hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi selanjutnya difermentasi. Proses fermentasi diawali dengan menginokulasi mikroorganisme ke dalam hidrolisat, yaitu dengan menambahkan sebanyak 5 mL *Enterobacter aerogenes* yang telah ditumbuhkan pada media cair ke dalam masing-masing hidrolisat. Kemudian ditambahkan urea dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5% (b/b). Selanjutnya hidrolisat difermentasi selama 6 jam, yang selanjutnya dapat diuji kadar biohidrogennya menggunakan alat kromatografi gas.
- b. Pengukuran kadar biohidrogen
 - 1) Pengukuran kadar gas hidrogen murni

Sebanyak 0,1 mL gas hidrogen murni diinjekkan ke alat kromatografi gas. *Peak* dan waktu retensi yang keluar pada monitor nantinya digunakan sebagai acuan dalam menentukan kadar gas hidrogen pada sampel.
 - 2) Pengukuran kadar gas biohidrogen sampel

Hidrolisat yang telah difermentasi kemudian diuji masing-masing kadar biohidrogennya menggunakan alat kromatografi gas. Sebanyak 0,1 mL gas hidrogen diambil dari dalam botol sampel (hidrolisat onggok industri tapioka) menggunakan suntikan, lubang botol bekas jarum suntikan kemudian ditutup dengan isolasi. Gas yang telah diambil selanjutnya diinjekkan ke alat kromatografi gas, lalu ditunggu hingga muncul *peak* dan waktu retensi gas hidrogen sampel pada monitor. *Peak* dan waktu retensi sampel yang diambil mengacu pada *peak* dan waktu retensi gas hidrogen murni, apabila *peak* dan waktu retensi sampel mendekati atau sama dengan *peak* dan waktu retensi gas hidrogen murni maka *peak* dan waktu retensi itulah yang diambil. Lalu luas area *peak* dibandingkan dengan luas area *peak* gas hidrogen murni dan dikalikan 100%, hingga didapatkan kadar biohidrogen pada masing-masing sampel (dengan perlakuan variasi urea). Selanjutnya hasil perhitungan tersebut dianalisis, pada penambahan konsentrasi urea berapa persen yang dapat menghasilkan kadar biohidrogen tertinggi.

Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis dan kadar bihidrogen hasil proses fermentasi gelap. Data tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS 16 dengan uji Anova satu arah dengan taraf kebenaran 95%. Analisis ini memberikan indikasi tentang ada tidaknya pengaruh pada setiap perlakuan dari dua variabel, yaitu variasi konsentrasi ongkok industri tapioka dan urea yang diuji menggunakan uji lanjut LSD (*Least Significant Difference*).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

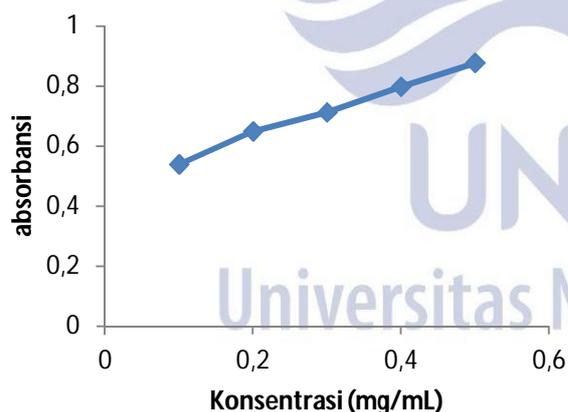
Uji Kadar Glukosa

Uji kadar glukosa sampel dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-somogyi, dimana dibutuhkan kurva larutan standar sebelum dilakukan uji kadar glukosa sampel. Data absorbansi larutan standar glukosa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Absorbansi Larutan Standar Glukosa

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0.1	0.539
0.2	0.649
0.3	0.712
0.4	0.798
0.5	0.877

Data pada Tabel 1 selanjutnya dibuat kurva standar seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Larutan Standar Glukosa

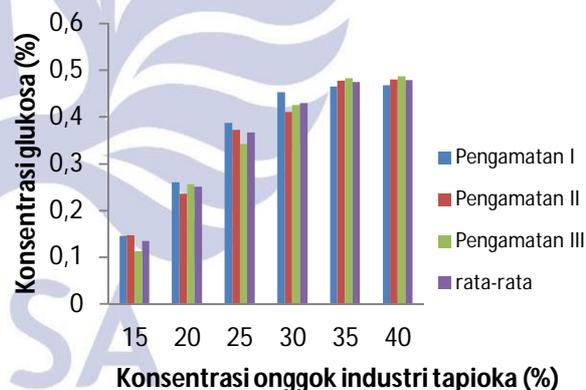
Kurva larutan standar glukosa yang dihasilkan pada penelitian ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan standar maka semakin besar pula nilai absorbansinya, yang berarti semakin besar kadar glukosanya. Hal ini dapat dilihat dari persamaan garis yang diperoleh, yaitu $y = 0.8245x + 0.4675$ dengan $r^2 =$

0,994. Data kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis ongkok industri tapioka pada variasi konsentrasi 15, 20, 25, 30, 35, dan 40% dari pembacaan alat spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 744 nm dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar Glukosa Dalam Variasi Konsentrasi Ongkok

Konsentrasi ongkok (%)	Kadar glukosa (mg/mL)			
	Penga matan 1	Penga matan 2	Penga matan 3	Rata-rata
15	0.146	0.147	0.113	0.135
20	0.260	0.236	0.257	0.251
25	0.387	0.372	0.343	0.367
30	0.453	0.410	0.426	0.430
35	0.465	0.477	0.483	0.475
40	0.468	0.480	0.487	0.478

Data pada Tabel 2 tersebut selanjutnya dibuat dalam bentuk diagram batang, dimana kadar glukosa yang dihasilkan dikonversikan dalam satuan persen (%) (kadar glukosa dalam mg/mL dikalikan 100%). Diagram batang kadar glukosa dalam variasi konsentrasi limbah padat tapioka dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram Batang Kadar Glukosa Dalam Variasi Konsentrasi Ongkok Industri Tapioka

Data pada Tabel 2 tersebut selanjutnya juga dianalisis menggunakan uji statistik, yaitu Anova satu arah yang meliputi uji normalitas, uji homogenitas, uji anova, dan uji lanjutan (LSD). Data dikatakan normal dan homogen jika memiliki nilai signifikan (Sig.) $\geq 0,05$. Hasil uji normalitas diperoleh nilai signifikan sebesar 0.890 yaitu lebih dari 0.05, sehingga data yang diuji telah berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas diperoleh nilai signifikan sebesar 0.384 yaitu lebih dari 0.05,

sehingga data yang diuji telah bersifat homogen. Data yang telah berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dapat diuji dengan uji Anova satu arah. Hasil uji Anova satu arah dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Anova Satu Arah Kadar Glukosa Dalam Variasi Konsentrasi Limbah Padat Tapioka

	Jumlah Kuadrat	Df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig.
Antar Kelompok	.283	5	.057	201.419	.000
Dalam Kelompok	.003	12	.000		
Total	.286	17			

Hasil uji Anova satu arah diperoleh harga signifikan (Sig.) kurang dari 0.05 yaitu 0.00, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima yang menyatakan ada pengaruh konsentrasi onggok industri tapioka terhadap kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis. Perbedaan yang signifikan dari pengaruh variasi konsentrasi onggok industri tapioka terhadap kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis dapat diketahui melalui *Post Hoc Test* (uji LSD).

Pada onggok konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30% dan 35% terjadi peningkatan kadar glukosa yang cukup besar, hal ini sesuai dengan hasil uji LSD yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada tiap perlakuan. Pada onggok konsentrasi 35% dan 40% peningkatan kadar glukosa yang dihasilkan sangat kecil, hal ini juga sesuai dengan uji LSD dan notasi perbedaan yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada perlakuan tersebut.

Kecepatan reaksi enzimatis bergantung pada perbandingan konsentrasi enzim dan substrat. Kecepatan maksimum reaksi enzimatis ditunjukkan dengan garis mendatar yang menggambarkan peningkatan kecepatan reaksi yang rendah seiring dengan penambahan konsentrasi substrat. Hal ini terjadi karena substrat pada akhirnya menjadi inhibitor pada enzim, dimana begitu banyaknya substrat menyebabkan terjadinya persaingan antar substrat untuk menempati sisi aktif enzim sehingga tidak ada substrat yang dapat menempatnya, dan reaksi tidak terjadi atau dapat terjadi namun membutuhkan waktu yang lama. Menurut Olsen (1995), peningkatan kadar glukosa yang sangat kecil terjadi karena glukosa akan mencapai titik batas dimana setelah titik itu terlewati maka tidak akan terjadi perubahan nilai glukosa yang lebih tinggi lagi meskipun konsentrasi enzim ditambahkan dan lama inkubasi diperpanjang [10]. Oleh karena itu pada onggok konsentrasi 35% dan 40% tidak terjadi perbedaan kadar glukosa yang signifikan, sehingga pada penelitian ini kadar glukosa optimum

dihasilkan pada limbah padat tapioka konsentrasi 35% dengan kadar glukosa perolehan sebesar 47,5%.

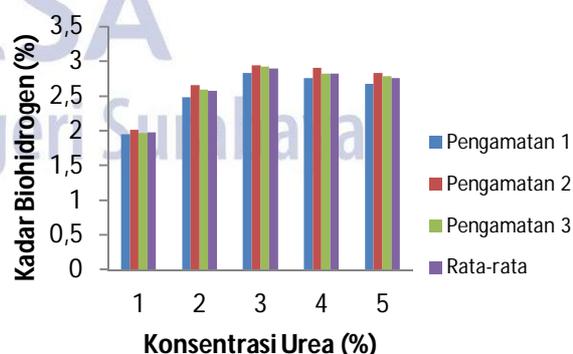
Uji Kadar Biohidrogen

Pada tahap ini onggok konsentrasi 35% yang mempunyai kadar glukosa optimum digunakan sebagai sumber energi untuk menghasilkan biohidrogen. Glukosa yang dihasilkan selanjutnya digunakan oleh *Enterobacter aerogenes* untuk diubah menjadi biohidrogen melalui proses fermentasi gelap. Urea ditambahkan pada proses fermentasi sebagai nutrisi untuk *Enterobacter aerogenes*. Menurut Muhligen dan Gibbs (1999) bahwa nitrogen diperlukan mikroba selama fase pertumbuhan, produksi, dan stasioner [9]. Biohidrogen yang dihasilkan kemudian diuji kadarnya dengan menggunakan alat kromatografi gas. Hasil dari pengukuran kadar biohidrogen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kadar Biohidrogen Dalam Variasi Konsentrasi Urea

Konsentrasi urea (%)	Kadar biohidrogen (%)			
	Pengamatan 1	Pengamatan 2	Pengamatan 3	Rata-rata
1	1.9456	2.0127	1.9666	1.9750
2	2.4804	2.6611	2.5903	2.5773
3	2.8348	2.9446	2.9198	2.8997
4	2.7568	2.9021	2.8206	2.8265
5	2.6718	2.8348	2.7816	2.7627

Data pada Tabel 4 selanjutnya dibuat diagram batang yang menunjukkan kadar biohidrogen dalam variasi konsentrasi urea. Diagram batang kadar biohidrogen dalam variasi konsentrasi urea dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Batang Kadar Biohidrogen Dalam Variasi Konsentrasi Urea

Data pada Gambar 3 tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan uji statistik, yaitu Anova satu arah yang meliputi uji normalitas, uji homogenitas, uji anova, dan uji lanjutan (*post hoc test*). Data dikatakan normal dan homogen jika memiliki nilai signifikan (Sig.) $\geq 0,05$. Hasil uji normalitas diperoleh nilai signifikan sebesar 0.875 yaitu lebih dari 0.05, sehingga data yang diuji telah berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas diperoleh nilai signifikan sebesar 0.640 yaitu lebih dari 0.05, sehingga data yang diuji telah bersifat homogen. Data yang telah berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dapat diuji dengan uji Anova satu arah. Hasil uji Anova satu arah dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Anova Satu Arah Kadar Glukosa Dalam Variasi Konsentrasi Urea

	Kuadrat Jumlah	Df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig .
Antar Kelompok	1.675	4	.419	83.777	.000
Dalam Kelompok	.050	10	.005		
Total	1.725	14			

Hasil uji Anova satu arah diperoleh harga signifikan (Sig.) yang kurang dari 0.05 yaitu 0.00, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima yang menyatakan ada pengaruh konsentrasi urea terhadap kadar biohidrogen. Perbedaan yang signifikan dari pengaruh variasi konsentrasi urea terhadap kadar biohidrogen dapat diketahui melalui *Post Hoc Test* (uji LSD).

Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar biohidrogen pada penggunaan urea konsentrasi 1%, 2%, dan 3%, hal ini sesuai dengan hasil uji LSD yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada tiap perlakuan. Peningkatan kadar biohidrogen tersebut terjadi karena kadar nitrogen pada tiap perlakuan mengalami peningkatan sehingga bakteri *Enterobacter aerogenes* tercukupi kebutuhan nitrogennya akibatnya biohidrogen juga semakin banyak. Pada penggunaan urea konsentrasi 4% dan 5% terjadi penurunan kadar biohidrogen, hal ini juga sesuai dengan uji LSD yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada perlakuan tersebut. Penurunan kadar biohidrogen tersebut terjadi karena perbandingan nitrogen dan karbon pada tiap perlakuan semakin tidak seimbang (lebih banyak kandungan karbonnya) sehingga bakteri *Enterobacter aerogenes* kekurangan sumber nitrogen akibatnya kadar biohidrogen yang dihasilkan menurun. Anunputtikul (2004) menyatakan bahwa kurangnya elemen khusus yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme akan membatasi produksi biogas tersebut [11].

Pada penambahan urea konsentrasi 1% dan 2% kadar biohidrogen yang dihasilkan lebih rendah dari penambahan urea konsentrasi 3%. Kadar biohidrogen yang rendah tersebut disebabkan belum terjadinya keseimbangan perbandingan antara kadar karbon dan nitrogennya sehingga menyebabkan bakteri kekurangan asupan nitrogen dan berdampak terhadap pertumbuhan bakteri. Pada penambahan urea konsentrasi 3% kadar biohidrogen yang dihasilkan paling besar. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi urea 3% tersebut perbandingan karbon dan nitrogen sudah berada pada komposisi yang tepat untuk pertumbuhan bakteri *Enterobacter aerogenes*, sehingga penambahan urea menyebabkan kadar nitrogen yang dapat diasup oleh bakteri menjadi maksimal dan berakibat pada tingginya kadar biohidrogen yang dihasilkan. Pada penambahan urea konsentrasi 4% dan 5% kadar biohidrogen yang dihasilkan mengalami penurunan. Rendahnya perbandingan kadar karbon dan nitrogen tersebut karena terjadi ketidakseimbangan perbandingan antara karbon dan nitrogen, penambahan urea menyebabkan kadar nitrogen semakin besar sehingga perbandingan kadar karbon dan nitrogen semakin kecil. Perbandingan kadar karbon dan nitrogen yang relatif kecil tidak baik untuk proses pembentukan biogas karena akan meningkatkan emisi nitrogen sebagai amonium yang dapat menghalangi perkembangan bakteri [11]. Oleh karena itu, pada penelitian ini konsentrasi urea 3% merupakan penambahan nutrisi nitrogen terbaik untuk *Enterobacter aerogenes* dalam menghasilkan biohidrogen dengan kadar maksimal, yaitu sebesar 2,8997%.

SIMPULAN

Berdasarkan analisis data dan uji statistik diperoleh nilai signifikansi untuk pengujian kadar glukosa dan kadar biohidrogen dengan variasi konsentrasi ongkok industri tapioka dan urea adalah sebesar 0,000 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa:

1. Ada pengaruh konsentrasi ongkok industri tapioka terhadap kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis. Kadar glukosa optimum dihasilkan pada penggunaan ongkok industri tapioka konsentrasi 35%, yakni sebesar 47,5%.
2. Ada pengaruh konsentrasi urea terhadap kadar biohidrogen hasil proses fermentasi gelap dari hidrolisat ongkok industri tapioka. Kadar biohidrogen optimum dihasilkan pada penggunaan urea konsentrasi 3%, yakni sebesar 2,8997%.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penentuan kadar glukosa total dari ongkok industri tapioka untuk meningkatkan efisiensi dalam menghasilkan glukosa.

2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penentuan fase pertumbuhan *Enterobacter aerogenes* agar dapat diketahui fase yang tepat untuk menghasilkan kadar biohidrogen secara maksimal.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penggunaan bakteri penghasil biohidrogen lain untuk menghasilkan kadar biohidrogen yang maksimal.

Surabaya: Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya.

11. Khaerunnisa, Gita dan Ika Rahmawati. 2013. Pengaruh pH dan Rasio COD:N Terhadap Produksi Biogas Dengan Bahan Baku Limbah Industri Alkohol (Vinasse). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2/31-7. Semarang: Universitas Diponegoro.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rahman, Mahyudin Abdul dan Koesnandar. 2006. Biohydrogen Production: Prospect and Limitations to Practical Application. *Akta Kimindo Vol. 1 No. 2 April*: 73-78.
2. _____. 2011. Hingga 2030, Permintaan Energi Dunia Meningkat 45%. <http://www.esdm.go.id/berita/37-umum/2133-hingga-2030-permintaan-energi-dunia-meningkat-45.html>. Diakses pada 28 Januari 2013.
3. Rahman, Mahyudin Abdul dan Eniya Dewi. 2009. Inovasi Teknologi Biohidrogen Dari Limbah Biomassa Ke Energi Listrik Dengan Teknologi Fuel-Cell. *Jurnal Teknik Lingkungan Vol. 10 No. 3 Hal*. 319-327.
4. Trisakti, Bambang, dkk. 2012. Perancangan Awal Pabrik Biohidrogen Dari Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit Dengan Fermentasi Anaerobik Pada Kondisi Termofilik. *Jurnal Teknik Kimia Universitas Sumatera Utara Vol. 1 No. 1*.
5. Yokoyama, Shinta *et al.* 2008. *The Asian Biomass Handbook*. Japan: The Japan Institute of Energy.
6. Winarno. 1984. *Limbah Pertanian*. Jakarta: Departemen Perindustrian.
7. Agustini, Rudiana, dkk. 2009. *Pengembangan Biofuel Ramah Lingkungan Dengan Memanfaatkan Biomassa Limbah Organik Beserta Aplikasinya Dalam Proses Hydrocacking Dan Hydrotreating Petroleum*. Laporan penelitian tidak dipublikasikan. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
8. Laga, Amran. 2008. Pengaruh Konsentrasi Substrat Hidrolisat Tapioka Dan Akseptor Minimal Pada Pembentukan Siklodekstrin. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan Vol. XIX No. 2*.
9. Widyastuti, Ety Tri. 2011. *Produksi Biohidrogen Menggunakan Sorgum Manis (Sorghum Bicolor (L.) Moench) Oleh Enterobacter Aerogenes ADH-43 Pada Reaktor Packed-Bed*. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
10. Prasetyowati, Wahyu. 2011. Pengaruh Konsentrasi Enzim Dan Lama Inkubasi Terhadap Produksi Bio-H₂ Pada Proses Degradasi Limbah Padat Industri Tapioka (Ongkok). *Skripsi* yang tidak dipublikasikan.