

## PRODUKSI BIOHIDROGEN DARI HIDROLISAT AMPAS TAHU SECARA FERMENTASI ANAEROB MENGGUNAKAN KULTUR CAMPURAN

Amir Husin<sup>1,2\*</sup>, Sarto<sup>2</sup>, Siti Syamsiah<sup>2</sup>, dan Imam Prasetyo<sup>2</sup>)

<sup>1</sup>) Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sumatera Utara  
Jln. Almamater Kampus USU Medan, Telp. (061)8212090

<sup>2</sup>) Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Gadjah Mada  
Jln. Grafika No. 2 Yogyakarta, Telp. (0274)513665

<sup>\*</sup>) Penulis korespondensi: amirhusinika@yahoo.com

### Abstract

**BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM TOFU SOLID WASTES HYDROLISATE BY ANAEROBIC FERMENTATION USING MIXED CULTURE.** *Tofu solid waste is one of the by-products of tofu-processing industry. In this study, batch experiments were carried out to convert tofu solid waste pretreated by different methods into hydrogen using mixed culture. The effects of one-stage (0.5% or 10% HCl) and two-stage (first stage 0.5% HCl) and second stage 10% HCl) pretreatments on the saccharification of tofu solid waste were also studied. Furthermore, the effects of and/or two-stages acid pretreatments on hydrogen production and degradation efficiencies the reducing-sugar (RS) were compared. A maximum total RS yield of 503.73 mg/g-tofu solid waste was obtained from substrate pretreated with two-stages method. It was approximately 4-fold greater than that from substrate pretreated with one-stage method using 0.5% wt HCl. At the reaction condition of 35°C, initial pH = 6.5, and RS concentration based on 2 grams of tofu solid waste pretreated, a maximum cumulative hydrogen yield was 0.928 mmol/g-tofu solid waste from substrate pretreated with two-stages method. It was approximately 1.8-fold greater than that from substrate pretreated with one-stage method using 0.5% wt HCl. The results show that two-stage acid pretreatment can enhancing the amount of reducing sugar in the mixture and hydrogen yield from tofu solid wastes.*

**Keywords:** *acid pretreatment; biohydrogen production; tofu solid waste*

### Abstrak

*Ampas tahu merupakan produk samping industri pengolahan tahu berbahan dasar kacang kedelai (Glycine max). Dalam studi ini, ampas tahu yang telah mengalami perlakuan-awal dengan metode yang berbeda dikonversi menjadi hidrogen menggunakan kultur campuran. Pengaruh perlakuan-awal asam satu-tahap (0,5% dan 10% berat HCl) dan dua-tahap (tahap I 0,5% dan tahap II 10% berat HCl) terhadap sakarifikasi ampas tahu juga diinvestigasi. Lebih lanjut, pengaruh perlakuan awal asam satu-tahap maupun dua-tahap terhadap produksi hidrogen dan efisiensi degradasi gula tereduksi dibandingkan. Yield total gula-tereduksi 503,73 mg/g ampas tahu diperoleh dari perlakuan-awal asam dua-tahap. Nilai ini kurang lebih 4 kali lebih tinggi dibanding hasil dari perlakuan-awal asam satu-tahap menggunakan 0,5% berat HCl. Studi produksi biohidrogen dilakukan secara batch menggunakan kultur campuran dengan kondisi reaksi 35°C dan pH awal 6,5. Hasil percobaan menunjukkan, bahwa yield hidrogen kumulatif maksimum 0,928 mmol/g ampas tahu diperoleh dari perlakuan asam dua-tahap atau meningkat 1,8 kali dibanding perlakuan satu-tahap menggunakan 0,5% berat HCl.*

**Kata kunci :** *perlakuan asam; produksi hidrogen; ampas tahu*

**How to Cite This Article:** Husin, A., Sarto, Syamsiah, S., dan Prasetyo, I., (2014), Produksi Biohidrogen dari Hidrolisat Ampas Tahu Secara Fermentasi Anaerob Menggunakan Kultur Campuran, Reaktor, 15(2), 87-96 <http://dx.doi.org/10.14710/reaktor.15.2.87-96>

## PENDAHULUAN

Penipisan cadangan bahan bakar fosil serta polusi lingkungan akibat penggunaannya telah mendorong upaya-upaya pengembangan bahan bakar alternatif yang dapat diproduksi dari sumber-sumber terbarukan (Chong dkk., 2009). Gas hidrogen ( $H_2$ ) merupakan salah satu kandidat energi yang menjanjikan, karena memiliki nilai kalor yang tinggi, hanya menghasilkan air ketika dibakar, serta dapat diproduksi dari biomassa (Nath dan Das, 2004).

Permasalahan utama industri biohidrogen berbasis biomassa adalah penyediaan suplai substrat yang mudah dicerna oleh aksi-aksi enzimatik atau mikroorganisme. Diantara beberapa metode praperlakuan yang ada, hidrolisis secara kimia merupakan metode yang paling umum diaplikasikan untuk biomassa lignosellulosik (Tahezadeh dan Karimi, 2008). Dengan hidrolisis kimia, laju konversi yang tinggi dapat dicapai dalam waktu yang singkat baik dengan menggunakan asam ataupun alkali.

Hidrolisis bahan-bahan selulosa yang dikatalisis asam dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti: karakteristik bahan, kondisi operasi (jenis dan konsentrasi asam, konsentrasi reaktan, temperatur dan waktu reaksi) (Kumar dkk., 2009). Telah ada sejumlah artikel tentang hidrolisis asam seperti Cao dkk. (2009) menggunakan 12,23%  $H_2SO_4$  untuk menghidrolisis tongkol jagung. Perolehan gula tereduksi dalam hidrolisat adalah 12,23 g/L dan *yield* produksi  $H_2$  adalah 2,24 mol/mol gula. Chang dkk. (2011) menggunakan tiga jenis asam ( $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ , dan  $HCl$ ) untuk menghidrolisis jerami padi dengan konsentrasi 3% (asam/biomassa) pada  $150^\circ C$  selama 1 jam. Perolehan gula tereduksi dalam hidrolisat adalah 35-65 g/L dan *yield* produksi  $H_2$  berturut-turut adalah 0,1911; 0,2906 dan 0,3050 mmol/g jerami. Cui dkk. (2010) menggunakan 4%  $HCl$  untuk menghidrolisis daun poplar. Perolehan gula tereduksi adalah 30% dan *yield* produksi  $H_2$  adalah 33,45 mL/g daun poplar.

Kesuksesan proses fermentasi sangat bergantung pada karakteristik substrat bahan organik yang digunakan. Berbagai jenis komponen bahan organik termasuk lipid, protein dan karbohidrat dilaporkan dapat dicerna oleh bakteri penghasil  $H_2$ . Namun demikian, karbohidrat merupakan substrat yang paling sesuai untuk fermentasi (de Vrije dan Claassen, 2003). Sementara protein dan peptida kurang sesuai sebagai substrat untuk produksi  $H_2$  fermentatif. Suatu studi melaporkan, bahwa *yield*  $H_2$  36–134 mL/g VS diperoleh dari beras, kentang dan selulosa (Dong dkk., 2009). Komposisi substrat bahan-bahan organik (rasio C/N) juga sangat menentukan potensi produksi  $H_2$  dan degradabilitas substrat. Rojas dkk. (2010) melaporkan, bahwa peningkatan rasio C/N dari 40-190 meningkatkan *yield*  $H_2$  dari sukrosa.

Ampas tahu merupakan limbah organik padat yang dihasilkan oleh industri pengolahan tahu berbahan dasar kacang kedelai (*Glycine max.*). Dalam pemrosesannya, diperkirakan sekitar 2750 ton ampas

tahu akan dibangkitkan oleh industri ini setiap harinya di seluruh Indonesia (Menristek, 2010). Sebagian kecil ampas tahu dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan pakan ternak, sisanya diinsinerasi dan/atau dibuang sebagai limbah (Kim dkk., 2010). Namun demikian, karena limbah padat ini mengandung bahan organik yang tinggi (40-60% karbohidrat), ampas tahu sangat potensial dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk produksi biohidrogen. Heksosa dan pentosa yang merupakan molekul gula sederhana penyusun selulosa dan hemiselulosa dapat difermentasi oleh bakteri *Clostridium* melalui jalur glikolitik menghasilkan hidrogen (Moreno dan Gomez, 2012).

Telah ada upaya pemanfaatan ampas tahu sebagai substrat organik untuk produksi biohidrogen. Noike dan Mizuno (2000) dan Kim dkk. (2010) melaporkan *yield* hidrogen berturut-turut 2,54 dan 1,87 mol/mol heksosa dari hidrolisat ampas tahu yang difermentasi menggunakan kultur campuran. Perlu dicatat, bahwa perhitungan *yield* hidrogen yang dilaporkan dalam kedua literatur tersebut didasarkan pada konsumsi karbohidrat terlarut. Kelarutan karbohidrat dalam air (tanpa penambahan asam) hanya sekitar 13% dari massa awal ampas tahu (Kim dkk. 2010). Noike dan Mizuno (2000) juga melaporkan, bahwa fraksi padat yang tidak larut tidak mengalami degradasi selama fermentasi  $H_2$ . Oleh karena itu, jumlah produksi gas  $H_2$  yang dilaporkan masih jauh lebih rendah dibandingkan potensi bio $H_2$  yang terkandung dalam substrat ampas tahu. *Yield* hidrogen yang rendah dari bahan-bahan selulosik secara umum berkaitan dengan efisiensi hidrolisis serat selulosa yang rendah (Tahezadeh dan Karimi, 2008).

Efisiensi hidrolisis bahan-bahan lignosellulosik dapat ditingkatkan melalui perlakuan substrat antara lain hidrolisis kimia menggunakan asam encer ( $\leq 1\%$   $HCl$  atau  $H_2SO_4$ ). Hidrolisis asam encer akan menghasilkan solubilisasi substrat secara parsial dan pembentukan gula tereduksi sebagai produk akhir (Camacho dkk., 1996). Namun, *yield* maksimum gula tereduksi dari hidrolisis selulosa dengan katalis asam-encer umumnya kurang dari 20% (Tahezadeh dan Karimi, 2008).

Valdez-Vazquez dan Poggi-Varaldo (2009) menggambarkan dasar-dasar produksi hidrogen secara fermentatif. Substrat berbasis-gula pertama-tama difermentasi menjadi pyruvat, kemudian dikonversi lebih lanjut menjadi biomassa, ATP dan produk-samping, seperti hidrogen, asam-asam lemak volatil (VFA) dan alkohol (Moreno dan Gomez, 2012). Asetat dan butirat merupakan produk-samping utama yang tergabung dengan produksi hidrogen (Nandi dan Sengupta, 1998). Secara teoritis, *yield* hidrogen tertinggi jika asetat atau butirat merupakan metabolit terlarut tunggal sebagaimana ditunjukkan dalam persamaan (1) dan (2) berturut-turut adalah 4 dan 2 mol  $H_2$ /mol heksosa (Moreno dan Gomez, 2012).



Namun demikian, *yield* hidrogen aktual boleh jadi lebih rendah dibanding nilai teoritisnya. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan adanya jalur degradasi substrat tanpa produksi hidrogen atau hidrogen yang diproduksi boleh jadi dikonsumsi untuk menghasilkan produk-samping lainnya, seperti propionat (Valdez-Vazquez dan Poggi-Varaldo, 2009).

Dalam studi ini, metode perlakuan awal asam dua-tahap dipertimbangkan untuk meningkatkan kelarutan karbohidrat. Tahap pertama adalah perlakuan asam encer (0,5% berat HCl) sebagaimana disarankan oleh Kim dkk. (2010). Dalam tahap kedua, fraksi padatan sisa dari praperlakuan tahap pertama dihidrolisis kembali menggunakan asam 10% berat HCl. Metode praperlakuan dua-tahap dipertimbangkan akan mempengaruhi baik konversi ampas tahu menjadi gula tereduksi maupun kinerja fermentasi untuk produksi hidrogen. Tujuan khusus studi ini adalah mengevaluasi pengaruh perlakuan asam satu-tahap (0,5% atau 10% HCl) dan dua-tahap (0,5% diikuti dengan 10% HCl) terhadap potensi produksi hidrogen dari ampas tahu.

**METODE PENELITIAN**

**Perlakuan-Awal Ampas Tahu dengan Asam**

Bahan ampas tahu diperoleh dari pengrajin industri tahu yang terdapat di sekitar kota Yogyakarta. Sebelum digunakan, ampas tahu dikeringkan dalam oven pada temperatur 105°C, kemudian dihaluskan menggunakan mesin grinding dan diikuti dengan pengayakan untuk menyeragamkan ukuran bahan.

Bahan ampas tahu kering dihidrolisis secara kimia dengan satu-tahap atau dua-tahap menggunakan HCl sebagai katalis (Gambar 1). Rancangan percobaan perlakuan asam ampas tahu dengan satu-tahap dan dua-tahap dapat dilihat dalam Tabel 1.

Prosedur perlakuan awal ampas tahu menggunakan asam ini didasarkan pada percobaan

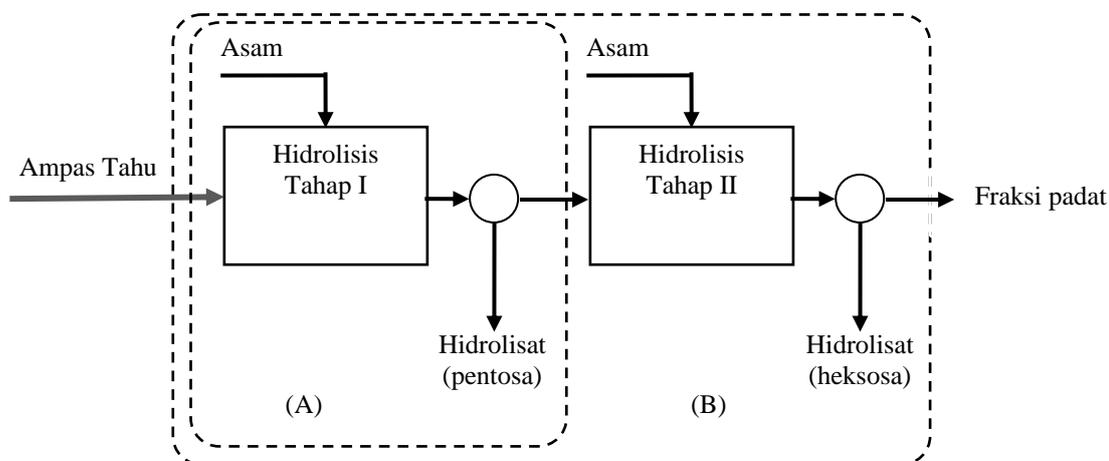
Kim dan Lee (2010) yang dimodifikasi. Dalam hidrolisis satu-tahap (Gambar 1.A), sejumlah 200 mL larutan HCl dengan kadar 0,5% atau 10% berat dipanaskan dalam reaktor hingga mencapai titik didihnya. Ke dalam larutan ditambahkan ampas tahu kering pada ratio 1:20 (g TS/volume) dan dipanaskan pada temperatur didihnya (104±2°C) selama 30 menit. Dalam hidrolisis asam dua-tahap (Gambar 1.B), ampas tahu yang telah mengalami hidrolisis menggunakan 0,5% HCl (sebagai tahap I) dipisahkan dari campuran. Fraksi padatan dihidrolisis kembali menggunakan 10% berat HCl (sebagai tahap II) sebagaimana tahap I, tetapi dengan rasio fraksi padat terhadap pelarut 1:20 (g TS/volume). Pada setiap akhir proses hidrolisis, campuran dinetralisasi menggunakan larutan 10% CaO.

Tabel 1. Rancangan percobaan hidrolisis ampas tahu

Perlakuan	Kode	Kondisi Operasi
A	HA-0	0 % HCl (Kontrol)
	HA-1	0,5% HCl
	HA-2	10% HCl
	HB-0	Tahap I: 0,5% HCl; Tahap II : 0 % HCl
B		(Kontrol)
	HB-1	Tahap I: 0,5% HCl; Tahap II : 10 % HCl

Keterangan:

- A : Perlakuan asam satu-tahap; rasio solid/pelarut 1:20 (g/v); 30 menit
- B : Perlakuan asam dua-tahap;  
Tahap I: Rasio solid/pelarut 1:20 (g/v); 30 menit  
Tahap II: Rasio solid/pelarut 1:10 (g/v); 60 menit



Gambar 1. Diagram hidrolisis asam ampas tahu (A). Satu-tahap, (B) Dua-tahap

Ampas tahu dan fraksi padat ampas tahu yang telah mengalami praperlakuan asam satu-tahap dianalisis untuk mengetahui kandungan total solid (TS), karbohidrat, protein, lemak, kadar air dan abu. Sementara hidrolisat juga dianalisis untuk kandungan gula tereduksi, furfural, COD serta nitrogen total (total-N). Analisis kandungan gula tereduksi menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) (Miller, 1972). Analisis furfural menggunakan metode White (1979), dan COD menggunakan metode open reflux sesuai dengan metode standar.

**Detoksifikasi Hidrolisat dengan Adsorpsi Karbon Aktif**

Untuk menghilangkan furfural, HMF, serta senyawa-senyawa fenolik yang bersifat toksik terhadap mikroorganisme, hidrolisat dari perlakuan awal menggunakan asam pekat (10% HCl) dikontakkan dengan karbon aktif (1,5% berat/volum) sambil diaduk menggunakan motor pengaduk selama satu jam. Hidrolisat yang telah didetoksifikasi kemudian disaring dan larutan dikumpulkan untuk proses fermentasi (Chang dkk., 2011). Kandungan gula tereduksi dan HMF dari hidrolisat juga ditentukan.

**Uji Potensi Produksi Biohidrogen Mikroorganisme**

Inokulum yang digunakan untuk uji produksi H<sub>2</sub> adalah *sludge* yang diperoleh dari buangan instalasi pengolahan limbah cair tahu yang memproduksi biogas. Sebelum digunakan, *sludge* disaring terlebih dahulu untuk menyisihkan kotoran kasar (seperti pasir atau bahan-bahan padat kasar lainnya). Inokulum disimpan pada kondisi anaerobik sebelum digunakan. Untuk menyeleksi bakteri penghasil hidrogen dari *sludge* anaerobik, dilakukan perlakuan-panas yaitu dengan cara mendidihkannya pada temperatur 100°C selama 30 menit (Dong dkk., 2009). Konsentrasi total solid dan COD inokulum yang digunakan berturut-turut 5,7 g/L dan 3,35 g/L.

**Produksi H<sub>2</sub> dengan fermentasi gelap**

Uji potensi produksi H<sub>2</sub> dari hidrolisat ampas tahu dilakukan dalam reaktor 250 mL dengan volume kerja 100 mL. Ke dalam masing-masing reaktor ditambahkan hidrolisat ampas tahu yang telah mengalami perlakuan awal dengan volume tertentu. Jumlah substrat yang ditambahkan didasarkan pada volume hidrolisat yang dihasilkan dari 2 g ampas tahu. Untuk menghindari pengaruh akibat inhibisi substrat, volume substrat dari perlakuan 10% HCl didasarkan pada volume hidrolisat yang dihasilkan dari 1 g ampas tahu (Tabel 2). Sebanyak 10 mL inokulum yang telah mengalami perlakuan-panas, 25 mL nutrisi dan

buffer, serta air destilasi ditambahkan ke dalam tiap reaktor sehingga volume campuran akhir 100 mL. Konsentrasi nutrisi dan buffer dalam medium didasarkan pada percobaan Cui dkk. (2010) seperti ditunjukkan dalam Tabel 3. Nilai pH awal campuran diatur menjadi 6,5 dengan penambahan HCl 5M atau NaOH 5M. Selanjutnya campuran di *flush* dengan gas N<sub>2</sub> selama 3 menit untuk memastikan kondisi anaerob dan terakhir ditutup dengan sumbat karet. Percobaan produksi H<sub>2</sub> dilakukan dengan menginkubasi campuran pada kondisi mesofilik (35-37°C) dalam *water bath*. Laju produksi biogas dan konsentrasi biohidrogen dimonitor selama percobaan dengan menggunakan 10 mL *syringe* setiap 20-24 jam. Kandungan hidrogen dalam biogas dianalisis menggunakan chromatografi gas (GC). Pada setiap pengeluaran isi reaktor dilakukan analisis pH, dan pada akhir percobaan dilakukan analisis kandungan gula tereduksi.

Tabel 2. Rancangan percobaan uji produksi H<sub>2</sub>

Tipe Substrat	Basis	Perlakuan-awal
SH1-0 (kontrol)	2 g AT	1 tahap (0% HCl)
SH1-1	2 g AT	1 tahap (0,5% HCl)
SH1-2 <sup>a</sup>	1 g AT	1 tahap (10% HCl)
SH2-0 (kontrol)	2 g AT	2 tahap (0% HCl)
SHM <sup>a</sup>	1 g AT	2 tahap (0,5% dan 10% HCl)

Keterangan :

AT : Ampas Tahu, SHM : Hidrolisat campuran dari perlakuan 2 tahap

<sup>a</sup> hidrolisat setelah detoksifikasi menggunakan karbon aktif

Tabel 3. Nutrien dan buffer untuk uji produksi H<sub>2</sub>

Komponen	C (mg/L)	Komponen	C (mg/L)
FeCl <sub>3</sub>	100	CoCl <sub>2</sub>	21
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	66	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	360	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	30
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	48	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000
ZnCl <sub>2</sub>	23		

Sumber : Cui dkk. (2010)

**Analisis Data**

Untuk menentukan laju produksi hidrogen dan parameter-parameter kunci lainnya dari fermentasi-anaerob, persamaan Gompertz yang dimodifikasi diaplikasikan untuk mencocokkan data produksi biogas kumulatif. Persamaan Gompertz digunakan untuk memprediksi pengaruh faktor perlakuan terhadap parameter proses antara lain laju produksi biogas maksimum, potensi produksi biogas dan waktu adaptasi mikroorganisme (*lag time*) untuk memproduksi biogas (Cui dkk., 2010). Persamaan Gompertz yang dimodifikasi ditunjukkan dalam persamaan 3.

$$H(t) = H_{maks} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m e}{H_{maks}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \tag{3}$$

Tabel 4. Hasil hidrolisis ampas tahu menggunakan asam

Perlakuan	Konsentrasi HCl (%)	Berat awal sampel (g TS)	Gula Tereduksi			HMF (mg/L)
			Kadar GT (g/L)	Massa GT (mg)	$Y_{GT}$ (mg GT/g AT)	
HA-0 (kontrol)	0 %	12,5 <sup>a</sup>	0,498	102,59	8,21	0,756
HA-1	0,5 %	12,5 <sup>a</sup>	8,333	1799,93	143,99	2,287
HA-2	10 %	12,5 <sup>a</sup>	24,537	5398,14	431,85	158,838
HB-0 (kontrol)	0 %	20 <sup>b</sup>	0,138	13,8	0,69	1,497
HB-1	10 %	20 <sup>b</sup>	46,047	7194,84	359,74	461,525

Keterangan : GT : Gula tereduksi;  $Y_{GT}$  : Yield gula tereduksi, TS : total solid; AT : ampas tahu  
<sup>a</sup> ampas tahu; <sup>b</sup> fraksi solid

Dimana H = volume biogas kumulatif (mL), t = waktu reaksi (jam), Rm = laju produksi biogas maksimum (mL/jam), Hmaks = potensi produksi biogas (mL), λ = waktu adaptasi (*lag time*) untuk memproduksi biogas (jam).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hidrolisis Asam Ampas Tahu

Berdasarkan hasil uji laboratorium, kandungan bahan ampas tahu yang digunakan dalam studi ini terdiri dari 34,86% hemiselulosa, 38,61% selulosa, 5,64% lignin, 16,37% protein, 7,69% lemak dan 3,76% abu (basis kering).

Pengaruh konsentrasi asam terhadap kadar gula tereduksi (GT) dari hasil hidrolisis ampas tahu dengan satu-tahap atau dua-tahap ditunjukkan dalam Tabel 4. Dalam hidrolisis satu-tahap, bilamana 12,5 g ampas tahu dikontakkan dengan 0% HCl (kontrol) diperoleh hidrolisat dengan kandungan gula tereduksi 0,498 g/L dan *yield* gula tereduksi ( $Y_{GT}$ ) 8,21 mg/g ampas tahu. Peningkatan konsentrasi asam menjadi 0,5% dan 10% berat HCl, secara signifikan meningkatkan konsentrasi gula tereduksi dan *yield* gula tereduksi. Konsentrasi gula tereduksi dan  $Y_{GT}$  dalam hidrolisat berturut-turut adalah 8,333 g/L dan 143,99 mg/g ampas tahu (untuk 0,5% HCl), dan 24,537 g/L dan 431,85 mg/g ampas tahu (untuk 10% HCl). Reaksi hidrolisis bahan-bahan selulosik dalam suasana asam dikontrol oleh konsentrasi ion hidrogen ( $H^+$ ) dalam larutan (Mosier dkk., 2005). Semakin tinggi jumlah ion hidrogen dalam larutan, pemecahan ikatan-ikatan glikosidik juga akan meningkat. Dengan demikian, konversi fraksi selulosa menjadi molekul-molekul gula tereduksi semakin meningkat. Dalam studi ini peningkatan  $Y_{GT}$  untuk konsentrasi asam 0,5% dan 10% HCl berturut-turut adalah 17,54 dan 52,6 kali dibanding kontrol.

Pada hidrolisis dua-tahap khususnya tahap ke-2, fraksi solid digunakan kembali sebagai substrat untuk memproduksi gula terlarut. Hasil analisis menunjukkan, fraksi solid hasil dari perlakuan-awal menggunakan 0,5% HCl mengandung 6,19% hemiselulosa, 55,56% selulosa, 13,98% lignin, 16,70% protein, 11,67% lemak dan 6,08% abu (basis kering). Dari 20 g fraksi solid yang dihidrolisis menggunakan 10% HCl diperoleh hidrolisat dengan kandungan gula tereduksi dan  $Y_{GT}$  berturut-turut 46,047 g/L dan 359,74 mg GT/g fraksi solid. Peningkatan konsentrasi gula tereduksi dan  $Y_{GT}$  bila

dibanding dengan kontrol berturut-turut adalah 333,34 kali untuk konsentrasi gula dan 521,36 kali untuk  $Y_{GT}$ . Menurut Xiang dkk. (2003), dalam hidrolisis asam α-selulosa pada temperatur tinggi, reaksi kimia merupakan faktor yang paling berpengaruh dalam pembangkitan monomer gula. Hal ini mengindikasikan bahwa laju hidrolisis meningkat dengan respek terhadap konsentrasi asam.

### Detoksifikasi Hidrolisat

Penggunaan asam sebagai katalis pada temperatur tinggi dalam hidrolisis bahan-bahan lignoselulosik dapat membangkitkan produk samping seperti furfural, 5-hidroksimetil furfural (HMF), asam-asam organik serta senyawa-senyawa fenolik. Senyawa-senyawa ini dilaporkan bersifat toksik bagi mikroorganisme dan menghambat pertumbuhan sel maupun produksi hidrogen (Chang dkk., 2011, Veeravalli dkk., 2013). Dalam studi ini, konsentrasi HMF dalam hidrolisat yang diperoleh dari perlakuan ampas tahu menggunakan 0,5% dan 10% HCl berturut-turut adalah 2,287 dan 158,838 mg/L. Sementara, dari perlakuan fraksi solid menggunakan 10% HCl diperoleh kandungan HMF 461,525 mg/L (Tabel 4).

Dalam studi awal produksi biohidrogen, tidak ada gas hidrogen yang diproduksi dari hidrolisat yang disiapkan dari hidrolisis menggunakan asam pekat (10% HCl). Hal ini diduga akibat produk samping seperti furfural, HMF, dan fenolik yang terkandung dalam hidrolisat menghambat proses fermentasi. Untuk menghilangkan inhibitor tersebut, hidrolisat yang diperoleh menggunakan 10% HCl didetoksifikasi menggunakan karbon aktif 1,5% berat/volum. Sebagaimana ditunjukkan dalam Gambar 2, proses detoksifikasi hidrolisat HA-2 mereduksi kandungan HMF dari 158,838 mg/L menjadi 12,67 mg/L, dimana ekuivalen dengan 92,02%. Sementara untuk hidrolisat SHM (campuran HA-1 dengan HB-1), konsentrasi HMF berkurang dari 23,425 mg/L menjadi 1,946 mg/L, dimana ekuivalen dengan 91,69%. Hidrolisat yang telah didetoksifikasi ini kemudian digunakan sebagai substrat untuk produksi biohidrogen.

### Produksi Biohidrogen dari Hidrolisat

Dalam studi ini, hidrolisat ampas tahu yang disiapkan dengan perlakuan awal menggunakan asam satu-tahap dan dua-tahap digunakan sebagai substrat untuk produksi hidrogen. Pada metode pengontakan

dua-tahap, hidrolisat dari tahap I (0,5% berat HCl) dan tahap II (10% berat HCl) dicampur sebagai hidrolisat dua-tahap. Rasio pencampuran hidrolisat ini didasarkan pada massa fraksi padatan yang dibangkitkan dari hidrolisis tahap I. Karakteristik hidrolisat yang digunakan dalam uji potensi produksi biohidrogen dapat dilihat dalam Tabel 5.

dan dua-tahap terhadap potensi produksi hidrogen ditunjukkan dalam Gambar 3(A). Hidrolisat dari 2 g ampas tahu kering (basis perhitungan) dengan perlakuan asam (0 atau 0,5% HCl) digunakan sebagai substrat untuk produksi hidrogen. Untuk menghindari efek inhibisi substrat gula tereduksi, hidrolisat dari perlakuan asam pekat (10% HCl) digunakan basis 1 g ampas tahu kering.

**Pengaruh Perlakuan-Awal Terhadap Produksi H<sub>2</sub>**

Pengaruh perlakuan awal ampas tahu menggunakan asam dengan metode pengontakan satu-

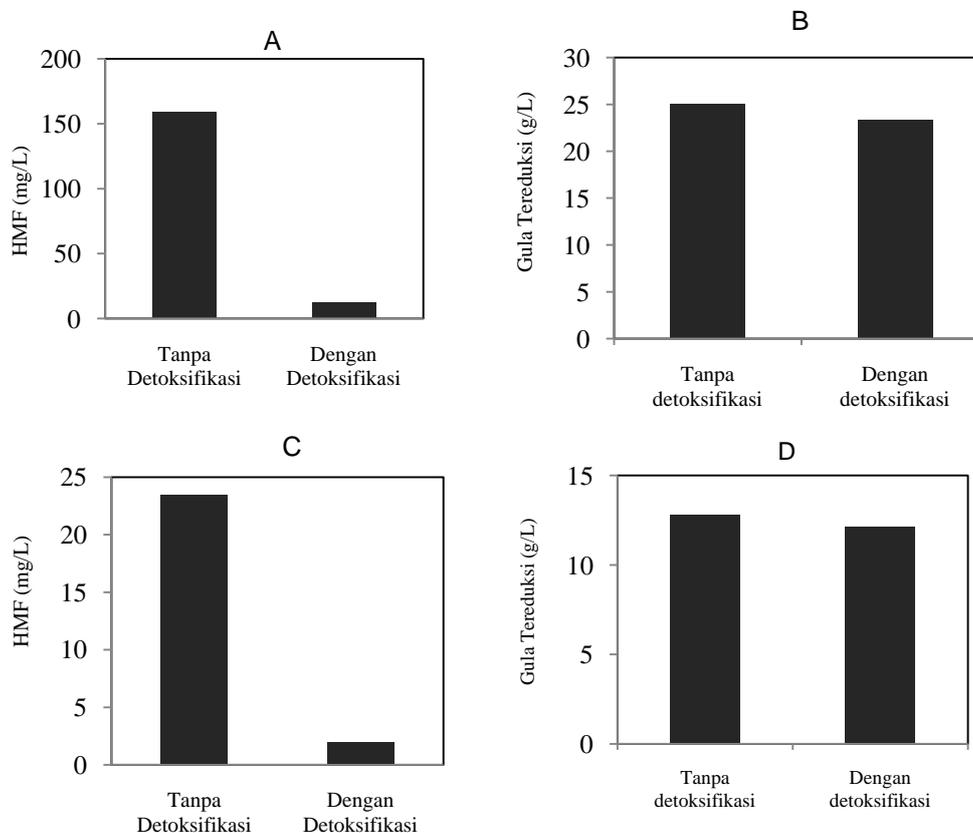
Tabel 5. Karakteristik substrat untuk uji potensi produksi biohidrogen

	Tipe Substrat				
	SH1-0	SH1-1	SH1-2 <sup>a</sup>	SH2-0	SHM <sup>a</sup>
Basis	2 g AT	2 g AT	1 g AT	2 g AT	1 g AT
GT (mg/L)	165	2833	4294	11	3818
COD (mg/L)	851,73	6690,20	7000	415,2	6809,56
N-Total (mg/L)	--	52,36	127,4	--	157,78
Protein (mg/L)	215,49	1033,26	2130,88	106,17	1286,05
HMF (mg/L)	0,250	0,777	2,217	0,117	0,448
Rasio protein/GT	1,31	0,36	0,496	9,65	0,337

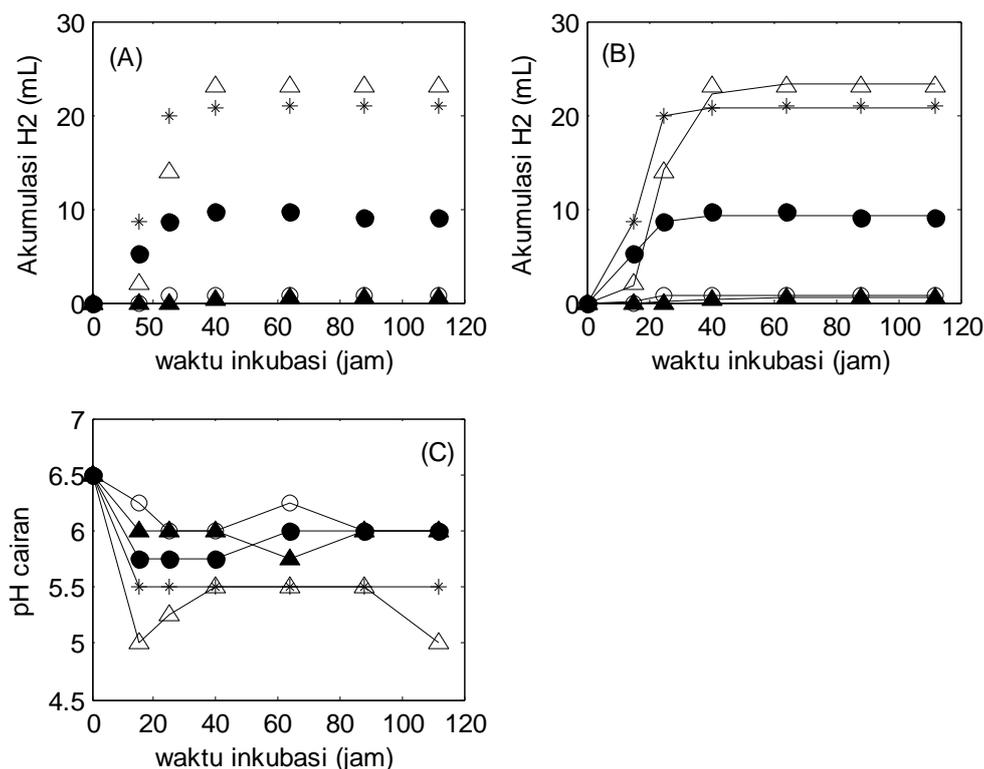
**Keterangan :** GT : Gula tereduksi, AT : Ampas Tahu,

<sup>a</sup> hidrolisat setelah detoksifikasi menggunakan karbon aktif

- SH1-0 : Hidrolisat dengan perlakuan 1 tahap (0% HCl/kontrol)
- SH1-1 : Hidrolisat dengan perlakuan 1 tahap (0,5 % HCl)
- SH1-2 : Hidrolisat dengan perlakuan 1 tahap (10 % HCl)
- SH2-0 : Hidrolisat dengan perlakuan 2 tahap (0% HCl/kontrol)
- SHM : Hidrolisat campuran dari perlakuan 2 tahap (0,5% HCl dan 10% HCl)



Gambar 2. Detoksifikasi hidrolisat menggunakan karbon aktif. A dan B : Hidrolisat HB-1; C dan D : Hidrolisat SHM (Campuran HA-1 dan HB-1)



Gambar 3. (A) Volume kumulatif hidrogen dari ampas tahu kering dengan perlakuan asam (HCl) satu- dan dua-tahap, (B) Simulasi data (3A) dengan Persamaan Gompertz,

Tabel 6. Karakteristik produksi produksi hydrogen pada perlakuan-awal ampas tahu menggunakan asam

Jenis Substrat	Perlakuan-awal	Parameter Persamaan Gompertz			
		$\lambda$ (jam)	Rm(mL/jam)	Hmaks (mL)	JKE
SH1-0	1 tahap (0% HCl)	30,00	0,037	0,41	$1,26 \times 10^{-7}$
SH1-1	1 tahap (0,5% HCl)	14,64	1,407	23,29	0,8072
SH1-2	1 tahap (10% HCl)	7,91	0,734	9,32	0,5858
SH2-0	2 tahap (0% HCl)	16,11	0,163	0,05	$3,2 \times 10^{-4}$
SHM	2 tahap (0,5% dan 10% HCl)	11,39	2,37	20,78	$2,39 \times 10^{-5}$

Hmaks : Potensi produksi hidrogen (mL), Rm : Laju produksi hidrogen maksimum (mL/jam),  $\lambda$ : Waktu fase adaptasi (jam), JKE : Jumlah kuadrat error

Uji potensi produksi hidrogen dilakukan dalam 250 mL botol serum dengan volume kerja 100 mL pada temperatur 35°C selama 6 hari (112 jam). Dari hasil percobaan diperoleh volume kumulatif H<sub>2</sub> dari hidrolisat dengan perlakuan asam satu-tahap menggunakan 0% HCl (kontrol) adalah 0,41 mL. Bila hidrolisat disiapkan dengan perlakuan asam satu-tahap menggunakan 0,5% HCl, volume kumulatif H<sub>2</sub> yang diperoleh dari 2 g ampas tahu adalah 23,07 mL atau 11,54 mL/g ampas tahu. Namun demikian, volume kumulatif H<sub>2</sub> berkurang menjadi 9,67 mL/g ampas tahu (berkurang 16,17%) bilamana konsentrasi asam ditingkatkan menjadi 10% HCl. Peningkatan volume kumulatif H<sub>2</sub> terobservasi bilamana ampas tahu diberi perlakuan awal menggunakan asam dengan metode pengontakan dua-tahap. Dari hasil percobaan, volume kumulatif H<sub>2</sub> dari hidrolisat dengan perlakuan asam

dua-tahap adalah 20,05 mL atau naik 73,82% dibanding perlakuan asam satu-tahap menggunakan 0,5% HCl.

Untuk menginvestigasi lebih lanjut pengaruh perlakuan awal ampas tahu menggunakan asam dengan metode pengontakan satu- dan dua-tahap terhadap potensi produksi hidrogen, data dalam Gambar 3(A) disimulasi menggunakan Persamaan (3). Karakteristik produksi hidrogen dari hasil simulasi dengan menggunakan Persamaan Gompertz yang dimodifikasi ditunjukkan dalam Gambar 3(B) dan Tabel 6.

Laju produksi hidrogen spesifik berkurang dari 1,407 menjadi 0,734 mL/jam, bila konsentrasi asam dalam perlakuan asam satu-tahap ditingkatkan dari 0,5% (SH1-1) menjadi 10% HCl (SH1-2). Dibanding substrat SH1-1, laju produksi hidrogen spesifik dari

substrat SHM (perlakuan asam dua-tahap, 0,5% HCl diikuti 10% HCl) dijumpai lebih tinggi 184% (2,37 mL/jam). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perlakuan awal ampas tahu menggunakan HCl membangkitkan sejumlah inhibitor seperti furfural, HMF, serta senyawa-senyawa fenolik (Cao dkk., 2009). Senyawa-senyawa ini dilaporkan dapat mempengaruhi metabolisme mikroorganisme, pertumbuhan sel serta laju produksi hidrogen (Veeravalli dkk., 2013). Dalam studi ini kandungan HMF dalam substrat SH1-1, SH1-2 dan SHM terdeteksi berturut-turut adalah 0,777, 2,217 dan 0,448 mg/L.

**Yield H<sub>2</sub> dan Konsumsi Substrat**

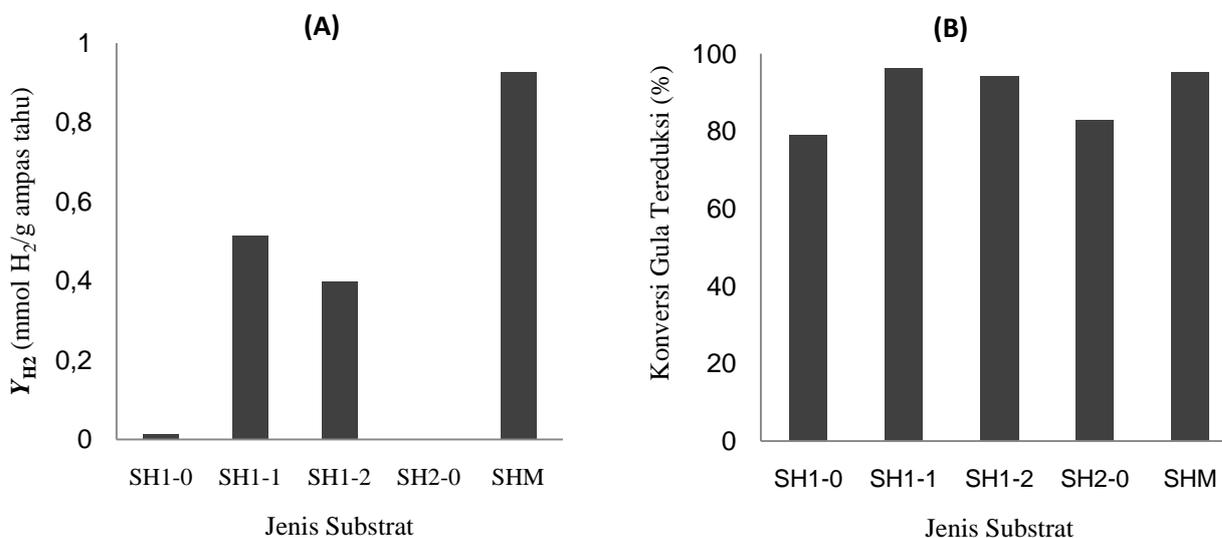
Yield biohidrogen (Y<sub>H<sub>2</sub></sub>) dan konsumsi gula tereduksi dari hidrolisat dalam fermentasi gelap ditunjukkan dalam Gambar 4. Dalam studi ini, Y<sub>H<sub>2</sub></sub> tertinggi 0,928 mmol/g ampas tahu awal dijumpai dalam fermentasi substrat SHM (Gambar 4A). Alasan yang mungkin penyebab naiknya produksi hidrogen dalam studi ini antara lain adalah konsentrasi substrat (gula tereduksi). Metode pengontakan asam dua-tahap membangkitkan gula-tereduksi lebih tinggi dibanding pengontakan satu-tahap menggunakan 0,5% berat HCl. Telah diketahui, karbohidrat (gula tereduksi) merupakan substrat yang paling sesuai untuk fermentasi hidrogen. Glukosa dapat menyediakan bahan karbon dan dapat difermentasi untuk menghasilkan energi yang diperlukan untuk pertumbuhan, biosintesis serta aktivitas sel lainnya.

Pada perlakuan asam satu-tahap, peningkatan konsentrasi asam dari 0,5% HCl menjadi 10% HCl menghasilkan penurunan Y<sub>H<sub>2</sub></sub> dari 0,515 menjadi 0,399 mmol/g ampas tahu awal. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan kehadiran senyawa-senyawa inhibitor seperti furfural, HMF, serta senyawa-

senyawa fenolik dalam hidrolisat mempengaruhi metabolisme mikroorganisme, pertumbuhan sel maupun laju produksi hidrogen (Veeravalli dkk., 2013). Kandungan HMF dalam substrat SH1-2 (2,217 mg/L) yang lebih tinggi dibanding substrat SH1-1 (0,777 mg/L) dan substrat SHM (0,448 mg/L) diduga merupakan penyebab turunnya Y<sub>H<sub>2</sub></sub> dari substrat SH1-2. Di samping itu, kandungan maksimum hidrogendalam reaktor SH1-2 (4,148%) lebih rendah dibanding reaktor SH1-1 (8,37%) dan SHM (7,576%) mengindikasikan bahwa reaktor SH1-2 telah mengalami inhibisi.

Perlakuan awal ampas tahu menggunakan katalis HCl pada temperatur tinggi, selain meningkatkan kandungan gula tereduksi juga meningkatkan kandungan protein. Dalam fermentasi multi substrat, rasio protein/karbohidrat yang lebih tinggi mengakibatkan nilai pH akhir lebih tinggi. Dari Gambar 4B, substrat SH1-2 dengan rasio protein/glukosa 0,496 menunjukkan nilai pH akhir lebih tinggi dibanding substrat SH1-1 dan SHM yang memiliki rasio protein/glukosa berturut-turut 0,36 dan 0,337. Bai dkk. (2004) menjumpai, bahwa protein yang tinggi dalam substrat dapat menekan proses asidifikasi dan menghasilkan lingkungan yang tidak sesuai untuk pertumbuhan sel dan fermentasi hidrogen.

Dalam studi ini, hidrolisat yang mengandung gula tereduksi digunakan sebagai substrat untuk produksi hidrogen secara fermentatif. Hasil analisis gula tereduksi menunjukkan, bahwa pada akhir fermentasi substrat SH1-1, SH1-2 dan SHM telah terkonversi lebih dari 94% (Gambar 4B). Hal ini mengindikasikan, bahwa selain menghasilkan biogas, substrat juga dikonversi menjadi produk lain terutama yang tergabung dalam produk cairan.



Gambar 4. (A) Yield hidrogen dari ampas tahu kering dengan perlakuan asam satu- dan dua-tahap, (B) Konversi gula

## KESIMPULAN

Tujuan dari studi ini adalah mengevaluasi pengaruh perlakuan asam satu-tahap dan dua tahap untuk memproduksi konsentrasi gula-tereduksi sebagai substrat untuk produksi biohidrogen. Metode perlakuan asam satu-tahap menggunakan 0,5% HCl dan 10% HCl menghasilkan  $Y_{GT}$  berturut-turut 143,99 dan 431,85 mg/g ampas tahu. Dengan metode perlakuan dua tahap,  $Y_{GT}$  untuk tahap ke-1 (0,5% HCl) dan tahap ke-2 (10% HCl) berurut-turut adalah 143,99 dan 359,74 mg/g ampas tahu. Dengan demikian, *yield* total gula tereduksi dari perlakuan asam dua-tahap adalah 503,73 mg/g ampas tahu atau meningkat 388,7% dibanding perlakuan satu-tahap menggunakan 0,5% HCl.

Suatu proses yang terintegrasi untuk memproduksi hidrogen dari hidrolisat ampas tahu dan fermentasi anaerob diuji coba dalam studi ini. Dengan pencampuran hidrolisat tahap ke-1 (0,5% HCl) dan tahap ke-2 (10% HCl) menjadi substrat campuran dengan basis 1 gram ampas tahu, diperoleh substrat SHM dengan kadar gula tereduksi 12,77 g/L. Perlakuan hidrolisat untuk menghilangkan senyawa-senyawa toksik dari medium sangat diperlukan sebelum substrat tersebut dimasukkan ke dalam bioreaktor. Dengan menggunakan hidrolisat ampas tahu dari perlakuan asam dua-tahap, diperoleh  $Y_{H_2}$  sebesar 0,928 mmol/g ampas tahu atau lebih tinggi 1,8 kali dibanding perlakuan satu-tahap menggunakan 0,5% HCl.

## NOTASI

$Y_{GT}$  = Yield gula tereduksi (mg gula tereduksi/g ampas tahu kering)

$Y_{H_2}$  = Yield biohidrogen (mmol H<sub>2</sub>/g ampas tahu)

## DAFTAR PUSTAKA

Bai, M.D., Cheng, S.S., and Chao, Y.C., (2004), Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates, *Water Science and Technology*, 50(8), pp. 209-216

Camacho, F. Gonzalez-Tello, P., Jurado, E., and Robles, A., (1996), Microcrystalline-Cellulose Hydrolysis with Concentrated Sulphuric Acid, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 67, pp. 350-356

Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D.J., Guo, W., Liu, B., Feng, Y., and Zhao, Q., (2009), Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, *Int. J. of Hydrogen Energy*, 34, pp. 7182-7188.

Chang, A.C.C., Tu, Y.H., Huang, M.H., Lay, C.H., and Lin, C.Y., (2011), Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate, *Int. J. of Hydrogen Energy*, 36, pp. 14280-14288.

Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., and Hassan, M.A., (2009), Biohydrogen production and industrial

wastes by dark fermentation, *Int. J. of hydrogen energy*, 34, pp. 3277-3287.

Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X., Wei, L., and Shen, J., (2010), Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria, *Int. J. of hydrogen energy*, 35, pp. 4041-4047

De Vrije, T. and Claassen, P.A.M., Dark hydrogen fermentations, In: *Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*, Ed.: Reith, J.H., Wijffels, R.H., and Barten, H., Dutch Biological hydrogen Foundation, The Netherlands, p.:103-123. Available on the Internet: [http://www.biohydrogen.nl/publicfiles/16\\_20804\\_2\\_Bio\\_methane\\_and\\_Bio\\_hydrogen\\_2003.pdf](http://www.biohydrogen.nl/publicfiles/16_20804_2_Bio_methane_and_Bio_hydrogen_2003.pdf)

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., and Yu, Z., (2009), Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation, *Int. J. of Hydrogen Energy*, 34, pp. 812-820.

Kim, M.S. and Lee, D.Y., (2010), Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium, *Bioresource Technology*, 101, pp. S48-S52.

Kim, M.S., Lee, D.Y., and Kim, D.H., (2010), Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions, *Int. J. of Hydrogen Energy*, XXX, pp. 1-7.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., and Stroeve, P., (2009), Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, pp. 3713-3729.

Menristek, (2010), *Biogas dari limbah tahu*, Sumber: <http://www.technology-indonesia.com/energi/bahan-bakar/120-biogas-dari-limbah-tahu> (Agustus, 2010).

Miller, G.L., (1972), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426-428.

Moreno, R. and Gomez, X., (2012), Dark Fermentative H<sub>2</sub> Production from Wastes: Effect of Operating Conditions, *J. of Environmental Science and Engineering*, A1, pp. 936-950.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., and Ladisch, M., (2005), Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 96, pp. 673-686.

Nandi, R. and Sengupta, S., (1998), Microbial Production of Hydrogen: An Overview, *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1), pp. 61-84.

- Nath, K. and Das, D., (2004), Biohydrogen production as a potential energy resource – Present state of art, *J. of scientific and Industrial Research*, 63, pp. 729-738.
- Noike, T. and Mizuno, O., (2000), Hydrogen fermentation of organic municipal wastes, *Water Science and Technology*, 42 (12), pp.155-162.
- Rojas, M.P.A., Zaiat, M., and da Silva, W.L., ( 2010), Influence of the Carbon/Nitrogen Ratio on the Hydrogen Production in a Fixed-bed Anaerobic Reactor, *Proceedings of the WHEC*, May 16-21, 2010, Essen.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K., (2008), Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review, *Int. J. of Molecular Sciences*, 9, pp. 1621-1651.
- Valdez-Vazquez, I. and Poggi-Varaldo, H.M., (2009), Hydrogen production by fermentative consortia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, pp. 1000-1013.
- Veeravalli, S.S., Chaganti, S.R., Lalman, J.A., and Heath, D.D., (2013), Effect furan and linoleic acid on hydrogen production, *Int. J. of Hydrogen Energy*, 38, pp. 12283-12293.
- White, J.W., (1979), Sugar and Sugar Product: Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in Honey, *J. Assoc. of Analytical Chemistry*, 62 (3), pp. 509-514.
- Xiang, Q., Lee, Y.Y., Pettersson, P.O., and Torget, R.W., (2003), Heterogeneous Aspects of Acid Hydrolysis of  $\alpha$ -Cellulose, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 107, pp. 505-514.