



UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

**PRODUKSI BIOHIDROGEN DARI LIMBAH ORGANIK
CAIR MOLASE DAN VINASSE MENGGUNAKAN
BAKTERI *Rhodobium marinum***

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

oleh:
UNNES
Saeful Anhari
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
4411412060

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang berjudul "Produksi Biohidrogen Dari Limbah Organik Cair Molase dan Vinasas Menggunakan Bakteri *Rhodospirillum rubrum*" bahwa skripsi ini bebas plagiat, dan disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing, sumber informasi atau kutipan yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka bagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun. Apabila dikemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Semarang, 25 Januari 2017

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

“Produksi Biohidrogen dari Limbah Organik Cair Molase dan Vinasse
Menggunakan Bakteri *Rhodobium marinum*”

disusun oleh

Saeiful Anhari

4411412060

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES
pada tanggal 1 Februari 2017.



Prof. Dr. Zaenuri, S.E, M.Si, Akt
NIP. 196412231988031001

Sekretaris

Dra. Endah Penati, M.Si.
NIP. 196511161991032001

Ketua Penguji

Talitha Widiatnangrum, S.Si, M.Si, Ph.D.
198009292005012004

Anggota Penguji/
Pembimbing I

Dr. Dra. Siti Harmida Bintari, M.S.
196008141987102001

Anggota Penguji/
Pembimbing II

Drs. Ibnu Mubarak, M.Sc.
198003112005012003

MOTTO

- ❖ Sebaik-baiknya manusia adalah manusia yang bisa bermanfaat untuk manusia lain.
- ❖ Pena seorang pelajar lebih suci nilainya daripada darah seorang martir (Nabi Muhammad SAW)
- ❖ Nalarlah yang mempercepat tujuan, tapi hati menunjuk jalan yang benar (KH.Muhammad Quraish Shihab)



PERSEMBAHAN

- ❖ Untuk kedua Orang tuaku: Basirin & Umi Sangadah
Teladan, doa dan cinta Bapak Ibu penyemangat hidupku
- ❖ Untuk kedua adik Ku tercinta: Tika Syahfalina & Ari Budi Utomo
- ❖ Untuk semua pihak yang menyebabkan terciptanya tugas akhir ini.

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, serta kemudahan dan kelapangan, sehingga penulis diberikan kemudahan dalam menyelesaikan skripsi dengan judul "Produksi Biohidrogen Dari Limbah Organik Cair Molase dan Vinasse Menggunakan Bakteri *Rhodobium marinum*" sebagai syarat sarjana Sains pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

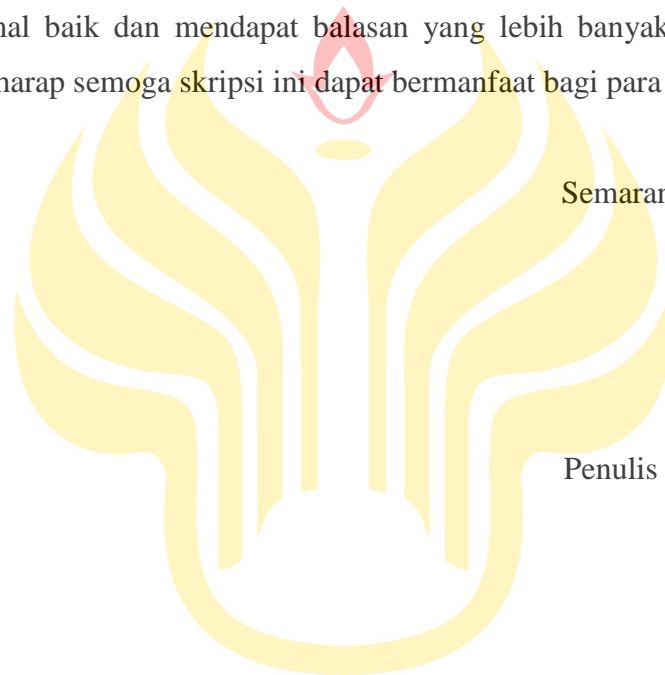
Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis telah banyak menerima bantuan baik langsung maupun tidak langsung, kerjasama dan sumbangan pikiran dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
3. Ketua Jurusan Biologi Program Strata I (S1) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
4. Ibu Dr. Dra. Siti Harnina Bintari, M.S. sebagai dosen pembimbing pertama yang telah memberikan ilmu, petunjuk, arahan dan bimbingan dengan ikhlas dan penuh kesabaran pada penulis.
5. Bapak Drs. Ibnul Mubarak, M.Sc. Dosen pembimbing kedua yang telah memberikan petunjuk, arahan, nasehat dan bimbingan pada penulis.
6. Ibu Talitha Widiatningrum, Ph.D. Dosen penguji yang telah memberikan evaluasi, penilaian, masukan serta petunjuk untuk kelancaran penelitian dan skripsi ini.
7. Ibu Dr. Dwi Susilaningsih, M.Pharm. Kepala laboratorium di LIPI atas ilmu, bantuan dan arahan selama penelitian di Puslit Bioteknologi LIPI Bogor.
8. Bapak Swastika Praharyawan, M.Si., Ibu Dian Noverita Widyaningrum, M.Si, Mba Delicia Yunita Rachman, M.Si. Staf Peneliti Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, Puslit Bioteknologi, LIPI atas ilmu, bantuan dalam menyelesaikan penelitian di Puslit Bioteknologi LIPI Bogor.

9. Orang tua, kedua adikku, keluarga, sahabat penelitian (Faisal, Fadlan, Bella, Deta, Yunita), teman-teman rombel dua biologi murni 2012 yang telah memberikan semangat, motivasi, doa, serta dukungan baik spiritual maupun materiil demi kelancaran skripsi ini.
10. Semua pihak yang telah membantu terselesainya skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Hanya ucapan terima kasih dan doa, semoga apa yang telah diberikan menjadi amal baik dan mendapat balasan yang lebih banyak dari Allah SWT. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Semarang, 25 Januari 2017



Penulis

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

ABSTRAK

Anhari, Saeful. 2017. *Produksi Biohidrogen Dari Limbah Organik Cair Molase dan Vinasse Menggunakan Bakteri Rhodobium marinum*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Dr. Dra. Siti Harnina Bintari, M.S. dan Drs. Ibnu Mubarak, M.Sc.

Pemakaian bahan bakar fosil di Indonesia yang berlebihan dan terjadi sejak dahulu hingga saat ini telah mengakibatkan semakin langkanya persediaan bahan bakar. Eksploitasi terhadap energi bahan bakar fosil tersebut menyebabkan waktu pembentukan dan penggunaannya yang tidak seimbang sehingga perlu dikembangkan suatu energi alternatif terbarukan. Biohidrogen merupakan salah satu sumber energi alternatif terbarukan yang dihasilkan melalui proses biologis menggunakan biomassa organik dengan melibatkan mikroorganisme penghasil gas hidrogen. Penelitian ini bertujuan mengetahui dan membandingkan rasio kebaruan terhadap gas biohidrogen yang dihasilkan dari limbah organik cair molase dan vinasse selama fotofermentasi menggunakan *Rhodobium marinum*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap tiga faktor, terdiri dari jenis limbah (molase dan vinasse), konsentrasi limbah (10%, 50%, 100%) dan pH limbah (6, 7, 8) dengan pola perlakuan 2x3x3 pada tiga kali ulangan. Penelitian ini memiliki alur penelitian: pembuatan media tumbuh bakteri, kultivasi bakteri, persiapan media produksi, karakterisasi media produksi, fotofermentasi, dan pengukuran kadar biohidrogen. Rerata hasil tersignifikan produksi gas biohidrogen limbah molase berturut-turut pada konsentrasi 10 % pH 8, konsentrasi 50 % pH 8, dan konsentrasi 50 % pH 8 sebesar $86/10^{-1}$ L kultur, $146/10^{-1}$ L kultur, $188/10^{-1}$ L kultur dan produksi gas biohidrogen limbah vinasse berturut-turut pada konsentrasi 50 % pH 8, konsentrasi 100 % pH 8 sebesar $86/10^{-1}$ L kultur, $110/10^{-1}$ L kultur. Simpulan yang diperoleh bahwa rasio kebaruan produksi gas biohidrogen molase:vinasse sebesar 27:20. Produksi gas biohidrogen tertinggi pada limbah molase sebesar $188/10^{-1}$ L kultur dan limbah vinasse sebesar $110/10^{-1}$ L kultur.

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

Kata Kunci : biohidrogen, fotofermentasi, limbah organik, *Rhodobium marinum*

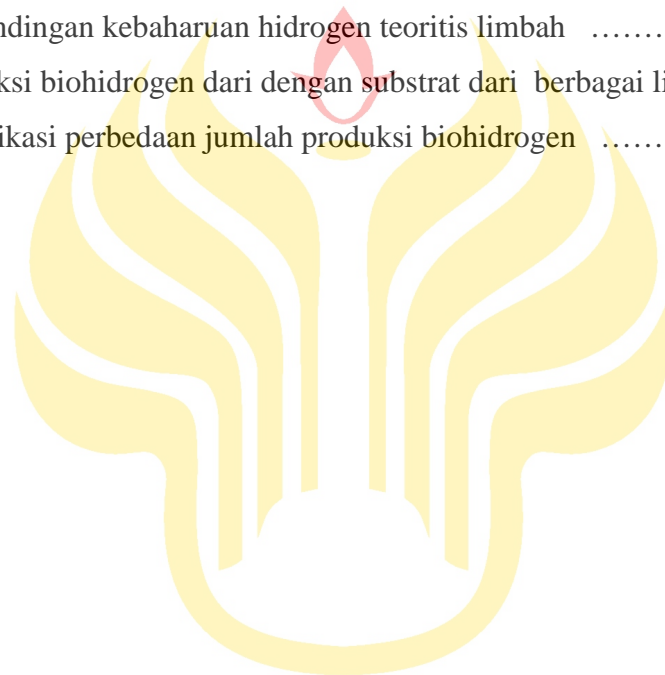
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB	
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Penegasan Istilah	3
C. Rumusan Masalah	4
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Bakteri <i>Rhodobium marinum</i>	5
B. Hidrogen	7
C. Produksi hidrogen secara biologi (Biohidrogen)	9
D. Limbah organik cair	11
1. Limbah organik cair molase	11
2. Limbah organik cair vinasse	12
E. Fotofermentasi	13
F. Faktor-faktor produksi biohidrogen	15
G. Kerangka alur penelitian	16
III. METODE PENELITIAN	17
A. Waktu dan Lokasi penelitian	17
B. Kultivar dan Substrat Fermentasi	17
C. Variabel Penelitian	17
D. Alat dan Bahan	18
E. Rancangan Penelitian	18
F. Prosedur Penelitian	19
1. Pembuatan media tumbuh bakteri	19

2. Kultivasi bakteri	20
3. Persiapan medium produksi	20
4. Karakterisasi medium produksi	22
5. Fotofermentasi	24
6. Pengukuran kadar biohidrogen	25
7. Analisis data	26
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Hasil	27
1. Kultivasi bakteri	27
2. Karakterisasi medium produksi	27
3. Pengukuran kadar gas biohidrogen limbah organik	31
4. Perbandingan kebaruaran produksi biohidrogen	32
B. Pembahasan	34
1. Kultivasi bakteri	34
2. Karakterisasi medium produksi	36
3. Pengukuran kadar gas biohidrogen limbah	38
4. Perbandingan kebaruaran produksi biohidrogen	40
C. Analisis data	42
V. PENUTUP	44
A. Simpulan	44
B. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan perlakuan untuk perlakuan limbah	19
2. Pengukuran uji awal total karakterisasi limbah	28
3. Pengukuran uji akhir total karakterisasi limbah	29
4. Perbandingan keabawahan hidrogen teoritis limbah	33
5. Produksi biohidrogen dari dengan substrat dari berbagai literatur	41
6. Signifikasi perbedaan jumlah produksi biohidrogen	43



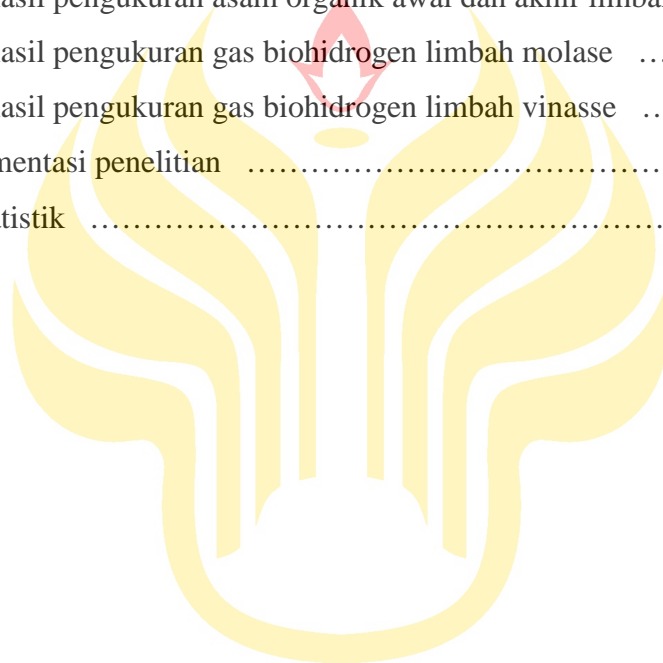
UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi bakteri <i>Rhodobium marinum</i>	6
2. Mekanisme <i>fuel cell energy</i>	9
3. Sistem produksi pemanfaatan biohidrogen	11
4. Alur penelitian biohidrogen dari limbah molase dan vinasse	16
5. Bioreaktor botol vial untuk fotofermentasi	24
6. Sistem fotofermentasi	25
7. Rerata kurva pertumbuhan <i>Rhodobium marinum</i>	27
8. Grafik efisiensi substrat limbah selama fotofermentasi	30
9. Grafik produksi biohidrogen dari limbah molase	31
10. Grafik produksi biohidrogen dari limbah vinasse	32
11. Proses glikolisis dan terbentuknya asam organik bakteri	37
12. Mekanisme terbentuknya biohidrogen pada membran sel	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva standar glukosa untuk limbah molase	51
2. Data hasil pengukuran gula total awal dan akhir limbah molase	51
3. Kurva standar asam organik untuk limbah vinasse	52
4. Data hasil pengukuran asam organik awal dan akhir limbah vinasse	53
5. Data hasil pengukuran gas biohidrogen limbah molase	54
6. Data hasil pengukuran gas biohidrogen limbah vinasse	55
7. Dokumentasi penelitian	56
8. Uji statistik	58



UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pemakaian bahan bakar fosil di Indonesia yang berlebihan dan terjadi sejak dahulu hingga saat ini telah mengakibatkan semakin langkanya persediaan bahan bakar dan menghasilkan gas-gas yang dapat menimbulkan masalah lingkungan, pemanasan global, dan berujung pada perubahan iklim di bumi. Dengan adanya krisis energi dan masalah lingkungan yang ditimbulkan, maka perlu dikembangkan suatu energi alternatif terbarukan yang merupakan solusi untuk menggantikan peran bahan bakar berbasis fosil yang berasal dari sumber daya alam hayati.

Indonesia memiliki sumber daya alam hayati dalam bidang pertanian yang tinggi, salah satunya adalah tanaman tebu yang digunakan untuk industri gula. Kementerian Industri pada tahun 2016 mencatat jumlah pabrik gula di Indonesia berjumlah 62 unit pabrik, 50 unit pabrik milik Badan Usaha Milik Negara (BUMN) sedangkan 12 unit pabrik milik swasta. Banyaknya jumlah pabrik gula menghasilkan limbah molase dan vinasse yang banyak dan harus ditangani. Penanganan limbah industri gula tebu saat ini masih dikonversi menjadi produk olahan pangan, alkohol, dan spiritus. Industri gula memanfaatkan limbah molase menjadi permen sapi, pupuk organik, bahan pengurang kadar air makanan (dehidrasi osmotik) kecap, daging, dan roti, sedangkan alkohol dan spiritus didapatkan dari hasil fermentasi limbah molase.

Pemanfaatan limbah industri gula tebu dari limbah vinasse masih belum dimanfaatkan karena limbah vinasse berbahaya jika diolah menjadi produk pangan. Salah satu solusi penanganan masalah limbah vinasse adalah pemanfaatan limbah vinasse sebagai biomassa organik untuk pembuatan energi bahan bakar alternatif (Iqbal *et al.* 2012). Limbah vinasse memiliki kandungan asam organik tinggi sebagai sumber karbon karbon dan limbah molase juga memiliki

kandungan gula tinggi sebagai sumber karbon (Sebayang 2006), sehingga dapat dijadikan bahan baku untuk pembuatan bahan bakar alternatif di Indonesia.

Hidrogen merupakan sumber energi yang bersih, efisien, dan dapat diperbaharui karena proses pembakaran hidrogen di udara hanya menghasilkan uap air dan energi panas (Mahyudin & Koesnandar 2006). Senyawa hidrogen berada melimpah di alam baik dalam gas maupun dalam bentuk komponen yang mengandung hidrogen seperti: biomasa, bahan bakar fosil, dan air. Hidrogen dapat dihasilkan dari berbagai bahan baku biomassa atau substrat yang bisa menghasilkan hidrogen. Berbagai metode yang digunakan untuk menghasilkan hidrogen memerlukan sumber energi berupa panas, elektrolitik, dan energi cahaya. Terdapat beberapa cara untuk memproduksi hidrogen, antara lain dengan cara *steam reforming*, elektrolisis, gasifikasi dan biologi (Chen *et al.* 2006). Dari beberapa cara tersebut di atas cara biologi merupakan cara yang efisien dan terbarukan (Li & Fang 2008). Produksi hidrogen secara biologi berbeda dari cara kimia atau elektrokimia, yaitu dapat dilakukan dengan peran bakteri pada tekanan dan suhu normal (Kotay & Das 2008).

Produksi biohidrogen secara fotofermentasi dapat memanfaatkan bakteri fotosintetik sebagai agen biologis penghasil gas hidrogen karena bakteri tersebut dapat memanfaatkan bermacam-macam substrat limbah organik sebagai bahan baku (Anam *et al.* 2012). Limbah organik dengan kandungan nitrogen yang rendah, senyawa organik tinggi, dan sumber karbon tinggi diketahui merupakan substrat yang ideal untuk produksi hidrogen secara fotofermentasi.

Beberapa spesies yang mampu menghasilkan hidrogen, di antaranya adalah Cyanobakteria, bakteri anaerob, dan bakteri fotosintetik. Bakteri fotosintetik merupakan jenis mikrob yang menguntungkan untuk produksi biohidrogen dalam skala besar. Bakteri fotosintetik yang termasuk bakteri non sulfur menghasilkan hidrogen menggunakan senyawa organik dan energi cahaya yang dikatalisis oleh enzim hidrogenase dan enzim nitrogenase (Anam *et al.* 2012).

Bakteri fotosintetik mempunyai peran dari enzim yang memproduksi hidrogen lebih diutamakan pada aktivitas enzim nitrogenase, aktivitas hidrogenase ini terabaikan. Aktivitas nitrogenase pada bakteri fotosintetik terstimulasi kuat oleh cahaya. Pola iluminasi saat periode terang dan gelap juga berpengaruh besar dalam kestabilan aktivitas nitrogenase. Kerja nitrogenase dalam menghasilkan hidrogen memerlukan sejumlah besar ATP dan energi tereduksi yang didapatkan dari hasil fotosistem bakteri tersebut (Koku *et al.* 2002).

Bakteri fotosintetik memiliki kemampuan tinggi dalam mengkonversi substrat secara efisien untuk pertumbuhan maupun produksi hidrogen dari proses fermentasi. Proses fermentasi tersebut menggunakan substrat organik dan cahaya untuk membentuk adenosin trifosfat (ATP) dan ferodoksin tereduksi (Fd red), kemudian enzim nitrogenase menggunakan ATP dan Fd red untuk menghasilkan hidrogen, sehingga produksi hidrogen lebih efisien dengan fotofermentasi (Koku *et al.* 2002).

Keuntungan dari pemakaian limbah sebagai media pembuatan biohidrogen secara fotofermentasi, selain merupakan bahan baku murah, pemanfaatan limbah untuk menghasilkan energi dapat mengurangi biaya untuk pengolahan limbah dan mengurangi dampak lingkungan akibat limbah yang terbuang. Energi yang dihasilkan dari bahan baku limbah pun dapat memberi nilai tambah bagi limbah itu sendiri (Anam *et al.* 2012).

B. Penegasan Istilah

Penegasan istilah dibuat untuk menghindari perbedaan pemahaman istilah dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Biohidrogen: Produksi gas hidrogen yang dihasilkan melalui proses biologis menggunakan biomassa organik dengan melibatkan mikroorganisme penghasil gas hidrogen (Demirbas 2009). Pada penelitian ini digunakan biomassa substrat limbah organik cair molase dan substrat limbah organik vinasse dengan bakteri fotosintetik *Rhodobium marinum* untuk menghasilkan biohidrogen.

2. Limbah organik: Merupakan substrat organik yang mengandung gula, asam-asam organik sebagai sumber karbon sebagai donor elektron dalam metabolisme bakteri untuk menghasilkan biohidrogen (Kapdan & Kargi 2006). Pada penelitian ini digunakan limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse berumur \pm 30 hari yang didapatkan dari PT. Madu Baru PG-PS Madukismo, Tirtonirmolo, Kasihan, Bantul, Yogyakarta.
3. Fotofermentasi: Fermentasi menggunakan bakteri fotosintetik dengan cahaya sebagai sumber energi (Hellenbeck 2013). Pada penelitian ini dilakukan teknik pencahayaan lampu TL (*tubular lamp*) intensitas cahaya 60 watt sebagai pengganti sinar matahari seperti kondisi lingkungan asli dengan batas waktu fotofermentasi 7 hari (Anam 2012).
4. Bakteri *Rhodobium marinum*: Bakteri *Rhodobium marinum* diperoleh dari NBRC (*NITE Biological Resource Center*) dengan nomor koleksi 100434. Bersifat gram negatif, basil, bakteri ungu non sulfur, bersifat motil (Presscot 1999) yang telah digunakan oleh Laboratorium Bioenergi & Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jalan Raya Bogor KM. 46, Cibinong, Bogor. Bakteri tersebut telah dikultivasi beberapa kali dengan validasi dari aspek mikrobiologis.

C. Rumusan Masalah

1. Berapakah rasio perbandingan kebaruan produksi gas biohidrogen dari limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse selama fotofermentasi dengan menggunakan bakteri *Rhodobium marinum* skala laboratorium?
2. Berapakah produksi gas biohidrogen dari limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse selama fotofermentasi dengan menggunakan bakteri *Rhodobium marinum* skala laboratorium

D. Tujuan

1. Membandingkan rasio kebaruan produksi gas biohidrogen yang dihasilkan dari limbah organik cair molase dan vinasse selama fotofermentasi dengan menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*.
2. Mengetahui produksi gas biohidrogen yang dihasilkan dari limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse selama fotofermentasi dengan menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*.

E. Manfaat

1. Memberikan pengetahuan mengenai sebagai sumber energi bersih terbarukan guna mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi.
2. Memberikan informasi kepada mahasiswa ataupun masyarakat umum terkait produksi biohidrogen dengan memanfaatkan limbah organik melalui fotofermentasi bakteri *Rhodobium marinum*.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Bakteri (*Rhodobium marinum*)

Rhodobium marinum merupakan bakteri ungu non belerang *purple nonsulfur* (PNS) dan bersifat gram negatif. Sel berbentuk basil dan bergerak motil. Bakteri tersebut memiliki beberapa pola nutrisi metabolisme seperti pola nutrisi fotoheterotrof, fotoautotrof dan pertumbuhan kemoheterotrof. Pola nutrisi dari bakteri ini dapat beralih dari satu pola ke pola yang lain tergantung pada ketersediaan sumber karbon (C) dan intensitas cahaya. Jika media mengandung CO sebagai sumber C, bakteri ini akan memiliki pola nutrisi secara autotrof. Jika sumber C adalah asam organik, bakteri ini akan tumbuh secara heterotrof. Ketersediaan sumber cahaya diperlukan untuk pola nutrisi secara fototrof (Prescott 1999).

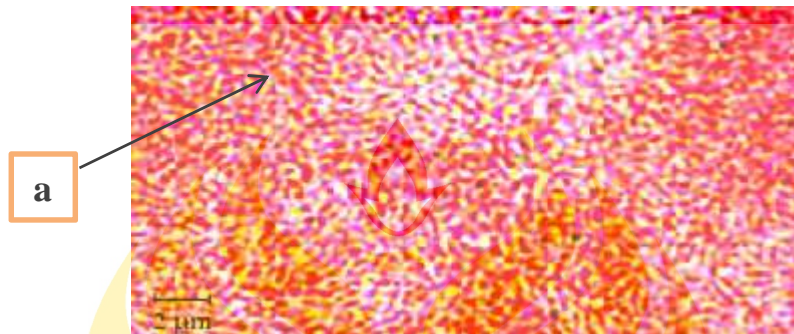
Pertumbuhan fotoheterotrof adalah pola yang disukai untuk produksi hidrogen secara biologis. Istilah "non-sulfur" digunakan karena bakteri ini dianggap tidak menggunakan hidrogen sulfida sebagai donor elektron saat tumbuh secara fotoautotrof. Namun, tidak seperti bakteri sulfur bakteri ini dapat menggunakan sulfida sebagai donor elektron tetapi tidak pada konsentrasi sulfida yang tinggi (Madigan & Martinko 2006).

Bakteri berwarna coklat kekuningan sampai kehijauan dan berwarna coklat gelap, ketika tumbuh dalam keadaan anaerobik bakteri berubah menjadi merah. *Rhodobium marinum* adalah bakteri gram negatif PNS dan termasuk dalam Protobacteria. Taksonomi *Rhodhobium marinum* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Filum : Protobacteria
Classis : Alpha Proteobacteria
Ordo : Rhizobiales
Famili : Rhodobiaceae

Genus : *Rhodobium*
 Species : *Rhodobium marinum*

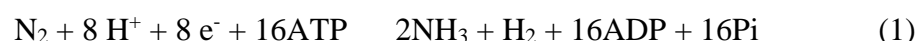
Rhodobium marinum merupakan salah satu bakteri fotosintetik yang dapat memproduksi hidrogen (Kawaguchi *et al.* 2002). Selnya berbentuk batang, gram negatif, bergerak, berwarna pink sampai merah (Gambar 1)



Gambar 1 Morfologi bakteri *Rhodobium marinum* pada fotomikrograph dengan skala 2 μ (a)

Bakteri ini bersifat fotoheterotrof fakultatif dan anaerob yang dapat diisolasi (Hiraishi 1995). Pada proses produksi hidrogen secara fotofermentasi, bakteri PNS ini menggunakan asam-asam organik rantai pendek sebagai donor elektron dan bantuan cahaya matahari dalam pembentukan energi (ATP). Bakteri fotosintetik ini juga dapat mendegradasi senyawa-senyawa organik melalui proses fermentasi gelap lalu memanfaatkan ATP dan senyawa hasil fermentasi (metabolit) sebagai energi dan donor elektron dalam proses produksi hidrogen. Proses biokimia yang terjadi pada bakteri ini dikatalisasi oleh enzim nitrogenase dan hidrogenase (Basak & Das 2007).

Enzim nitrogenase pada bakteri *Rhodobium marinum* dapat memproduksi hidrogen oleh bakteri PNS terjadi terutama oleh enzim nitrogenase. Nitrogenase merupakan kompleks enzim yang bertanggung jawab pada proses fiksasi nitrogen. Ketika molekul nitrogen tersedia, enzim nitrogenase bertanggung jawab untuk mengubah dinitrogen menjadi amonia. Berikut adalah reaksi fiksasi dari nitrogen



Pada kondisi anaerob dan tidak adanya molekul nitrogen, enzim nitrogenase akan mengkatalisis reaksi pembentukan hidrogen dengan persamaan reaksi seperti berikut



Enzim nitrogenase akan mereduksi proton H^+ menjadi gas hidrogen dengan bantuan 7 elektron dalam bentuk ATP dan 7 elektron yang diperoleh dari feredoksin yang teroksidasi. Reaksi tersebut berlangsung dalam keadaan anaerob karena adanya oksigen dapat menurunkan aktivitas enzim nitrogenase (Akköse *et al.* 2008) dan juga dapat menekan sintesis protein komponen nitrogenase (Akköse 2008). Ketiadaan nitrogen membantu nitrogenase mereduksi proton menjadi gas hidrogen. Apabila terdapat cukup nitrogen, nitrogenase akan cenderung mereduksi nitrogen menjadi ammonia (Chen *et al.* 2006).

Enzim hidrogenase merupakan enzim yang mengkatalisis oksidasi reversibel dari H_2 menjadi proton seperti persamaan:



Beberapa mikroorganisme menggunakan enzim hidrogenase dengan tujuan yang berbeda-beda. Beberapa bakteri fermentatif dan alga hijau menggunakan hidrogenase dengan fungsi yang berlawanan, yaitu melepas kelebihan kekuatan reduksi dengan mereduksi proton menjadi hidrogen dan bakteri pemfiksasi nitrogen menggunakan hidrogenase untuk menangkap kembali hidrogen yang telah diproduksi oleh nitrogenase (Basak & Das 2006). Namun adanya enzim hidrogenase juga dapat mengurangi hasil keseluruhan hidrogen karena mengkonsumsi sebagian hidrogen yang telah diproduksi.

B. Hidrogen

Hidrogen merupakan elemen paling sederhana yang ada di dunia. Satu atom hidrogen memiliki satu proton dan satu elektron. Hidrogen adalah elemen paling ringan dan berbentuk gas pada tekanan dan temperatur normal. Dalam bentuk gas, hidrogen (H_2) adalah gas yang tidak berwarna, tidak berbau dan tidak larut di dalam air. Gas hidrogen sangat mudah terbakar dan akan terbakar pada konsentrasi 4% H_2 di udara (Lestari 2004).

Hidrogen adalah gas yang paling melimpah di alam semesta dan merupakan sumber dari energi yang kita terima dari matahari. Matahari pada dasarnya adalah bola raksasa yang tersusun oleh gas hidrogen dan helium. Pada proses terjadinya

fusi, 4 atom hidrogen bereaksi membentuk 1 atom helium dan melepaskan energi berupa radiasi. Energi dari radiasi tersebut merupakan sumber energi paling melimpah yang kita terima. Radiasi memberi kita cahaya dan panas yang membuat tanaman dapat tumbuh.

Adanya panas yang ditimbulkan mengakibatkan angin bertiup dan hujan turun serta tersimpan sebagai energi kimia di dalam bahan bakar fosil. Hampir semua energi yang kita manfaatkan saat ini bersumber dari matahari. Di bumi, hidrogen umumnya ditemukan dalam bentuk komponen dari suatu senyawa. Berkombinasi dengan oksigen, hidrogen membentuk air (H_2O). Kombinasi hidrogen dengan karbon dapat membentuk metana (CH_4), batu bara dan minyak bumi (Anam *et al.* 2012).

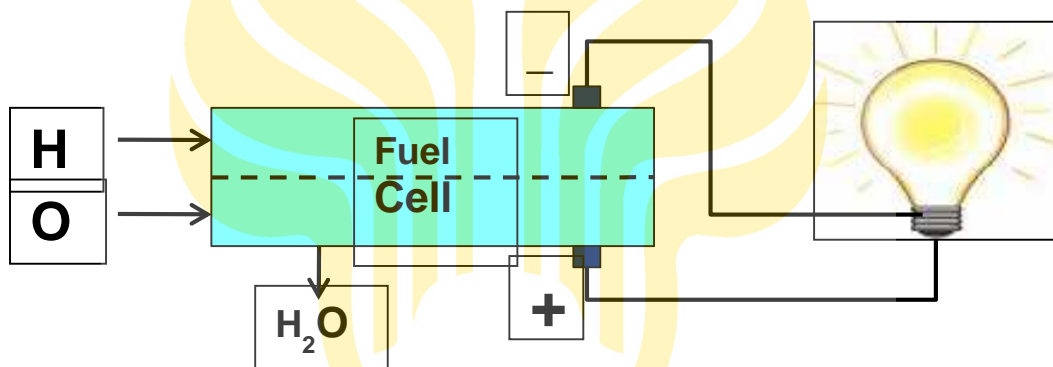
Hidrogen dapat digunakan untuk balon meteorologi karena merupakan gas yang paling ringan. Hidrogen juga digunakan dalam pembuatan margarin dengan mengubah minyak yang merupakan ester tidak jenuh menjadi jenuh dengan bantuan katalis (Lestari 2004). Hidrogen juga dapat digunakan sebagai bahan bakar dan akan menghasilkan energi tiga kali lebih besar dari pada energi yang dihasilkan oleh bensin pada berat yang sama (Kapdan & Kargi 2006).

Seiring berjalannya waktu, pemanfaatan hidrogen sebagai bahan bakar dinilai sangat penting untuk menggantikan peran bahan bakar berbasis fosil yang saat ini keberadaannya semakin sedikit akibat pemakaian yang terus menerus. Selain dapat menghasilkan energi yang cukup besar, hidrogen juga ramah lingkungan karena pembakaran hidrogen tidak mengeluarkan gas yang dapat mengakibatkan polusi dan efek rumah kaca seperti bahan bakar fosil selama ini.

Sisa pembakaran hidrogen hanya menghasilkan uap air sehingga ramah bagi lingkungan. Gas hidrogen dapat diaplikasikan pemanfaatannya sebagai bahan bakar bila disertai dengan sistem *fuel cell* (*hydrogen fuel cell*) sebagai sumber (alat) yang dapat menghasilkan listrik. Kinerja *hydrogen fuel cell* serupa seperti aki (*accu*), hanya saja reaksi kimia penghasil tenaga listrik ini menggunakan hidrogen dan oksigen yang bereaksi dan mengalir seperti aliran bahan bakar melalui sebuah karburator. Tidak ada pembakaran dalam proses pembangkit

listrik ini. Dengan demikian limbah dari proses ini hanyalah air yang aman untuk dibuang.

Secara sederhana proses perubahan energi kimia menjadi listrik dengan perantaraan *fuel cell* dapat dilihat pada Gambar 2. Hidrogen dialirkan melewati anoda dan oksigen/udara dialirkan pada katoda. Pada anoda dengan bantuan katalis, hidrogen dipecah menjadi bermuatan positif dan melepas elektron. Membran di tengah-tengah anoda dan katoda berfungsi mengalirkan proton menyeberang ke katoda. Proton yang tiba di katoda bereaksi dengan oksigen atau udara dan menghasilkan air. Tumpukan elektron di anoda akan menjadi energi listrik searah yang dapat menyalakan lampu (Gambar 2).



Gambar 2 Mekanisme *fuel cell energy* (Ming 2010)

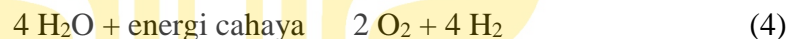
Namun ada hal yang sangat penting yang harus dimengerti mengenai bahan bakar *hydrogen fuel cell* ini bahwa hidrogen di bumi tidak dapat langsung ditambang atau dipanen karena hidrogen biasa ditemukan dalam bentuk komponen dari suatu senyawa. Oleh karena itu, hidrogen perlu diproduksi (Anam *et al.* 2012).

C. Produksi hidrogen secara biologi (Biohidrogen)

Produksi hidrogen secara biologi dapat menjadi alternatif yang digunakan dalam memproduksi gas hidrogen. Ada beberapa mikroorganisme yang dapat menghasilkan gas hidrogen sebagai produk samping pada proses pertumbuhannya dengan menggunakan sumber yang dapat terbarukan seperti air, biomassa dan cahaya matahari. Beberapa mikroorganisme yang dapat menghasilkan hidrogen,

antara lain sianobakteria, bakteri anaerob dan bakteri fotosintetik (Koku *et al.* 2002, Chen *et al.* 2006, Miyake 1998). Semua proses yang melibatkan produksi hidrogen tidak lepas dengan adanya pengaruh enzim yang berperan mengkatalisis diproduksinya gas hidrogen (Hallenbeck & Benemann 2002).

Cyanobakteria memecah air menjadi hidrogen dan oksigen melalui proses fotosintesis (fotolisis). Mikroorganisme ini bersifat fotoautotrof dan tidak memerlukan bahan organik sebagai substrat untuk menghasilkan hidrogen. Mikroorganisme ini menangkap energi dari cahaya matahari yang memecah air menjadi oksigen dan H^+ (persamaan 1). Elektron yang dihasilkan mereduksi feredoxin lalu bergerak ke enzim hidrogenase ataupun nitrogenase yang mengubah proton H^+ menjadi H_2 . Keuntungan dari proses ini adalah dapat mengubah air menjadi hidrogen secara langsung. Tetapi, diproduksinya oksigen sebagai hasil samping proses fotosintesis dapat menghambat kerja dari enzim nitrogenase dan hidrogenase (Hallenbeck *et al.* 2009).

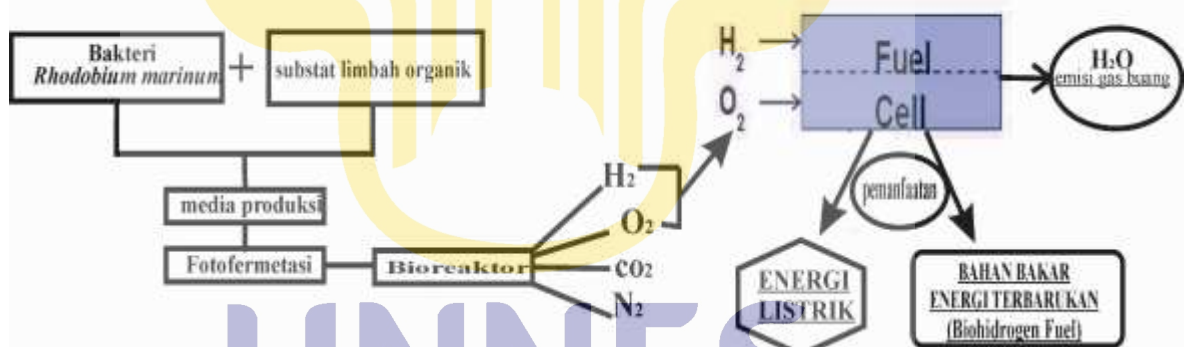


Bakteri anaerob secara heterotrof melalui fermentasi gelap menghasilkan molekul hidrogen dengan memanfaatkan bahan organik sebagai substrat. Bakteri anaerob mengubah substrat organik menjadi senyawa organik yang lebih kecil melalui proses oksidasi. Elektron yang dihasilkan dari proses oksidasi berperan dalam menghasilkan hidrogen sebagai produk samping. Enzim yang terlibat dalam produksi hidrogen pada bakteri anaerob adalah enzim hidrogenase. Keuntungan dari proses ini adalah banyak sumber bahan organik yang dapat digunakan sebagai substrat. Fermentasi juga dapat berlangsung terus karena tidak membutuhkan cahaya dan juga dapat menghasilkan beberapa produk samping berharga seperti asam asetat, asam laktat dan produk lainnya (persamaan 2-6). Akan tetapi, hasil produksi hidrogen hanya sedikit, rasio konversi substrat ke produk kecil (Gambar 3)





Bakteri ungu sulfur dan bakteri ungu non sulfur (PNS) adalah bakteri fotosintetik yang tidak menghasilkan oksigen pada proses fotosintesisnya, tetapi menghasilkan hidrogen sebagai produk samping dengan adanya bantuan cahaya. Produksi hidrogen pada bakteri fotosintetik ini dikatalisis dengan adanya aktivitas enzim nitrogenase dan hidrogenase. Meskipun enzim hidrogenase juga aktif untuk memproduksi hidrogen, akan tetapi enzim ini juga berperan merombak kembali hidrogen yang telah diproduksi (Miyamoto 1997). Bakteri fotosintetik diketahui dapat menghasilkan gas hidrogen lebih banyak dibandingkan bakteri anaerob secara stoikiometri dengan menggunakan glukosa sebagai substrat (Miyake 1998). Bakteri fotosintetik memiliki kemampuan tinggi dalam mengkonversi substrat secara efisien dan dapat menggunakan bermacam-macam substrat untuk produksi hidrogen (Koku *et al.* 2002). Hal ini menjadikan bakteri fotosintetik lebih efisien untuk memproduksi gas hidrogen.



Gambar 3 Sistem produksi pemanfaatan biohidrogen

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

D. Limbah organik cair

1. Limbah organik cair molase

Bahan sisa dari industri gula banyak dijumpai dari berbagai bahan sisa yang dihasilkan salah satunya adalah molase. Terdapat 2 jenis molase yaitu molase kelas 1 dan kelas 2. Molase kelas 1 didapatkan ketika proses pertama kali kristalisasi dengan warna molase bening, untuk molase kelas 2 disebut juga dengan *dark molases* karena memiliki warna coklat kehitaman dan merupakan

hasil kristalisasi kedua (Simanjuntak 2009). Molase memiliki kadar karbohidrat tinggi sebesar 48-60% sebagai gula (Yudith 2010). Molase tidak dapat dikristalkan karena mengandung glukosa dan fruktosa yang sulit mengkristal dengan produk yang masih mengandung asam-asam organik (Simanjuntak 2009)

Molase sebagai media fermentasi digunakan sebagai sumber nutrisi bagi bakteri selama proses fermentasi berlangsung. Bakteri penghasil hidrogen menggunakan gula dari sumber C glukosa sebagai sumber elektron untuk memproduksi biohidrogen. Penambahan substrat gula dimaksudkan untuk mempercepat terbentuknya metabolisme bakteri serta menyediakan sumber energi yang cepat tersedia bagi bakteri (Sutardi 1981).

Fermentasi anaerobik merupakan proses dimana mikroorganisme mendegradasi bahan organik dalam kondisi tanpa oksigen *anaerob*. Hasil samping (limbah) dari industri hidrogen pertanian khususnya yang berkadar garam tinggi biasanya sulit didegradasi oleh mikroorganisme. Hal ini dikarenakan oleh konsentrasi garam tinggi pada lingkungan atau limbah dapat menghambat mikroorganisme mereduksi bahan-bahan organik didalamnya. Garam tinggi dapat menghambat fungsi bakteri metanogen dalam mereduksi bahan organik dan asam asetat menjadi gas atau metan. Reduksi sulfat dan metabolisme H₂ juga dapat terhambat pada konsentrasi garam tinggi (Ayu 2012).

2. Limbah organik cair vinasse

Limbah organik cair vinasse berasal dari pembuatan etanol dan spiritus dengan bahan baku molase hasil industri gula. Jumlah produk vinasse adalah 9-12 kali lipat dari proses destilasi menghasilkan produk etanol itu sendiri karena hasil fermentasi maksimal hanya 10%, sisanya adalah limbah vinasse. Limbah ini tidak layak dibuang di lingkungan karena memiliki beberapa faktor yaitu tingginya kadar COD (asam organik) 80.000-90.000 mg/L, untuk menangani masalah tersebut perlu adanya penelitian yang menjadikan limbah vinasse sebagai biomassa sehingga dapat dijadikan energi alternatif terbarukan (Iqbal 2012).

Karakteristik limbah vinasse berwarna hitam, memiliki pH rendah 4-4.5, dan berbau khas seperti etanol dan spiritus. vinasse tersusun dari 93 % cairan, 7%

mineral organik pekat dan vinasse memiliki beberapa makronutrien diantaranya karbon, potassium, fosfat, sulfat, kalsium, sodium dan beberapa asam organik yang menyusun seperti gliserol, oksalat, asam laktat, asam malat, dan asam asetat (Gopal & Kammen 2009).

Limbah organik cair vinasse selain digunakan untuk memproduksi biohidrogen juga digunakan untuk menangani limbah vinasse yang bersifat toksik dan mencemari lingkungan. Limbah vinasse tersedia melimpah dan tidak komersial sehingga mudah didapatkan untuk bahan baku biohidrogen. Bakteri penghasil hidrogen bisa memproduksi hidrogen dari substrat limbah vinasse sumber C melimpah dalam bentuk COD (asam organik). Sumber C glukosa pada substrat limbah vinasse sangat sedikit, sehingga bakteri dalam memproduksi biohidrogen lebih banyak menggunakan substrat asam organik yang berasal dari COD limbah vinasse (Lin *et al.* 2012).

E. Fotofermentasi

Fermentasi merupakan proses katabolisme yaitu suatu pemecahan senyawa organik yang kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana dengan memanfaatkan senyawa organik untuk pembentukan energi di membran sel (Hidayat 2006, Purwoko 2007). Fermentasi berdasarkan kebutuhan akan oksigen ada dua jenis, yaitu fermentasi aerobik dan anaerobik. Fermentasi aerobik adalah fermentasi yang prosesnya memerlukan oksigen. Adanya oksigen membuat mikroorganisme dapat mencerna glukosa menghasilkan air, karbondioksida dan ATP, sedangkan fermentasi dalam proses anaerobik tidak memerlukan oksigen (Hidayat 2006, Purwoko 2007).

Ada tiga jenis sistem fermentasi yang dioperasikan dalam proses bioteknologi, yaitu sistem kontinu, semikontinu (*fed-batch*), dan diskontinu (*batch*) (Smith 1985). Pada sistem kontinu, pemberian medium dan nutrisi serta pengeluaran sejumlah fraksi dari volume kultur terjadi secara terus-menerus. Sistem semikontinu adalah suatu sistem fermentasi yang medium atau substratnya ditambahkan secara kontinu selama fermentasi berlangsung tanpa mengeluarkan sesuatu dari sistem (Smith 1985). sistem diskontinu, pemberian

medium, nutrisi, dan bakteri dilakukan hanya di awal fermentasi ini berarti tidak ada penambahan medium, nutrisi, dan bakteri selama fermentasi berlangsung. Salah satu sistem fermentasi diskontinu (*batch*) adalah sistem fotofermentasi.

Fotofermentasi adalah salah satu metode terbaik dalam memproduksi gas biohidrogen menggunakan substrat organik (Hallenbeck *et al.* 2009). Mikroorganisme yang mampu menghasilkan gas biohidrogen dari substrat organik selama fotofermentasi termasuk jenis bakteri fotosintetik *ungu non belerang* atau *purple non sulphur* (PNS) dengan menggunakan sumber energi berupa cahaya. (Hallenbeck 2009).

Bakteri fotosintetik PNS ini mendapatkan pola nutrisi fotoheterotrof sehingga dapat memanfaatkan berbagai substrat organik seperti senyawa organik, asam piruvat, asam organik, asam amini, dan karbohidrat (Harwood 2008). Penelitian mengenai produksi biohidrogen dengan sistem fotofermentasi telah dilakukan menggunakan bakteri fotosintetik PNS yaitu: *Rhodobacter sphaeroides* (Kapdan & Kargi 2006, Koku *et al.* 2002), *Rhodobacter capsulatus* (He *et al.* 2003), *Rhodovulum sulfidophilum* W-15 (Maeda *et al.* 2003), dan *Rhodopseudomonas marina* atau *Rhodobium marinum* (Habibi *et al.* 2010). Produksi biohidrogen dengan bakteri *Rhodobium marinum* merupakan penelitian biohidrogen pertama yang dilakukan di Indonesia.

Bakteri fotosintetik PNS dari Genus *Rhodobacter* mendukung potensi lebih besar dan lebih banyak digunakan secara luas untuk penelitian biohidrogen karena memiliki kemampuan lebih baik untuk produksi hidrogen dari senyawa-senyawa organik, gula sederhana (glukosa, fruktosa, sukrosa), asam-asam organik, dan biomassa organik (Han *et al.* 2012). Selain bakteri fotosintetik PNS, efisiensi penggunaan cahaya memegang peran penting sebagai sumber energi untuk lebih meningkatkan produksi biohidrogen yang maksimal selama fotofermentasi (Hellenbeck 2009).

Keuntungan pemakaian sistem fotofermentasi menurut Hellenbeck *et al.* (2009) yaitu cahaya digunakan sebagai sumber energi untuk produksi biohidrogen dengan memanfaatkan substrat-substrat organik yang mudah didapatkan, murah

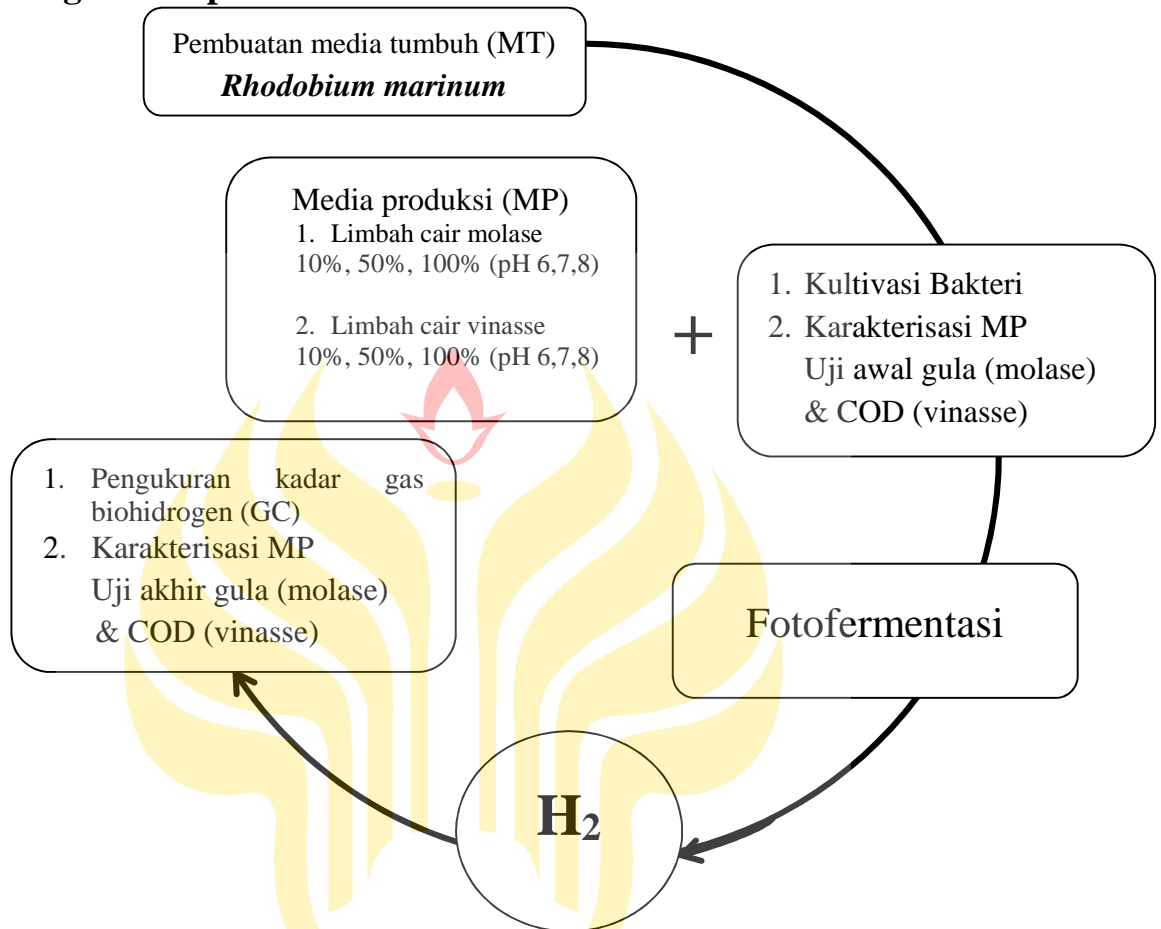
serta ramah lingkungan. Produksi biohidrogen secara biokimia oleh bakteri fotosintetik selama fotofermentasi dibantu oleh katalisasi enzim nitrogenase dan enzim hidrogenase, dan apabila proses fotofermentasi telah habis masih bisa dipakai untuk proses fermentasi gelap (Hallenbeck 2009).

F. Faktor-faktor produksi biohidrogen

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Habibi *et al.* (2010) , menyatakan adanya pengaruh lingkungan yaitu nilai pH, intensitas cahaya, suhu dan kecepatan penggoyangan terhadap produksi hidrogen melalui proses fotofermentasi. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan konsorsium bakteri anaerob dan menggunakan glukosa sebagai substrat. Selain itu, ada penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2009) yang menyatakan adanya pengaruh ion Fe^{2+} terhadap produksi hidrogen melalui proses fotofermentasi menggunakan asetat sebagai substrat dan *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 sebagai mikroba penghasil hidrogen.

Faktor-faktor tersebut juga dapat mempengaruhi kerja enzim nitrogenase. Oleh karena itu, dari informasi di atas, diketahui bahwa baik yang ada di dalam media (internal) maupun di luar media (eksternal) dapat mempengaruhi tingkat produksi hidrogen. Kehadiran enzim hidrogenase dapat mengurangi hasil keseluruhan hidrogen karena mengkonsumsi sebagian hidrogen yang telah diproduksi. Untuk mengatasi masalah ini, enzim hidrogenase dapat dinonaktifkan atau dihapus (Anam *et al.* 2012).

G. Kerangka alur penelitian



Gambar 4 Alur penelitian biohidrogen dari limbah organik cair molase dan vinasse menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan pada bulan Juni 2016 sampai dengan Agustus 2016. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong, Bogor

B. Kultivar dan Substrat Fermentasi Penelitian

1. Kultivar

Kultivar penelitian ini adalah bakteri *Rhodobium marinum* (NBRC 100434) dalam media tumbuh cair 1 liter OD $\pm 1,0$ (45×10^6 /ml), umur 14 hari, suhu ruang 25°C yang diperoleh dari Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, LIPI

2. Substrat fermentasi

Substrat fermentasi dalam penelitian ini adalah substrat limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Substrat limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse.

2. Variabel Terikat

Produksi gas hidrogen dari hasil fotofermentasi menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*.

3. Variabel Kendali

Jumlah kultur bakteri *Rhodobium marinum* (NBRC 100434), konsentrasi limbah, pH limbah, kecepatan shaker 120 rpm, pencahayaan lampu TL (*tubular lamp*) intensitas cahaya 60 watt, dan waktu fotofermentasi.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang di gunakan adalah: 1) timbangan elektrik (Merck) , 2) peralatan gelas:, botol duran (Schoot) kultur 500 ml; 1000 ml, tube (Pyrex) 5 ml, botol serum (Asi) 120ml, gelas kimia (Pyrex), gelas ukur 10 ml ;50 ml;100 ml (Pyrex), corong pemisah (Pyrex), pipet Pasteur, Bulb, labu ukur (Pyrex) 100 ml; 50 ml; 10 ml, kuvet (Pyrex) 1 ml 4) Sentrifuge (Hitachi) 5) Spektrofotometri (Shimadzu) 6) Gas Kromatografi (HP 5890) 7) Mikropipet (Terumo) 200-5000 μ l 8) tube sentrifuge (Pyrex) 15 ml; 50 ml 9) Crimper (Guangxing) 10) Laminar air flow (Hitachi), 11) Autoklaf (Tomy), 12) Shaker (Certomat), 13) lampu TL (Phillips 60 watt) , 14) Syringe & jarum gas (Terumo) 15) Magnetic stirrer (Hitachi) 17) pH meter (Eutech) 18) Lemari asam (Merck) 19) Dry bath (Thermolyn) 20) Water bath (Memmert).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah: 1) kultur bakteri *Rhodobium marinum* (NBRC 100434) 2) media ASYB meliputi: yeast extract 1 gr (Merck), disodium succinate 3,75 gr (Merck), ammonium sulfat 2,7 gr (Merck), basal medium 10 ml (Merck), 5) substrat limbah organik cair molase dan vinasse 6) akuades. 7) gel silicon 8) Fenol 5% (Merck) 9) H₂SO₄ (Merck), 10) Ag₂SO₄ 11) K₂Cr₂ 12) NaOH (Merck) 1 N, 13) HCl (Merck) 1N.

E. Rancangan Penelitian

1. Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial

Percobaan faktorial dapat diaplikasikan terhadap seluruh unit-unit percobaan jika unit percobaan yang digunakan relatif seragam. Rancangan percobaan ini disebut juga dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial). Rancangan acak lengkap dua faktorial bertujuan mengamati pengaruh beberapa faktor dalam suatu penelitian yang sama dan merupakan suatu percobaan yang perlakuannya terdiri atas semua kemungkinan kombinasi taraf

dari beberapa faktor. Percobaan dengan menggunakan f faktor dengan t taraf untuk setiap faktornya disimbolkan dengan percobaan faktorial f^t .

Penelitian ini menggunakan tiga faktor yaitu jenis limbah (limbah cair molase dan vinasse) Konsentrasi limbah (10%, 50%, 100%) dan pH limbah (6, 7, 8). Dengan demikian banyaknya perlakuan yang dilakukan adalah $2 \times 3 \times 3 = 18$ dan diulang sebanyak 3 kali $18 \times 3 = 54$ perlakuan (Tabel 1)

Tabel 1 Rancangan perlakuan untuk limbah organik cair molase dan vinasse

Jenis limbah	Sampel (Konsentrasi dan pH)	Ulangan		
		i	ii	iii
Molase	10 % pH 6	-	-	-
	10 % pH 7	-	-	-
	10 % pH 8	-	-	-
	50 % pH 6	-	-	-
	50 % pH 7	-	-	-
	50 % pH 8	-	-	-
	100 % pH 6	-	-	-
	100 % pH 7	-	-	-
	100 % pH 8	-	-	-
	Vinasse	10 % pH 6	-	-
10 % pH 7		-	-	-
10 % pH 8		-	-	-
50 % pH 6		-	-	-
50 % pH 7		-	-	-
50 % pH 8		-	-	-
100 % pH 6		-	-	-
100 % pH 7		-	-	-
100 % pH 8		-	-	-

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media tumbuh bakteri

Pembuatan medium aSy-Broth dengan Yeast extract 1 gr , Dissodium succinat 3,5 gr, Ammonium sulfat 2.75 gr, Basal medium 10 ml. Melarutkan masing-masing pada aquades sampai 1000 ml pada botol duran 1000 ml, kemudian dilakukan sterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit (Anam 2012).

2. Kultivasi bakteri

Kultivasi bakteri bertujuan untuk menumbuhkan bakteri *Rhodobium marinum*. Media tumbuh (MT) yang telah steril di *adjust*-pH pada *laminar air flow* (LAF) disesuaikan pada pH 7 dengan menggunakan larutan NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N. Media tumbuh (MT) kemudian ditambahkan stok kultur bakteri *Rhodobium marinum* dengan absorbansi (OD) 0,2 atau jika dalam perhitungan total jumlah sel 9×10^6 /ml. Stok bakteri tersebut ditambahkan sebanyak sepersepuluh dari media tumbuh (MT) aSy-B secara aseptis pada *laminar air flow* (LAF), kemudian MT yang telah diberikan stok bakteri di kultivasi dengan *Magnetic stirrer* agitasi 1, disertai lampu TL (*tubular lamp*) 4 x 15 watt dalam suhu kamar. Kultur sel akan dipanen setelah mencapai stasioner OD ± 1 atau lebih dengan ditandai semakin memerahnya warna kultur bakteri. Sampling medium dilakukan selama kultivasi bakteri berlangsung yaitu setiap hari dalam waktu 2 minggu dengan mencari OD bakteri pada hasil media menggunakan metode spektrofotometri. Nilai OD bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm, sehingga nilai OD bakteri tersebut dapat dikonversi menjadi kurva pertumbuhan bakteri (Anam 2012).

3. Persiapan medium produksi

a) Preparasi sampel limbah organik cair

Limbah organik cair molases dan limbah organik cair vinasse diambil dari PT. Madu Baru PG-PS Madukismo, Kasihan, Bantul, Yogyakarta. Limbah tersebut sebelum digunakan sebagai media produksi (MP) terlebih dahulu dipreparasi dengan proses Filtrasi, *adjust* pH, dan Sterilisasi. Proses Filtrasi bertujuan menghilangkan kotoran yang terdapat pada limbah. Setelah proses Filtrasi, limbah (molase & vinasse) dimasukkan masing-masing sebanyak 500 ml pada 3 botol duran 500 ml (molase); 500 ml pada 3 botol duran 500 ml (vinasse). Pengukuran pH limbah dilakukan dengan pH meter dengan indeks pH antara 6-8. Botol ke-1 di *adjust* pH 6; botol ke-2 di *adjust* pH 7, dan botol ke-3 di *adjust* pH 8 dengan katalis NaOH 1N atau HCl 1N. Kemudian ke-6 (enam) botol yang berisi limbah di-Sterilisasi pada Autoklaf suhu 121°C selama 20 menit.

b) Pembuatan medium produksi untuk fotofermentasi

Pembuatan media produksi untuk fotofermentasi dilakukan secara aseptis didalam Laminar Air Flow (LAF) dengan masing-masing limbah menggunakan botol vial 120 ml steril. Volume kerja yang digunakan pada botol vial hanya sebanyak 80 ml. Limbah organik cair molase dan vinasse yang sudah disterilisasi sebelumnya pada autoklaf, yaitu 3 botol duran 500 ml pH (6,7,8) molase dan 3 botol duran 500 ml pH (6,7,8) vinasse, digunakan untuk pembuatan MP fotofermentasi dengan konsentrasi limbah 10 %, 50 %, dan 100% pada botol vial masing-masing perlakuan.

Pembuatan MP pada botol vial dengan konsentrasi 10 % limbah terdiri dari 10 ml limbah organik cair ditambahkan 90 ml aquades (100 ml) kemudian diambil 30 ml untuk uji karakterisasi awal limbah, tersisa (70 ml). Konsentrasi 50 % limbah (molase) terdiri dari 50 ml limbah organik cair ditambahkan 50 ml aquades (100 ml) lalu diambil 30 ml untuk uji karakterisasi awal limbah, tersisa (70 ml). Konsentrasi 100 % limbah (molase) terdiri dari 100 ml limbah organik tanpa tambahan aquades kemudian diambil 30 ml untuk uji karakterisasi awal limbah, tersisa (70 ml).

Sisa dari masing-masing perlakuan pembuatan MP (70 ml) kemudian ditambahkan stok kultur baktereri *Rhodobium marinum* sebanyak 10 ml dengan absorbansi bakteri 0,2 (9×10^6 /ml) untuk mendapatkan volume kerja running fotofermentasi.

Perlakuan pada penelitian ini yaitu konsentrasi (10%=K₁, 50%=K₂, 100%=K₃) dan pH (6=P₁, 7=P₂, 8=P₃). Kedua perlakuan tersebut selanjutnya ditandai dengan K₁P₁=konsentrasi limbah 10% pH 6; K₁P₂= konsentrasi limbah 10% pH 7; K₁P₃=konsentrasi limbah 10% pH 8; K₂P₁= konsentrasi limbah 50% pH 6; K₂P₂=konsentrasi limbah 50% pH 7; K₂P₃= konsentrasi limbah 50% pH 8; K₃P₁=konsentrasi limbah 100% pH 6; K₃P₂= konsentrasi limbah 100% pH 7; K₃P₃= konsentrasi limbah 100% pH 8.

4. Karakterisasi medium produksi

Karakterisasi media produksi dari limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse di karakterisasi untuk mengetahui substrat yang akan dipakai bakteri *Rhodobium marinum* menghasilkan biohidrogen. Limbah organik cair molase dikarakterisasi kandungan gula dari sumber glukosa (C) sedangkan limbah organik cair vinasse dikarakterisasi senyawa organik dari kandungan asam-asam organik *chemical oxygen demand* (COD) limbah. Metode untuk karakterisasi kandungan gula pada limbah organik cair molase menggunakan metode Fenol-Asam sulfat. Limbah organik cair vinasse dikarakterisasi asam organik yang terkandung di dalam limbah menggunakan metode Reaksi Silver-sulfat untuk analisa COD vinasse. Pengukuran kadar gula total dan kadar COD total adalah sebagai berikut:

a) Pengukuran kadar gula total

Analisa gula dilakukan dengan metode fenol-asam sulfat (Dubois *et al.* 1965). Metode ini menggunakan standar gula dan uji gula sampel untuk mendapatkan persamaan matematis analisa gula. Sampel limbah organik cair molase di-uji gula sebelum fotofermentasi untuk mengetahui gula awal total dan di-uji kembali sesudah fotofermentasi untuk mengetahui gula akhir total yang dipakai bakteri selama fotofermentasi. Sampel uji limbah molase diambil sebanyak 0,5 ml kemudian pada lemari asam, sampel uji tersebut ditambahkan larutan 0,5 ml fenol 5 % dan 2,5 ml H₂SO₄ pekat. Campuran tersebut kemudian divortex lalu dipanaskan dengan *water bath* suhu 40°C selama 20 menit, lalu diamkan 10 menit setelah pemanasan selesai. Sampel diperiksa dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm.

Standar gula total dibuat dengan menggunakan larutan glukosa pada kisaran kadar 10-100 ppm untuk mendapatkan persamaan matematis dengan regresi *linier* agar nilai absorbansi sampel gula dapat diubah menjadi ppm. Untuk mengubah ppm menjadi g/l, nilai ppm dibagi dengan 1000. Adapun untuk mengubah ppm menjadi mmol maka kadar gula dalam bentuk ppm dibagi 180 (BM glukosa) lalu dikalikan 1000 (mol ke mmol) dan dibagi 80 (volume media

produksi). Untuk mengkonversi ppm menjadi mili mol (mmol) digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar gula (mmol)} = \frac{\text{Kadar gula sampel}}{\text{BM (glukosa)} \times \text{Vol MP}} \times 1000$$

Keterangan BM: Berat molekul glukosa (g/L)

Vol MP: Volume media produksi (ml)

b) Pengukuran COD asam organik total

Limbah organik cair vinasse tidak memiliki sumber glukosa, oleh karena itu bakteri *Rhodobium marinum* menggunakan asam-asam organik yang terkandung dalam *chemical oxygen demand* (COD) untuk menghasilkan biohidrogen. Pengukuran asam organik dari COD menggunakan reagen Kalium dicromat anhidrat (K_2Cr_2), Silver sulfat Ag_2SO_4 dan Kalium hidrogen petalat (KHP) sebagai larutan standar. Standar COD menggunakan larutan KHP dengan konsentrasi 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 ppm. Analisa uji COD yang dilakukan pada sampel dilakukan sebelum fotofermentasi dan setelah fotofermentasi. Uji COD sampel dilakukan di dalam Lemari Asam dengan mengambil larutan limbah organik cair vinasse 1,25 ml ditambahkan reagen K_2Cr_2 0,75 ml dan Ag_2SO_4 1,75 ml. Larutan sampel ditampung dalam tabung reaksi ulir bertutup dan divortek supaya larutan homogen, kemudian larutan sampel dipanaskan dengan menggunakan *dry bath* selama 2 jam pada suhu $120^\circ C$. Larutan sampel yang sudah di *dry bath* kemudian didinginkan untuk diuji absorbansi dengan Spektrofotometer panjang gelombang = 600 nm. Menurut Lin *et al.* (2012), Pengukuran Kadar COD limbah organik cair vinasse untuk mendapatkan hidrogen yang diproduksi dapat dihitung dengan rumus:

$$HY = \text{Kadar COD sampel awal} - \text{Kadar COD sampel akhir}$$

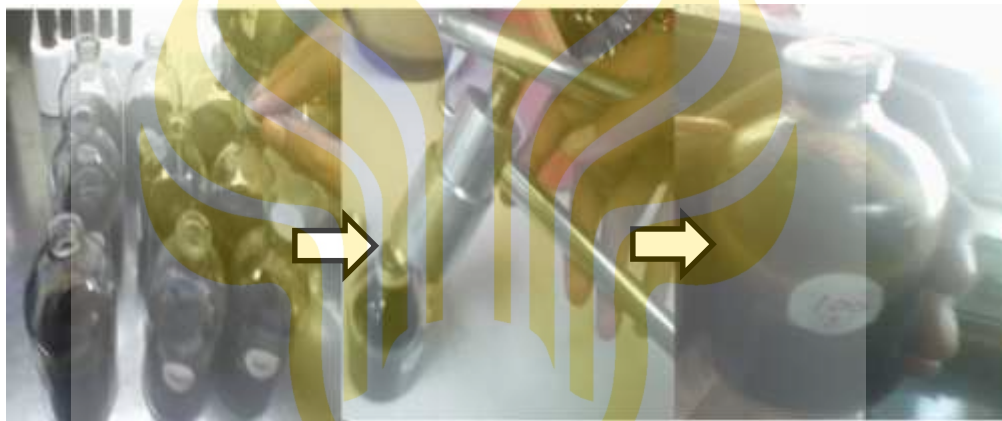
Keterangan HY (Kadar COD): Hidrogen yield production, mmol H_2 /g COD

Kadar COD awal & akhir g COD/l

5. Fotofermentasi

Fotofermentasi merupakan fermentasi menggunakan bakteri fotosintetik dengan bantuan cahaya sebagai sumber energi (Das & Verizoglu 2008). Bakteri fotosintetik yang digunakan adalah *Rhodobium marinum*. Selama fotofermentasi, bakteri *Rhodobium marinum* menggunakan biomassa dari substrat limbah organik cair molase dan vinasse sebagai donor elektron bakteri melakukan metabolisme menghasilkan biohidrogen.

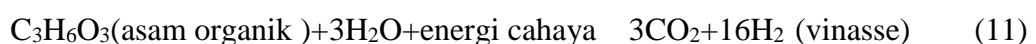
Fotofermentasi dengan limbah organik cair molase dan vinasse yang dilakukan menggunakan botol vial berukuran 120 ml (Gambar 5)



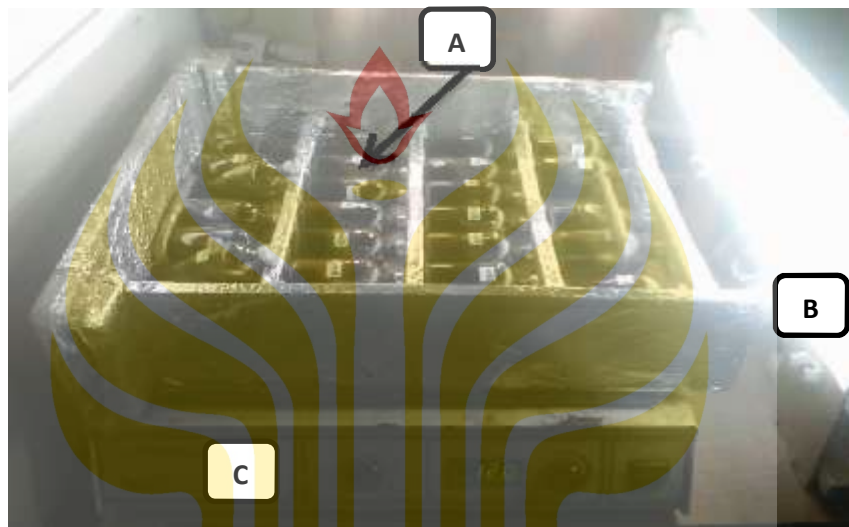
Gambar 5. Bioreaktor Botol vial 120 ml untuk running sistem fotofermentasi (dokumentasi pribadi)

Fotofermentasi dilakukan pada kondisi penggoyangan menggunakan shaker kecepatan 120 rpm. Penggoyangan dilakukan untuk menjaga aerasi dalam larutan. Inkubasi pada suhu ruang $\approx 30^{\circ}\text{C}$ dan pencahayaan lampu TL (*tubular lamp*) intensitas cahaya 60 watt sebagai sumber energi pengganti sinar matahari seperti kondisi lingkungan asli (Gambar 6).

Reaksi yang terjadi selama fotofermentasi berlangsung memiliki persamaan reaksi sebagai berikut:



Fotofermentasi telah menghasilkan gas selama empat hari ditandai dengan adanya perpindahan tekanan air pada botol vial (Habibi *et al.* 2011). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Anam *et al.* (2012) waktu paling signifikan selama fotofermentasi dalam memproduksi gas hidrogen adalah ± 1 minggu.



Gambar 6. Sistem fotofermentasi: (A) botol reaktor, (B) lampu TL, (C) shaker (dokumentasi. pribadi)

6. Pengukuran kadar biohidrogen menggunakan Kromatografi Gas

Produksi gas dapat diketahui dengan berubahnya warna media produksi (MP) menjadi lebih terang saat di fotofermentasi dan timbulnya gelembung busa pada botol vial 120 ml. Pengambilan gas pada botol vial dilakukan dengan *Syringe* gas untuk mengukur gas yang diproduksi setelah fotofermentasi sekaligus untuk uji inject gas ke Gas kromatografi (GC).

Volume gas yang terbentuk dicatat pada setiap waktu pengambilan sampel masing-masing yang diukur oleh skala yang ada pada *syringe*. Gas hidrogen yang ada pada gas yang diperoleh dari proses fermentasi ditentukan persentasenya dengan menggunakan kromatografi gas yang dilengkapi dengan *thermal conductivity detector* (TCD) dan kolom kromatografi gas (*packed column*). Suhu oven di set kemudian dijaga disekitar 80°C, sedangkan suhu untuk *injector* dan *detector* adalah 150°C dan 250°C secara berurut. Gas yang digunakan sebagai

pembawa adalah nitrogen *ultra high purity* (UHP) dengan kecepatan 8 ml per menit. Volume gas yang diinjeksikan setiap sampel substrat limbah adalah 1 ml.

Hidrogen murni digunakan sebagai standar perhitungan kadar hidrogen. Perhitungan kadar gas hidrogen hasil fermentasi adalah dengan membandingkan luas area sampel gas hidrogen hasil fermentasi dengan luas area gas hidrogen murni lalu dikalikan dengan volume produksi gas hasil fermentasi atau dengan menggunakan persamaan matematis dari kurva baku standar hidrogen. Milimol hidrogen dapat dihitung dengan cara membagi volume hidrogen (dalam ml) dengan volume hidrogen pada keadaan standar yaitu 22,4 liter per mol hidrogen. Adapun berat hidrogen (dalam gram) dapat dihitung dengan mengalikan mol hidrogen dengan berat molekul hidrogen ($BM H_2 = 2$). Perhitungan kadar gas hidrogen dari hasil fotofermentasi dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$Kadar H_2 (mmol) = \frac{Luas\ area\ sampel}{Luas\ area\ standar\ hidrogen \times 22,4} \times Volume\ gas\ produksi$$

Keterangan: 22,4= koefisien volume gas pada tekanan dan temperature standar.

G. Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan cara membandingkan rata-rata atau nilai tertinggi dari hasil yang diperoleh dengan menggunakan program Microsoft Office Exel 2010. Untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang nyata atau tidak pada setiap perlakuan maka dilakukan uji *analysis of varian* (ANOVA) satu arah dengan menggunakan SPSS versi 23.

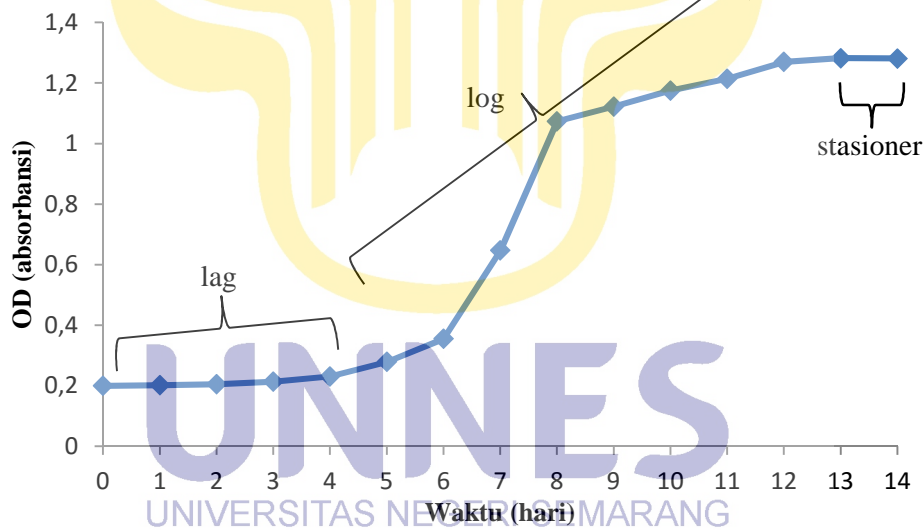
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil penelitian

1. Kultivasi bakteri

Hasil penelitian kultivasi bakteri ini dilakukan dengan pengecekan (OD) Spektrofotometer selama 14 hari dari fase lag sampai fase stasioner. Fase lag dimulai pada hari ke-0 dengan OD 0,200 sampai hari ke-4 yaitu OD 0,231. Fase log berada pada hari ke-5 dengan OD 0,279 sampai hari ke-12 yaitu OD 1,270. Fase stasioner dimulai pada hari ke-13 dengan OD 1,282 dan berakhir sampai hari ke-14 dengan OD 1,282. Rerata kurva pertumbuhan bakteri *Rhodobium marinum* pada penelitian ini terdapat pada Gambar 7.



Gambar 7 Rerata kurva pertumbuhan *Rhodobium marinum*

2. Karakterisasi medium produksi

a) Pengukuran uji awal total pada media produksi limbah cair molase dan vinasse

Uji awal total pada penelitian ini dilakukan sebelum fotofermentasi masing-masing limbah. Hasil karakterisasi uji awal total pada limbah organik cair molase berupa kadar gula total awal dan uji awal total limbah organik cair vinasse

berupa kadar COD total awal. Hasil uji awal total karakterisasi limbah molase dan limbah vinasse hasil data dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Pengukuran uji awal total karakterisasi limbah molase dan vinasse

Jenis limbah	Sampel (Konsentrasi dan pH)	Ulangan			Rata-rata (absorbansi)	Kadar perlakuan	
		i	ii	iii		Gula (g/l)	COD (g COD/l)
Molase	K ₁ P ₁	1,631	1,606	1,586	1,608	1,650	-
	K ₁ P ₂	1,625	1,573	1,625	1,608	1,650	-
	K ₁ P ₃	1,52	1,52	1,791	1,610	1,652	-
	K ₂ P ₁	1,898	1,812	1,822	1,844	1,893	-
	K ₂ P ₂	1,853	1,837	1,854	1,848	1,897	-
	K ₂ P ₃	1,818	1,88	1,851	1,850	1,899	-
	K ₃ P ₁	1,987	1,955	1,973	1,972	2,025	-
	K ₃ P ₂	1,970	1,97	1,986	1,975	2,029	-
	K ₃ P ₃	1,954	1,93	2,017	1,967	2,022	-
Vinasse	K ₁ P ₁	0,031	0,034	0,035	0,033	-	1,604
	K ₁ P ₂	0,032	0,031	0,037	0,033	-	1,604
	K ₁ P ₃	0,033	0,031	0,036	0,033	-	1,604
	K ₂ P ₁	0,159	0,184	0,158	0,167	-	7,307
	K ₂ P ₂	0,145	0,178	0,182	0,168	-	7,396
	K ₂ P ₃	0,149	0,172	0,183	0,168	-	7,373
	K ₃ P ₁	0,324	0,316	0,329	0,323	-	17,396
	K ₃ P ₂	0,314	0,324	0,335	0,324	-	17,796
	K ₃ P ₃	0,326	0,329	0,317	0,324	-	17,773

Keterangan: (-) = tidak dilakukan uji

Untuk limbah molase karena kandungan gulanya masih tinggi sehingga pengukuran uji awal pada Tabel 2 untuk perlakuan limbah cair molase tidak dilakukan uji COD awal total sehingga data tidak ditampilkan pada hasil data penelitian ini, begitu juga untuk perlakuan limbah cair vinasse uji gula awal total tidak ditampilkan pada hasil data penelitian tersebut. Kadar gula total awal menghasilkan nilai paling tinggi berturut-turut 2,025 g/l, 2,029 g/l dan 2,022 g/l pada perlakuan K₃P₁, K₃P₂, dan K₃P₃. Kadar COD total awal pada tabel 2 menghasilkan nilai paling tinggi berturut-turut 17,796 g COD/l pada K₃P₂, 17,773 g COD/l pada K₃P₃, dan 17,396 g COD/l pada K₃P₁.

b) Pengukuran uji akhir total pada media produksi limbah cair molase dan vinasse

Uji akhir total pada penelitian ini dilakukan setelah fotofermentasi masing-masing limbah. Hasil karakterisasi uji akhir total pada limbah organik cair molase berupa kadar gula total akhir dan uji akhir total limbah organik cair vinasse berupa kadar COD total akhir. Hasil uji akhir total karakterisasi limbah molase dan limbah vinasse hasil data dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengukuran uji akhir total karakterisasi limbah molase dan vinasse

Jenis limbah	Sampel (Konsentrasi dan pH)	Ulangan			Rata-rata (absorbansi)	Kadar perlakuan	
		i	ii	iii		Gula (g/l)	COD (g COD/l)
Molase	K1P1	1,343	1,359	1,345	1,349	1,383	-
	K1P2	1,367	1,325	1,397	1,363	1,397	-
	K1P3	1,184	1,127	1,205	1,172	1,201	-
	K2P1	1,42	1,625	1,653	1,566	1,607	-
	K2P2	1,334	1,671	1,846	1,634	1,676	-
	K2P3	1,335	1,352	1,539	1,409	1,445	-
	K3P1	1,739	1,753	1,773	1,755	1,802	-
	K3P2	1,73	1,839	1,753	1,774	1,821	-
	K3P3	1,306	1,395	1,395	1,365	1,365	-
Vinasse	K1P1	0,01	0,019	0,029	0,019	-	0,957
	K1P2	0,009	0,011	0,019	0,013	-	0,957
	K1P3	0,027	0,031	0,036	0,031	-	0,957
	K2P1	0,122	0,103	0,152	0,126	-	4,551
	K2P2	0,126	0,134	0,109	0,123	-	4,373
	K2P3	0,119	0,109	0,118	0,115	-	3,862
	K3P1	0,273	0,263	0,272	0,269	-	14,129
	K3P2	0,231	0,229	0,310	0,257	-	13,284
	K3P3	0,233	0,220	0,223	0,225	-	11,196

Keterangan: (-) = tidak dilakukan uji

Untuk pengukuran uji akhir pada Tabel 3 mengalami penurunan kadar gula dan kadar COD setelah fotofermentasi. Uji akhir pada perlakuan limbah cair molase tidak dilakukan uji COD akhir total sehingga data tidak ditampilkan pada hasil data penelitian ini, begitu juga untuk perlakuan limbah cair vinasse uji gula akhir total tidak ditampilkan. Hasil kadar gula total akhir pada semua perlakuan

mengalami penurunan pemakaian gula setelah fotofermentasi, pemakaian gula paling signifikan yang digunakan oleh bakteri *Rhodobium marinum* dari uji awal sebelumnya berturut-turut terjadi pada perlakuan K₁P₃ sebesar 1,172 g/l, K₂P₃ sebesar 1,445 g/l, dan K₃P₃ sebesar 1,365 g/l.

Uji Kadar COD total akhir semua perlakuan mengalami penurunan pemakaian asam organik oleh bakteri *Rhodobium marinum* dari COD limbah vinasse setelah fotofermentasi. Penurunan paling signifikan pada kadar COD dari uji awal sebelumnya terjadi pada perlakuan K₂P₃ sebesar 3,862 g COD/l dan K₃P₃ sebesar 11,196 g COD/l.

Signifikansi pemakaian substrat dari masing-masing limbah dapat diketahui berdasarkan perhitungan efisiensi substrat yang di pakai bakteri *Rhodobium marinum*. Efisiensi pemakaian substrat pada limbah organik cair molase dan vinasse dapat dilihat pada Gambar 8.

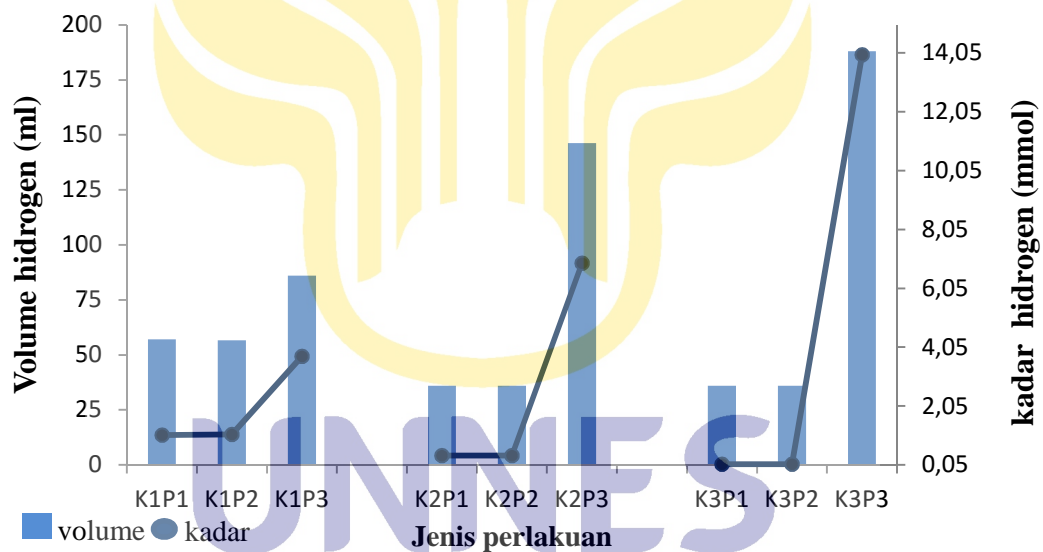


Gambar 8 Efisiensi substrat pada perlakuan limbah cair molase dan vinasse selama fotofermentasi dengan *Rhodobium marinum*

Efisiensi substrat dari limbah cair molase pada (Gambar 8) menunjukkan signifikansi efisiensi paling tinggi berturut-turut pada perlakuan K₃P₃ sebesar 32,49 % , K₂P₃ sebesar 27,30 % dan K₃P₃ sebesar 23,91 %. Pada limbah cair vinasse signifikansi efisiensi substrat paling tinggi berturut-turut pada perlakuan K₂P₃ sebesar 47,62 % dan K₃P₃ sebesar 37,01 %.

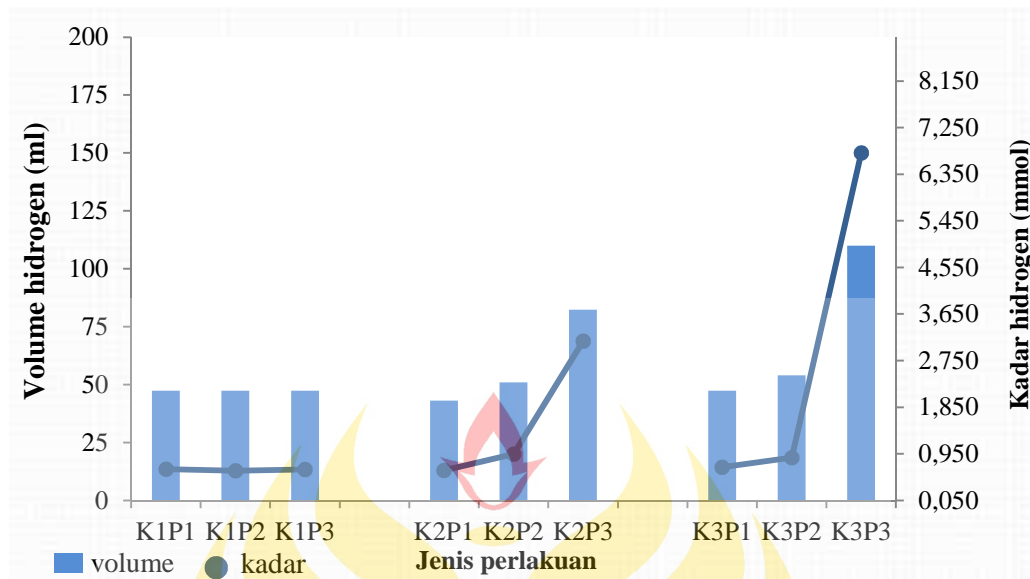
3. Pengukuran kadar gas biohidrogen limbah organik

Kadar gas biohidrogen yang didapatkan dari media produksi masing-masing limbah diukur setelah fotofermentasi hari ke-7. Pada penelitian ini pengambilan sampel gas dari botol vial media produksi diambil menggunakan *syringe gas* 50 ml. Gas yang dihasilkan dapat diketahui jumlahnya dengan menambahkan sisa volume kosong botol vial dari volume kerja media produksi, dengan indikator mililiter (ml) pada *syringe gas*. Berikut ini hasil pengukuran gas yang diproduksi dari fotofermentasi media produksi limbah organik cair molase dapat dilihat pada (Gambar 9) dan limbah organik cair vinasse dapat dilihat pada (Gambar 10)



Gambar 9 Produksi biohidrogen pada fotofermentasi limbah molase dari jenis perlakuan volume dan kadar hidrogen

Produksi gas biohidrogen paling signifikan dari hasil fotofermentasi limbah molase (Gambar 9) berturut-turut pada perlakuan K_3P_3 sebesar 188 ml; konsentrasi hidrogen 13,983 mmol, K_2P_3 sebesar 146 ml; konsentrasi hidrogen 6,903 mmol, dan K_1P_3 sebesar 86 ml; konsentrasi hidrogen 3,742 mmol.



Gambar 10 Produksi biohidrogen pada fotofermentasi limbah vinasse dari jenis perlakuan dengan volume dan kadar hidrogen

Produksi gas biohidrogen paling signifikan dari hasil fotofermentasi limbah vinasse (Gambar 10) berturut-turut pada perlakuan K_3P_3 sebesar 110 ml; konsentrasi hidrogen 6,765 mmol H_2 / g COD dan K_2P_3 sebesar 82 ml; konsentrasi hidrogen 3,125 mmol H_2 / g COD.

4. Perbandingan kebaharuan terhadap produksi biohidrogen limbah

Perbandingan kebaharuan terhadap produksi biohidrogen limbah didapatkan dari efisiensi produk dari substrat yang dikonversi menjadi biohidrogen dengan perhitungan hidrogen secara teoritis. Berdasarkan data hasil hidrogen teoritis produksi biohidrogen dari limbah organik cair molase dan vinasse pada Tabel 4. Hasil hidrogen teoritis pada limbah organik cair molase mendapatkan nilai efisiensi produk tertinggi berturut-turut sebesar 54,592 mmol pada perlakuan K_3P_3 , 37,887 mmol pada perlakuan K_2P_3 .

Pada limbah organik cair vinasse hidrogen teoritis mendapatkan nilai efisiensi produk tertinggi sebesar 40,590 mmol pada K_3P_3 dan 18,750 pada perlakuan K_2P_3 . Perbandingan kebaharuan efisiensi produk gas biohidrogen dari limbah pada penelitian ini mendapat nilai rasio perbandingan untuk molase:vinasse 27:20 pada perlakuan K_3P_3 .

Tabel 4 Perbandingan kebaruan hidrogen teoritis limbah molase dan vinasse

Jenis limbah	Sampel (Konsentrasi dan pH)	Gula total terpakai (mmol)	Hidrogen yield (mmol H ₂ / g COD)	Hidrogen teoritis (mmol)
Molase	K ₁ P ₁	1,852	-	22,222
	K ₁ P ₂	1,752	-	21,019
	K ₁ P ₃	3,138	-	37,658
	K ₂ P ₁	1,990	-	23,883
	K ₂ P ₂	1,534	-	18,414
	K ₂ P ₃	3,157	-	37,887
	K ₃ P ₁	1,551	-	18,614
	K ₃ P ₂	1,441	-	17,297
	K ₃ P ₃	4,549	-	54,592
Vinasse	K ₁ P ₁	-	0,647	3,882
	K ₁ P ₂	-	0,647	3,882
	K ₁ P ₃	-	0,647	3,882
	K ₂ P ₁	-	0,630	3,780
	K ₂ P ₂	-	0,945	5,670
	K ₂ P ₃	-	3,125	18,750
	K ₃ P ₁	-	0,691	4,146
	K ₃ P ₂	-	0,878	5,268
	K ₃ P ₃	-	6,765	40,590

Keterangan: (-) = tidak dilakukan uji

B. Pembahasan

1. Kultivasi bakteri

Menurut Pelczar & Chan (2008), pertumbuhan yang biasa terjadi pada populasi bakteri ialah pembelahan biner pola melintang. Pembelahan biner pola melintang merupakan proses bakteri membentuk dua organisme baru dan masing-masing bakteri yang telah membelah tersebut dapat mengulangi kembali proses pembelahannya, dalam penelitian ini untuk mengetahui rekam pertumbuhan populasi bakteri *Rhodobium marinum* yang melakukan pembelahan dilakukan perhitungan turbidimetri yaitu dengan mengecek *optical density* (OD) selama 14 hari waktu kultivasi pada panjang gelombang 680 nm kondisi tertutup.

OD awal mulai kultivasi stok kultur bakteri yang ditambahkan adalah OD 0,2 atau 9×10^6 /ml bakteri digunakan sebagai awal untuk memulai fase

pertumbuhan bakteri. Bakteri *Rhodobium marinum* dari kultur baru akan menghasilkan gas biohidrogen yang lebih optimal (Kawaguchi *et al.* 2002), maka dari itu peneliti melakukan kultivasi selama 14 hari selain untuk mendapatkan kurva pertumbuhan bakteri juga untuk mendapatkan kultur bakteri baru untuk fotofermentasi. Berdasarkan hasil data kurva pertumbuhan bakteri *Rhodobium marinum* pada Gambar 7, fase pertumbuhan yang dihasilkan selama kultivasi meliputi fase lag, fase log, dan fase stasioner.

Fase lag adalah kondisi setelah sel bakteri dipindahkan ke dalam media tumbuh baru (Purwoko 2007, Prescott 1999, Madigan & Martinko 2006). Sel bakteri *Rhodobium marinum* pada fase lag melakukan proses adaptasi sistem metabolisme sel dan melakukan sintesis enzim baru. Sintesis enzim baru pada sel bakteri *Rhodobium marinum* adalah enzim hidrogenase dan enzim nitrogenase (Anam 2012). Sel bakteri pada fase ini mengalami penambahan volume sel saat kultivasi yang ditandai dengan nilai rentang OD 0,200 sampai 0,231 dari hari ke-0 menuju hari ke-4 dan berubahnya warna media tumbuh menjadi warna merah muda.

Fase log merupakan kondisi ideal dimana sel bakteri melakukan pembelahan sel (Purwoko 2007, Prescott 1999, Madigan & Martinko 2006). Sel bakteri *Rhodobium marinum* mengalami peningkatan jumlah sel yang konstan, hal ini dikarenakan sel bakteri melakukan konsumsi dari nutrisi yang banyak terdapat pada media tumbuh sehingga mengakibatkan aktivitas metabolisme seimbang dengan bertambahnya populasi sel secara teratur. Peningkatan jumlah sel saat kultivasi ditandai dengan nilai rentang OD 0,279 sampai 1,270 dari hari ke-5 menuju hari ke-12 dan berubahnya warna media tumbuh menjadi warna merah.

Fase stasioner merupakan kondisi dimana sel bakteri sudah tidak melakukan pembelahan sel karena ketersediaan nutrisi mulai berkurang pada media tumbuh (Purwoko 2007, Prescott 1999, Madigan & Martinko 2006). Sel bakteri *Rhodobium marinum* mengalami kondisi yang kurang menguntungkan karena nutrisi yang dikonsumsi bakteri dari media tumbuh telah habis. Kondisi lainnya akibat nutrisi telah habis adalah diproduksinya senyawa yang bersifat toksik sehingga menyebabkan beberapa sel bakteri mati sedangkan sel bakteri lain

dan tumbuh secara teratur dan jumlah sel yang hidup menjadi tetap (Pelczar & Chan 2008). Fase stasioner saat kultivasi ditandai dengan nilai OD statis 1,282 selama dua hari pada hari ke-13 sampai hari ke-14 dan berubahnya warna media tumbuh menjadi warna merah tua.

2. Karakterisasi limbah organik

Karakterisasi limbah organik cair molase dan vinasse dari hasil data yang ditunjukkan pada Tabel 2, menunjukkan hasil kandungan gula total awal yang terdapat pada perlakuan limbah molase dan kandungan COD total asam organik pada limbah vinasse. Pemakaian limbah sebagai substrat organik dengan konsentrasi tertentu dapat menguji signifikansi terhadap hasil gas biohidrogen yang diproduksi oleh bakteri fotosintetik (Yetis *et al.* 2000), maka dari itu penelitian ini menggunakan berbagai konsentrasi limbah organik cair molase dan vinasse untuk menghasilkan gas biohidrogen.

Kandungan gula total awal dalam limbah molase dan COD asam organik total awal dalam limbah vinasse pada perlakuan K₃ memiliki kadar tertinggi dikarenakan limbah masih dalam keadaan asli atau tidak ditambahkan aquades untuk mengencerkan limbah seperti pada konsentrasi limbah perlakuan K₁ dan K₂. Karakterisasi setelah fotofermentasi pada Tabel 3 yaitu uji gula total akhir dalam limbah molase dan uji COD asam organik akhir dalam limbah vinasse pada perlakuan K₃ menghasilkan dua macam kondisi. Kondisi pertama terlihat pada perlakuan K₁ dan K₂ telah terjadi penurunan kadar antara kedua limbah yang tidak terpaut jauh, tetapi pada kondisi kedua terlihat pada perlakuan K₃ terjadi penurunan kadar antara kedua limbah yang terpaut jauh dari perlakuan kondisi pertama.

Kedua kondisi tersebut terjadi karena perbedaan pH yang telah di sesuaikan sebelumnya pada uji awal limbah masing-masing konsentrasi, konsentrasi limbah organik pada penelitian ini mendapatkan nilai paling signifikan pada perlakuan P₃ atau pH 8. Hal ini dikarenakan bakteri *Rhodobium marinum* pada pH tersebut dalam memanfaatkan substrat gula glukosa dari limbah molase dan substrat asam organik dari COD limbah vinasse akan lebih optimal

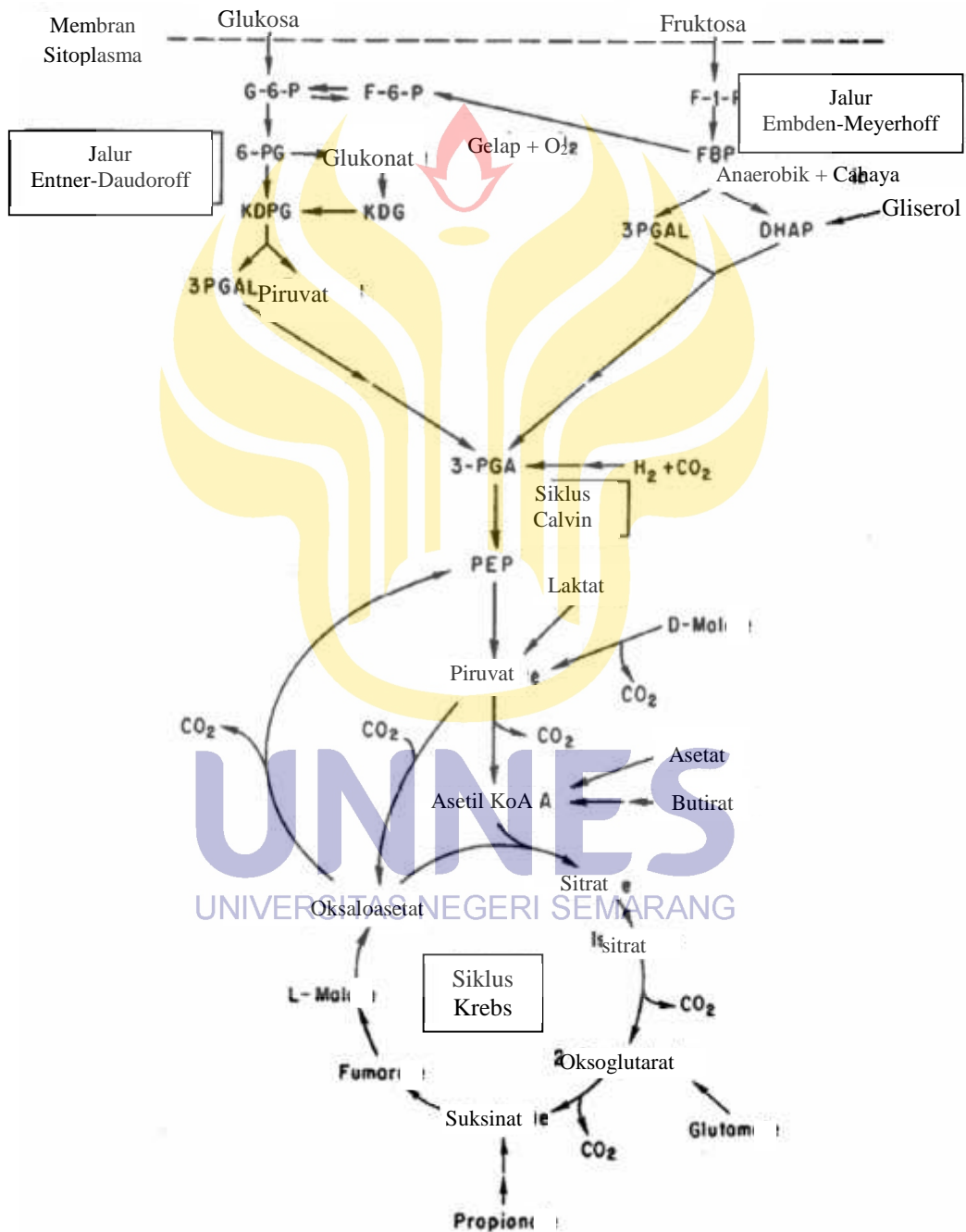
memanfaatkan ATP dan senyawa hasil fermentasi (metabolit) sebagai sumber energi dan donor elektron dalam proses produksi biohidrogen.

Perhitungan efisiensi substrat menurut Koku *et al.* (2002), bertujuan mengetahui signifikansi substrat limbah yang dipakai oleh bakteri untuk mengkonversi substrat menjadi biohidrogen. Efisiensi substrat pada Gambar 8 memperlihatkan bahwa signifikansi pemakaian substrat tertinggi sama pengaruhnya seperti pada karakterisasi uji total sebelumnya yaitu limbah molase dan vinasse rata-rata signifikan pada perlakuan P₃ atau pH 8. Berdasarkan penelitian Lutoslawski *et al.* (2011), peneliti menggunakan bakteri fotosintetik *Rhodospseudomonas paleuris* sebagai agen penghasil biohidrogen dengan memanfaatkan substrat limbah molase dan vinasse memperoleh hasil produksi optimal pada perlakuan limbah pH 8. Penelitian tersebut sama seperti pada penelitian ini bahwa pH 8 berpengaruh pula terhadap kondisi bakteri *Rhodobium marinum* dalam mengkonversi substrat gula glukosa dari molase dan substrat asam organik dari COD vinasse untuk menghasilkan biohidrogen yang lebih optimal.

Efisiensi substrat limbah cair vinasse pada Gambar 8 menunjukkan konsentrasi K₃ lebih rendah dibandingkan perlakuan konsentrasi K₂ karena kondisi larutan media produksi konsentrasi K₃ saat fotofermentasi sudah bersifat jenuh. Kejenuhan larutan pada larutan media produksi limbah vinasse masih murni sehingga menyebabkan efisiensi pemakaian substrat oleh bakteri tidak lebih tinggi dibandingkan konsentrasi pada perlakuan K₂.

Penelitian ini menggunakan substrat gula glukosa dari limbah molase dan substrat asam organik dari COD limbah vinasse dalam pembentukan gas biohidrogen. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Benemann (1996) menyatakan bahwa proses pembentukan gas biohidrogen dari substrat limbah salah satunya bisa menggunakan fermentasi dari limbah organik. Bakteri fermentor akan menghidrolisis polimer menjadi oligomer terlarut dan monomer-monomer melalui enzim ekstraseluler, kemudian produk yang dihasilkan digunakan bakteri untuk difermentasikan membentuk asetat, asam lemak rantai pendek, alkohol, karbondioksida dan hidrogen (Chen *et al.* 2006).

Fermentasi pada proses pembentukan biohidrogen juga menghasilkan produk samping seperti asam butirat, asam asetat, dan asam laktat (Kapdan & Kargi 2006). Proses pemakaian gula glukosa limbah molase dan asam organik dari COD limbah vinasse oleh bakteri selama fotofermentasi dapat dijelaskan melalui siklus Krebs yang ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11 Proses terjadinya glikolisis dan terbentuknya asam organik melalui siklus Krebs (Koku *et al.* 2002)

3. Pengukuran kadar gas biohidrogen limbah organik

Berdasarkan hasil pengukuran gas biohidrogen pada Gambar 9 dan Gambar 10 didapatkan volume gas dari masing-masing perlakuan limbah yang sudah di fotofermentasi. Volume gas dari hasil fotofermentasi limbah molase pada perlakuan konsentrasi K₃, K₂, dan K₁ dengan pH 8, menghasilkan volume gas total yang lebih banyak dibandingkan volume gas yang dihasilkan oleh limbah vinasse pada perlakuan yang sama. Volume gas dari hasil fotofermentasi kemudian di uji kadar gas biohidrogen. Sampel blanko di *inject* terlebih dahulu pada GC menggunakan syringe gas yang telah diisi hidrogen murni sebanyak 1 ml. Sampel blanko tersebut berguna untuk mendapatkan luas area standar hidrogen.

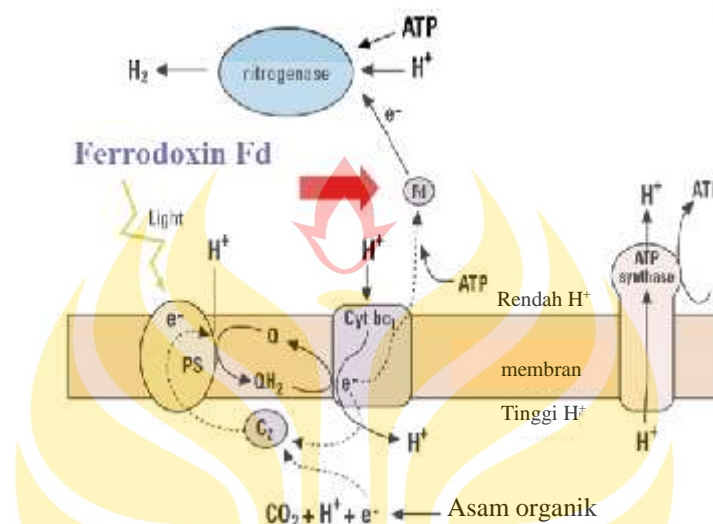
Kadar gas biohidrogen dari hasil fotofermentasi limbah cair molase dan vinasse yang di uji pada kolom kromatografi gas (GC) hanya memerlukan 1 ml gas dari total volume mendapatkan luas area sampel. Blanko dan sampel gas dari limbah molase dan vinasse cukup di uji 1 ml saja pada GC dikarenakan sudah mewakili perhitungan kadar gas mili molar (mmol) dari biohidrogen yang dihasilkan oleh masing-masing limbah (Anam 2012). Data pada Gambar 9 dan Gambar 10 menunjukkan kadar gas dari hasil fotofermentasi limbah molase pada perlakuan konsentrasi K₃, K₂, dan K₁ dengan pH 8, menghasilkan kadar gas total yang lebih banyak dibandingkan kadar gas yang dihasilkan oleh limbah cair vinasse pada perlakuan yang sama.

Kadar gas biohidrogen dari limbah molase yang dihasilkan oleh penelitian ini menunjukkan hasil lebih tinggi dibandingkan limbah vinasse. Hal ini karena kandungan substrat limbah molase lebih banyak mengandung sumber C dalam bentuk gula glukosa dimana bakteri lebih mudah mengkonversi substrat tersebut menjadi biohidrogen (Ike *et al.* 1999).

Mekanisme gas biohidrogen yang diproduksi oleh bakteri fotosintetik melibatkan satu fotosistem (PSI). Keseluruhan proses fotosistem pada *Rhodobium marinum* terjadi didalam membran sel bakteri. Fotosistem pada bakteri ini tidak

cukup kuat memecah air sehingga saat dalam kondisi anaerob bakteri dapat menggunakan asam organik rantai sederhana sebagai donor elektron.

Mekanisme pembentukan gas biohidrogen dalam membran sel bakteri dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12 Mekanisme terbentuknya gas biohidrogen di dalam membran (Akkerman *et al.* 2002) PS= fotosistem, C= plastosianin, Q= kuinon, dan Cyt= sitokrom

Gambar 12 menjelaskan elektron yang dilepaskan dari senyawa organik akan dibawa oleh sejumlah besar pembawa elektron (kuinon dan plastosianin). Selama transport elektron, proton akan melewati membran kompleks protein sitokrom bc 1 dan terjadi gradien proton. Gradien proton kemudian digunakan oleh enzim ATP sintase untuk menghasilkan ATP dan energi ATP yang terbentuk, selanjutnya digunakan untuk transport elektron ke akseptor elektron ferodoksin (Fd) (Chen *et al.* 2006).

Gas biohidrogen terbentuk jika molekul nitrogen tidak ada. Adanya molekul nitrogen dalam ammonia akan menghambat enzim nitrogenase melakukan fiksasi nitrogen sehingga enzim nitrogenase cenderung mengkatalis pembentukan gas biohidrogen (Koku *et al.* 2002), maka dari itu enzim nitrogenase dapat mereduksi proton menjadi gas biohidrogen dengan bantuan energi ATP dan elektron ferodoksin (Fd) (Chen *et al.* 2006). Fotosistem pada bakteri fotosintetik ini mengubah komponen utama dari asam organik menjadi gas biohidrogen dan

karbondioksida sedangkan gas oksigen tidak dihasilkan karena adanya oksigen dapat menghambat kerja enzim nitrogenase mengkatalis pembentukan biohidrogen (Akkerman *et al.* 2002).

4. Perbandingan kebarharuan terhadap produksi biohidrogen limbah

Perbandingan kebarharuan dari limbah dimaksudkan untuk mengetahui kebarharuan produksi biohidrogen yang diperoleh dari substrat limbah organik cair molase dan vinasse dengan cara mengukur perbandingan efisiensi produk dari substrat yang dikonversi menjadi hidrogen. Data pada Tabel 4 menunjukkan hasil hidrogen teoritis dari perlakuan masing-masing limbah setelah fotofermentasi. Hidrogen teoritis tersebut merupakan perhitungan stiokimetri berdasarkan reaksi yang terjadi pada saat proses fotofermentasi dimana bakteri menggunakan substrat gula glukosa (sampel limbah molase) dan substrat asam organik (sampel limbah vinasse) untuk dikonversi menjadi biohidrogen. Reaksi yang terjadi saat fotofermentasi adalah sebagai berikut:



Reaksi pada persamaan 12 menjelaskan bahwa 1 mol glukosa dapat diubah menjadi 12 mol hidrogen dan reaksi pada persamaan 13 menjelaskan 1 mol asam organik dapat diubah menjadi 6 mol hidrogen. Sehingga untuk mendapatkan hidrogen teoritis dari limbah molase dapat ditentukan dengan mengalikan 12 terhadap jumlah gula glukosa terpakai saat fotofermentasi dan untuk mendapatkan hidrogen teoritis dari limbah vinasse maka dapat ditentukan pula dengan mengalikan 6 terhadap jumlah COD asam organik terpakai saat fotofermentasi.

Perbandingan kebarharuan merupakan unsur kebarharuan atau temuan dari suatu penelitian. Menurut Huang (2015), penelitian kebarharuan dikatakan baik jika menemukan unsur temuan baru walaupun memiliki penelitian yang sama dengan penelitian sebelumnya dan penelitian tersebut tidak bisa dikatakan

plagiarisme sepanjang peneliti melakukan pengutipan dari sumber dengan kaidah yang benar sehingga memiliki kontribusi baik untuk ilmu pengetahuan.

Kebaharuan dalam penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian kebaruan *improvement* yang berarti unsur kebaruan atau temuan dalam penelitian ini merupakan peningkatan dari prinsip sebelumnya atau bersifat perbaikan dari penelitian yang sudah ada sebelumnya. Berdasarkan data hasil rasio perbandingan kebaruan pada Tabel 4, menunjukkan bahwa perbandingan kebaruan produksi biohidrogen diperoleh dari hidrogen teoritis, dimana limbah molase dijadikan acuan sebagai kontrol terhadap vinasse.

Kebaharuan produksi biohidrogen dengan nilai kebaruan molase:vinasse sebesar 27:20 pada perlakuan K₃P₃ menunjukkan bahwa potensi lebih besar untuk lebih memanfaatkan banyaknya substrat asam organik dari perlakuan K₃ limbah vinasse (Tabel 4). Substrat asam organik tersebut masih belum terkonversi maksimal dalam media produksi ketika perlakuan K₃ limbah vinasse menghasilkan gas biohidrogen dari 7 hari proses fotofermentasi.

Batasan penelitian produksi biohidrogen melalui fotofermentasi dengan berbagai substrat dari berbagai literatur dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5 Produksi biohidrogen melalui fotofermentasi dengan berbagai substrat dari berbagai literatur.

Substrat	Bakteri	Kandungan substrat	Hidrogen	Referensi
Limbah cair industri tahu	<i>R. sphaeroides</i> RV	TOC	1900 ml/l kultur	Zhu <i>et al.</i> 1999
Asam laktat	<i>R. marinum</i> A-501	sumber C	835 ml/l kultur	Ike <i>et al.</i> 1999
Asam malat	<i>R. marinum</i> A-501	sumber C	524 ml/l kultur	Ike <i>et al.</i> 1999
Asam asetat	<i>R. marinum</i> A-501	sumber C	4,5 ml/l kultur	Ike <i>et al.</i> 1999
Gliserol	<i>R. marinum</i> A-501	sumber C	186 ml/l kultur	Ike <i>et al.</i> 1999
Limbah cair industri susu	<i>R. marinum</i>	sumber C	862 ml/l kultur	Anam 2012
Limbah cair industri kecap	<i>R. marinum</i>	sumber C	1333 ml/l kultur	Anam 2012
Limbah cair industri tapioka	<i>R. marinum</i>	sumber C	191,5 ml/l kultur	Reko 2014
Limbah cair molase	<i>R. marinum</i>	sumber C	678 ml/l kultur	Hasil studi saat ini
Limbah cair vinasse	<i>R. marinum</i>	sumber C	530 ml/l kultur	Hasil studi saat ini

Jumlah biohidrogen yang dihasilkan pada limbah cair molase dan limbah cair vinasse (Tabel 5) pada penelitian ini merupakan jumlah total produksi biohidrogen dari perlakuan yang dilakukan selama 7 hari waktu fotofermentasi. Tabel 5 memberitahukan bahwa adanya perbedaan hasil produksi biohidrogen kemungkinan dapat terjadi karena kemampuan lamanya adaptasi bakteri dalam mengkomsumsi substrat untuk menghasilkan biohidrogen.

Substrat yang berasal dari sumber C gula dan sumber C asam organik yang dipakai sebagai medium produksi oleh *Rhodobium marinum* lebih mudah beradaptasi menghasilkan biohidrogen lebih banyak apabila limbah berada pada keadaan pH 8. Hal ini berbeda dengan hasil produksi biohidrogen limbah cair susu dan kecap yang menghasilkan karena pada penelitian ini medium produksi limbah molase dan vinasse tidak ditambahkan nutrisi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Anam (2012) produksi biohidrogen dengan bakteri yang sama dilakukan perlakuan awal berupa penambahan nutrisi besi (Fe), molybdenum (Mo), dan natrium bikarbonat NaHCO_3 pada medium produksi limbah susu dan kecap menambah produksi biohidrogen lebih banyak dibandingkan tanpa pemberian perlakuan awal penambahan nutrisi pada medium produksi limbah.

C. Analisis data

Uji ANOVA pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan konsentrasi dan pH terhadap jumlah gas biohidrogen yang terbentuk dari limbah molase dan limbah vinasse. Berdasarkan analisis ANOVA diperoleh *p-value* 0,002 pada taraf nyata 0,05. Analisis menunjukkan terdapat perbedaan nyata pada perlakuan konsentrasi dan pH yang berpengaruh terhadap jumlah gas biohidrogen. Artinya perlakuan konsentrasi dan pH limbah berpengaruh terhadap produksi gas biohidrogen, maka dari itu dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan konsentrasi dan pH menggunakan uji LSD. Hasil dari uji LSD dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 Signifikasi perbedaan jumlah produksi biohidrogen antara perlakuan konsentrasi dan pH K₃P₃ dengan perlakuan lainnya pada taraf nyata = 0,05 (hasil uji LSD)

Perlakuan (konsentrasi dan pH)	p-value K ₃ P ₃		Keterangan
	molase	vinasse	
K ₁ P ₁	0,004	0,006	Berbeda nyata
K ₁ P ₂	0,005	0,007	Berbeda nyata
K ₁ P ₃	0,020	0,007	Berbeda nyata
K ₂ P ₁	0,007	0,005	Berbeda nyata
K ₂ P ₂	0,009	0,008	Berbeda nyata
K ₂ P ₃	0,045	0,035	Berbeda nyata
K ₃ P ₁	0,002	0,016	Berbeda nyata
K ₃ P ₂	0,002	0,021	Berbeda nyata

Tabel 6 menjelaskan bahwa jumlah gas yang diproduksi menggunakan menggunakan media produksi pada perlakuan K₃P₃ memiliki taraf yang berbeda nyata dengan media produksi dengan perlakuan konsentrasi dan pH lainnya. Dengan demikian, perlakuan media produksi K₃P₃ merupakan perlakuan yang paling signifikan untuk limbah organik cair molase dan vinasse dalam memproduksi biohidrogen.

BAB V

PENUTUP

A. Simpulan

1. Kebaharuan dalam penelitian ini adalah kebaharuan *improvement* yang didapatkan dari perhitungan stokiometri hidrogen teoritis limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse dari perlakuan K₃P₃ (konsentrasi 100 %, pH 8) dengan rasio perbandingan molase:vinasse yaitu 27:20.
2. Limbah organik cair molase memproduksi gas biohidrogen terbesar pada perlakuan media produksi K₃P₃ (konsentrasi 100 %, pH 8) dengan volume sebesar 189 ml per 10⁻¹ L kultur limbah dari 7 hari waktu fotofermentasi menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*.
3. Limbah organik cair vinasse memproduksi gas biohidrogen terbesar pada perlakuan media produksi K₃P₃ (konsentrasi 100 %, pH 8) dengan volume sebesar 110 ml per 10⁻¹ L kultur limbah dari 7 hari waktu fotofermentasi menggunakan bakteri *Rhodobium marinum*.

B. Saran

1. Limbah organik cair molase dan limbah organik cair vinasse yang diuji untuk penelitian biohidrogen akan lebih baik dalam memproduksi biohidrogen apabila limbah masih dalam kondisi baru, substrat organik dari limbah baru memiliki ikatan rantai senyawa organik yang baik sehingga bakteri *Rhodobium marinum* lebih efisien mengkonversi substrat menjadi biohidrogen.
2. Persiapan media produksi dari masing-masing limbah organik yang akan diuji untuk penelitian biohidrogen harus aseptis pada proses pembuatan media produksi limbah untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang menyebabkan produksi biohidrogen tidak optimal.
3. Peningkatan kinerja bakteri dalam memproduksi biohidrogen selama fotofermentasi menggunakan substrat limbah organik cair molase dan vinasse perlu dilakukan terhadap perlakuan media produksi limbah melalui metode hidrolisis penambahan materi enzimatis maupun kimiawi.
4. Analisis terhadap efisiensi energi biohidrogen yang dihasilkan dari substrat limbah organik cair molase dan vinasse secara fotofermentasi perlu diaplikasikan pada skala lapangan dengan menganalisis secara ekonomi terhadap energi yang dihasilkan dan dibutuhkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akkerman I, Jansen M, Rocha J, Wijffels H. 2002. Photobiological Hydrogen Production Photochemical Efficiency and Bioreactor Design. *Int J Hydrogen Energy*. 27:1195-1208
- Akköse S. 2008. Expression analysis of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* U.001 grown under different physiological conditions. M.Sc. (Thesis) in Biology Department, Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Akköse S, Gündüz U, Yücel M, Ero lu I. 2009. Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrogen Energy* 34:8818-8827.
- Ayu MY. 2012. Kajian Proses Degradasi Bahan Organik Limbah Cair Selama Aklimatisasi pada kondisi Anaerobik dengan Konsentrasi Garam Tinggi. *Jurnal Teknik Pertanian*. Muramus University Press. 2: 184:193
- Anam K, Habibi MS, Herawati TU, Susilaningsih D. 2012a. Photofermentative hydrogen production using *Rhodobium marinum* from bagasse and soy sauce wastewater. *Int J Hydrogen Energy*. 37:15436-15442
- Anam K. 2012b. Studi Pemanfaatan Limba Cair Industri Makanan Lokal untuk Produksi Biohidrogen Menggunakan Bakteri Fotosintetik *Rhodobium marinum*. (Tesis). Sekolah Pasca Sarjana Institute Pertanian Bogor.
- Antonopoulou G, Gavala HN, Skiadas IV, Lyberatos G. 2011. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *I J Hydrogen Energy* 36: 4843-4851.
- Basak N, Das D. 2007. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J Microb Biot* 23: 31-42.
- Benemann J. 1997. Hydrogen Biotechnology : Progress and Prospect. *Nature Biotechnol*. 85:25-33
- Chen WH, Chen SY, Khanal SK, Sung S. 2006. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 31:2170-2178.

- Chen X, Sun Y, Xiu ZL, Li X, Zhang D. 2006. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int J Hydrogen Energy* 31: 539-549.
- Das D, Verizoglu TN,. 2008. Advance in Biological Hydrogen Production Processes. *. Int J Hydrogen Energy* 33:6046-6057.
- Dermirbas A. 2009. Biohydrogen: Green Energy and Technology For Future Engine Fuels Demand. Turki : Sila Science and Energy Press . (6) : 163-214.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers DA, Smith F. 1965. Calorimetric Methode for Determination of Sugar and Related Substrat. *J Anal Chem* 28(3): 350-356.
- Gopal A.R., Kammen D.M. 2009. Molasses for Ethanol : The Economic and Environment Impact of a New Pathway for the Lifecycle Greenhouse Gas Analysis of Surgarcane Ethanol . *Journal Enviromental Research* 4:04405
- Habibi MS, Anam K, Susilaningsih D. 2010. Environmental factors optimization in photo-fermentation to produce biohydrogen by Sanur consortia. Di dalam: Yopi, editor. *ASEAN-Korea Symposium and Workshop on Biorefinery Technology*. Jakarta: LIPI Press.
- Hallenbeck PC. 2009a. Photofermentative Biohidrogen Production. *Montreal University*. Canada : Montreal University Press. *Chapter 7* : 147-155
- Hallenbeck PC, Ghosh D, Skonieczny MT, Yargeau, V. 2009b. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian J Microbiol* 49: 48-59.
- Hallenbeck PC, Benemann JR. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 27:1185-1193.
- Han, H.L., Liu, B.Q., Yang, H.J., Shen, J.Q., 2012. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Int. J. Hydrogen Energy* 37 (17), 12167–12174.
- Harwood, C.S., 2008. Degradation of aromatic compounds by purple nonsulfur bacteria. In: Hunter, C.D., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 28. Springer, The Netherlands, pp. 577–594.
- He, D., Bultel, Y., Magnin, J.P., Roux, C., Willison, J.C., 2005. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to PEM fuel cell. *J. Power Sources* 141, 19–23.

- Hidayat, Huang. 2015. Pentingnya Unsur Novelty dalam Skripsi dan Tesis. *On line at <http://www.globalstatistik.com/pentingnya-unsur-novelty-dalam-karya-tulis-ilmiah-dalam-skripsi-tesis/>* [diakses tanggal 31 Oktober 2016].
- Hidayat MA. 2006. Fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* pada substrat singkong hasil hidrolisis asam [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Hiraishi A, Urata K, Satoh T. 1995. A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. nov. *Int J Systematic Bacteriol*, 45: 226-234.
- Ike A, Murakawa T, Kawaguchi H, Hirata K, Miyamoto K. 1999. Photoproduction of hydrogen from raw starch using a halophilic bacterial community. *J Biosci Bioeng* 88: 72-77.
- Iqbal Safirul B, Muhammad Fauzi, Tantowi Ismail. 1995. Desain Proses Pengelolaan Limbah Vinasse dengan Metode Pemekatan dan Pembakaran pada Pabrik Gula-Alkohol Terintegrasi. *Jurnal Teknik Kimia*. ITS Press. 1(1): 1-6.
- Kapdan IK, Kargi F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Text Book of Enzyme Microb Technol* 38: 569-582.
- Kawaguchi H, Nagase H, Hashimoto K, Kimata S, Doi M . 2002. Effect of algal extract on H₂ production by a photosynthetic bacterium *Rhodobium marinum* A-501: analysis of stimulating effect using a kinetic model. *J Biosci Bioeng* 94: 62-69
- Koku H, Inci E, Ufuk G, Meral Y, Lemi T. 2002. Aspect of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1315-1329.
- Kotay SM, Das D. 2008. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospect and potentials. *Int. J. Hydrogen Energy* 33:258-263.
- Lestari S. 2004. *Mengurai Susunan Periodik Unsur Kimia*. Kawan Pustaka: Jakarta
- Li RY, Fang HHP. 2008. Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. *Int J Hydrogen Energy* 33: 974-980.
- Lin Chiu Yue, Lay Chyi How, Sen Biswarup, Chu Chen Yeon, Kumar Gopalakrishnan Kumar, Chen Chi Chao, Chang Jo Shu . 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and pragnosis . *Int J Hydrogen Energy* 15632:2-37.

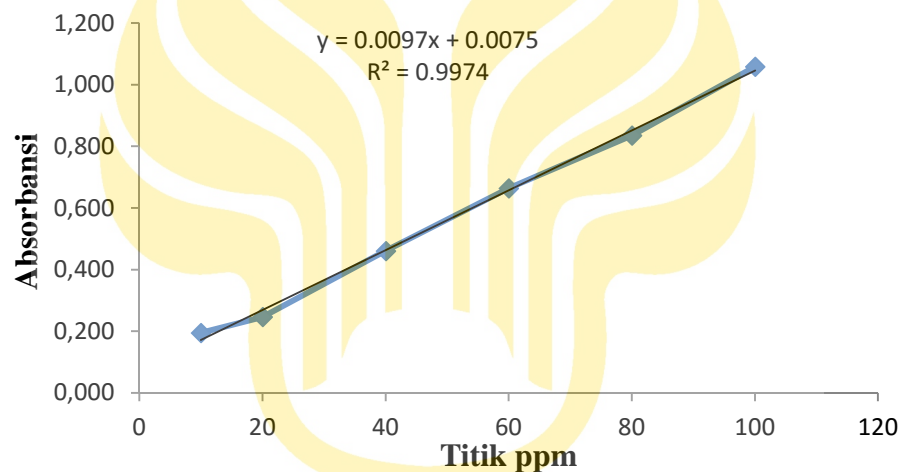
- Lin CY, Lay CH. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy* 29:4-45.
- Liu BF, Ren NQ, Ding J, Xie GJ, Guo WQ. 2009. The effect of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *Int J Hydrogen Energy* 33: 721-726.
- Lutoslawski K, Luty RA, Cibis E, Krzywonos M, Miskiewicz T. 2010. Biodegradation of Beet Molasses Vinasses by a mixed culture of Microorganism: Effect of Aeration Conditions and pH Control. *Int J Enviromental Science* 23:1823-1830.
- Madigan MT, Martinko JM. 2006. *Brock Biology of Microorganism 11th Edition*. The Pearson Practice Hal, Inc.
- Maeda, I., Miyasaka, H., Umeda, F., Kawase, M., Yagi, K., 2003. Maximization of hydrogen production ability in high-density suspension of *Rhodovulum sulfidophilum* cells using intracellular poly (3-hydroxybutyrate) as sole substrate. *Journal Biotechnol. Bioeng.* 81, 474–481.
- Mahyudin AR, Koesnandar. 2006. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Akta Kimindo* 1:73-77.
- Ming H. 2010. Fuel Cell Technology. Disampaikan pada *Pelatihan Renewable Energy and Energy Efficiency* di Singapura tanggal 4 Maret 2010.
- Miyake J. 1998. The science of biohydrogen. Di dalam: Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. New York: Plenum Press.
- Miyamoto K, editor. 1997. *Renewable Biological Systems for Alternative Sustainable Energy Production*. Food and Agriculture Organization (FAO), United Nations, Osaka.
- Okano, Lida Y, Samsuri M, Prasetya B, Usagawa T, Watanabe T. 2006. Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white rot fungi. *Anim Sci J* 77:308-13.
- Pelczar Michael J, Chan ECS, 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadioetomo Ratna, 2008. Edisi Kedua. Jakarta : UI Press.
- Prescott, Lansing M. 1999. *Microbiology Fourth Edition*. The McGraw-Hill Companies.
- Purwoko, Tjahjadi. 2007. *Fisiologi Mikrobia*.. Jakarta : Bumi aksara

- Reko PB. 2014. Pemanfaatan Limbah Cair Industri Pempek Dalam Produksi Biohidrogen Menggunakan Bakteri Fotosintetik *Rhodobium marinum*. *Jurnal Sains dan Teknologi*. UIN Syarif Hidayatulloh Press. 2: 18:19
- Simanjuntak, Riswan. 2009. Studi Pembuatan Etanol Dari Limbah Gula (Molase). *Jurnal Teknologi Pertanian*. USU Press. 20: 714-717
- Sebayang, Firman. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Termobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses*. USU Press. 5(2) 75-80
- Smith JE. 1985. *Prinsip Bioteknologi*. Sumo UF, Sumantri B, Subono A, penerjemah; Jakarta: Gramedia. Terjemahan dari: *Biotechnology Principles*
- Sutardi. 1981. *Landasan Ilmu Nutrisi*. Departemen Ilmu Ternak. Fakultas Ilmu Peternakan. IPB Press.
- Yetis M, Gu U, Eroglu I, Yu M, Tu L. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrogen Energy* 25: 1035-1041.
- Yudith, T. 2010. Pemanfaatan Pelepah Sawit Dari Hasil Industri Gula. *Jurnal Ilmu Ternak*. Departemen Ilmu Ternak. Fakultas Ilmu Peternakan. IPB Press. 2: 54-58.
- Zhu H, Suzuki T, Tsygankov AA, Asada Y, Miyake J. 1999. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int J Hydrogen Energy* 24: 305-310.

Lampiran 1 Kurva standar glukosa untuk limbah molase

Absorbansi standar glukosa untuk limbah molase pada panjang gelombang 490 nm

Standar	Titik (ppm)	Ulangan			Rerata
		a	b	c	
1	10	0.159	0.168	0.223	0.196
2	20	0.216	0.240	0.284	0.247
3	40	0.450	0.472	0.489	0.461
4	60	0.624	0.705	0.735	0.665
5	80	0.819	0.853	0.886	0.836
6	100	1.027	1.046	1.103	1.059



Lampiran 2 Data hasil pengukuran gula total limbah molase

Sampel	Rerata absorbansi (awal)	Rerata absorbansi (akhir)	kadar gula awal (ppm)	kadar gula akhir (ppm)	kadar gula awal (mmol)	kadar gula akhir (mmol)
K ₁ P ₁	1,608	1,349	1650	1383	11,5	9,6
K ₁ P ₂	1,608	1,363	1650	1397	11,5	9,7
K ₁ P ₃	1,610	1,172	1652	1201	11,5	8,3
K ₂ P ₁	1,844	1,566	1893	1607	13,1	11,2
K ₂ P ₂	1,848	1,634	1897	1676	13,2	11,6
K ₂ P ₃	1,850	1,409	1899	1445	13,2	10,0
K ₃ P ₁	1,972	1,755	2025	1802	14,1	12,5
K ₃ P ₂	1,975	1,774	2029	1821	14,1	12,6
K ₃ P ₃	1,967	1,365	2020	1365	14,0	9,5

Contoh perhitungan pengukuran gula total pada perlakuan K₃P₃

Gula total (ppm) : $\frac{(\text{Absorbansi} - 0,0075)}{0,0097} \times \text{faktor pengenceran (fp)}$

$$: \frac{(1,967 - 0,0075) \times 10}{0,0097}$$

$$: 2020 \text{ ppm}$$

Gula total (mmol) : $\frac{\text{kadar gula (ppm)} \times 1000}{\text{BM} \times \text{MP}}$

$$: \frac{2020}{180 \times 80} \times 1000$$

$$: 14,02 \text{ mmol}$$

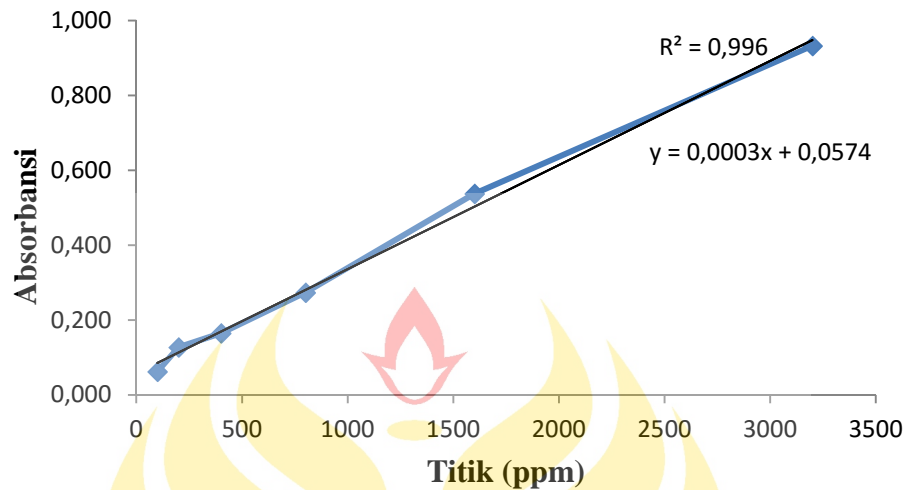
Gula total (g/l) : $\frac{2020 \text{ ppm}}{1000}$

$$: 2,020 \text{ g/l}$$

Lampiran 3 Kurva standar asam organik untuk limbah vinasse

Absorbansi standar glukosa untuk limbah vinasse pada panjang gelombang 600 nm

Standar	Titik (ppm)	Ulangan			Rerata
		a	b	c	
1	100	0.045	0.064	0.078	0.062
2	200	0.106	0.128	0.148	0.127
3	400	0.159	0.169	0.167	0.165
4	800	0.279	0.295	0.245	0.273
5	1600	0.503	0.543	0.565	0.537
6	3200	0.905	0.928	0.965	0.933



Lampiran 4 Data hasil pengukuran asam organik (COD) total limbah vinasse

Sampel	Rerata absorbansi (awal)	Rerata absorbansi (akhir)	kadar COD awal (ppm)	kadar COD akhir (ppm)	Kadar COD (mmol H ₂ / g COD)
K ₁ P ₁	0,033	0,019	1604	957	0,647
K ₁ P ₂	0,033	0,013	1604	957	0,647
K ₁ P ₃	0,033	0,031	1604	957	0,647
K ₂ P ₁	0,167	0,126	7307	4551	0,630
K ₂ P ₂	0,168	0,123	7396	4373	0,945
K ₂ P ₃	0,168	0,115	7373	3862	3,125
K ₃ P ₁	0,323	0,269	17707	14129	0,691
K ₃ P ₂	0,324	0,257	17796	13284	0,878
K ₃ P ₃	0,324	0,225	17773	11196	6,765

Contoh perhitungan pengukuran asam organik total pada perlakuan K₃P₃

As. Organik total (ppm) : $\frac{\text{Absorbansi} - 0,0574}{0,0003} \times \text{faktor pengenceran (fp)}$

$$: \frac{(0,324 - 0,0574) \times 20}{0,0003}$$

$$: 17773 \text{ ppm}$$

As. Organik total (g/l) : $\frac{17773 \text{ ppm}}{1000}$

$$: 17,77 \text{ g/COD}$$

HY Hidrogen yield (mmol H₂/g COD) : kadar COD awal – kadar COD akhir
 : 17,773 – 11,196
 : 6, 765 mmol H₂/ g COD

Lampiran 5 Data hasil pengukuran gas biohidrogen limbah molase
 Luas area standar hidrogen (blanko) : 366743

Sampel	Rerata volume gas produk (ml)	Rerata luas area sampel	kadar gas H ₂ (mmol)
K ₁ P ₁	57	153766	1,067
K ₁ P ₂	57	156255	1,084
K ₁ P ₃	86	357416	3,742
K ₂ P ₁	36	84688	0,371
K ₂ P ₂	36	83952	0,368
K ₂ P ₃	146	387503	6,903
K ₃ P ₁	36	17206	0,075
K ₃ P ₂	36	15685	0,069
K ₃ P ₃	188	611003	13,983

Contoh perhitungan kadar biohidrogen pada perlakuan K₃P₃

Kadar H₂ (mmol) : $\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar hidrogen} \times 22,4} \times \text{Volume gas produk}$

$$: \frac{611003}{366743 \times 22,4} \times 188$$

: 13, 986 mmol

Lampiran 6 Data hasil pengukuran gas biohidrogen limbah vinasse

Luas area standar hidrogen (blanko) : 381245

Sampel	Rerata volume gas produk (ml)	Rerata luas area sampel	kadar gas H ₂ (mmol)
K ₁ P ₁	47	117994	0,654
K ₁ P ₂	47	112489	0,623
K ₁ P ₃	47	116574	0,646
K ₂ P ₁	43	125053	0,630
K ₂ P ₂	51	158219	0,945
K ₂ P ₃	82	324098	3,125
K ₃ P ₁	47	124615	0,691
K ₃ P ₂	54	138891	0,878
K ₃ P ₃	110	525205	6,765

Contoh perhitungan kadar biohidrogen pada perlakuan K₃P₃

Kadar H₂ (mmol) : $\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar hidrogen} \times 22,4} \times \text{Volume gas produk}$

$$: \frac{525205}{38125 \times 22,4} \times 110$$

: 6,765 mmol

Lampiran 7 Dokumentasi penelitian



Pembuatan media tumbuh bakteri

Proses inokulasi bakteri ke *R. marinum* kedalam media tumbuh pada LAFKultivasi bakteri *R. marinum* fase lagKultivasi bakteri *R. marinum* fase logKultivasi bakteri *R. marinum* fase stasioner

Pengecekan pH pada medium produksi Limbah molase dan limbah vinassei



Medium produksi limbah pH 6,7,8
Sebelum disterilisasi pada Autoklaf



Medium produksi limbah pH 6,7,8
Setelah disterilisasi pada Autoklaf



Pemindahan medium produksi dan
inokulasi bakteri *R.marinum* kedalam
botol bioreaktor



Proses fotofermentasi medium produksi
limbah selama 7 hari.



Pengukuran gas biohidrogen hasil
fotofermentasi limbah pada GC



Pembuatan reagen untuk karakterisasi
medium produksi limbah pada lemari
asam

Lampiran 8. Analisis data statistik ANOVA

ANOVA

Hidrogen

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3453,04	18	191,835	34,248	,002
Within Groups	127,214	18	7,062		
Total	3850,355	36			

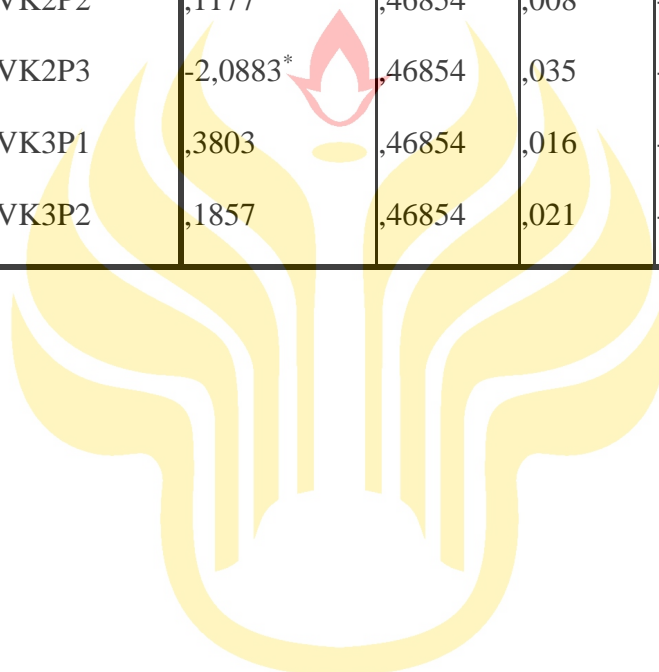
Post Hoc Test**Multiple Comparisons**

Dependent Variable : Hidrogen

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K3P3	MK1P1	-,0113	,46854	,004	-,9616	,9389
	MK1P2	-2,6790*	,46854	,005	-3,6292	-1,7288
	MK1P3	,6960	,46854	,020	-,2542	1,6462
	MK2P1	,6993	,46854	,007	-,2509	1,6496
	MK2P2	-5,8373*	,46854	,009	-6,7876	-4,8871
	MK2P3	,9920*	,46854	,045	,0418	1,9422
	MK3P1	,9987*	,46854	,002	,0484	1,9489
	MK3P2	-12,9287*	,46854	,002	-13,8789	-11,9784

VK1P1	,4127	,46854	,006	-,5376	1,3629
VK1P2	,4440	,46854	,007	-,5062	1,3942
VK1P3	,4210	,46854	,007	-,5292	1,3712
VK2P1	,4233	,46854	,005	-,5269	1,3736
VK2P2	,1177	,46854	,008	-,8326	1,0679
VK2P3	-2,0883*	,46854	,035	-3,0386	-1,1381
VK3P1	,3803	,46854	,016	-,5699	1,3306
VK3P2	,1857	,46854	,021	-,7646	1,1359



UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG