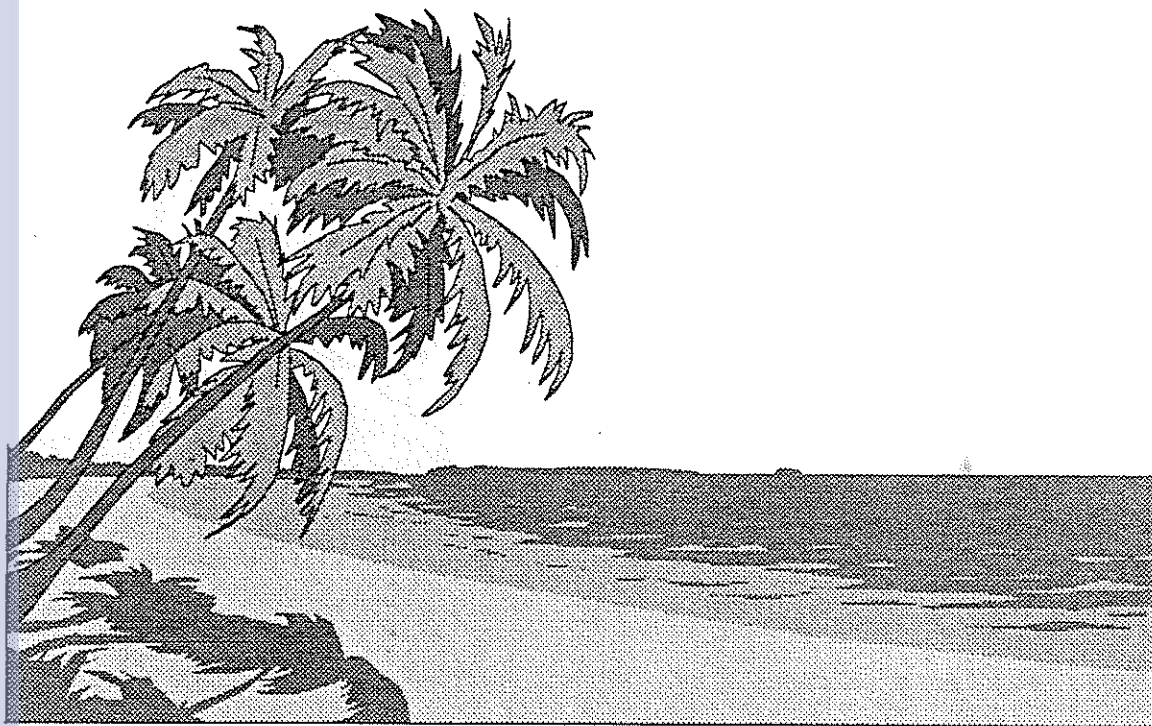


"Ya Tuhan kami, janganlah Engkau hukum kami jika kami lupa atau kami tersalah. Ya Tuhan kami janganlah Engkau bebankan kepada kami beban yang berat sebagaimana Engkau bebankan kepada orang-orang yang sebelum kami. Ya Tuhan kami, janganlah Engkau pikulkan kepada kami apa yang tidak sanggup kami memikulnya. Beri maafilah kami, ampunilah kami dan rahmatilah kami. Engkaulah penolong kami, maka tolonglah kami terhadap kaum yang kafir"  
(Q.S. Al Baqarah 286)



Karya ini kupersembahkan untuk yang tercinta Ayahanda, Ibunda, Mbak Luluk, Mbak Lilik, Mas Kokok, dan Dik Wahyu, serta sahabat-sahabatku

F/1111  
1995  
0096

KAJIAN AWAL KEMAMPUAN *SLUDGE*  
UNTUK MENDEGRADASI MELANOIDIN  
SECARA ANAEROBIK



Oleh

**BAMBANG ARIF NUGRAHA**

**F 27. 0907**



1995

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**

Bambang Arif Nugraha, F 27. 0907. *Kajian Awal Kemampuan Sludge Untuk Mendegradasi Melanoidin Secara Anaerobik.*  
Di bawah bimbingan Muhammad Romli dan Koesnandar

---

## RINGKASAN

Sebagai kajian awal, penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan kultur penyuburan dan degradasi kuantitatif melanoidin oleh koloni bakteri anaerobik.

Dalam penelitian ini digunakan medium fermentasi basal yang "miskin hara", dengan suplemen melanoidin sebagai sumber energi, tanpa glukosa dan ekstrak khamir. Dengan kondisi anaerobik dilakukan variasi konsentrasi *seed sludge*, variasi beban limbah pada fraksi padat 6 dan 2 persen MLSS, variasi pH dan variasi penambahan agen pereduksi sistein-HCl. Data diambil dari rata-rata 2 ulangan percobaan.

Melanoidin sintesis (MS) dibuat dengan cara Migo et.al. (1993b). Melanoidin alami (MA) yang merupakan supernatan limbah cair distilasi etanol dan MS selanjutnya didialisis selama 4 hari untuk memperoleh *nondyalizable melanoidin*.

Hanya variasi 75 persen kotoran sapi dan 25 persen *sludge lagoon* UPT EPG yang konsisten mendekolorisasi melanoidin selama 5 tahap kultivasi. Variasi ini digunakan untuk inokulasi selanjutnya guna memperoleh optimalitas kultur penyuburan dan degradasi kuantitatif melanoidin.

COD *removal* tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah residu 1 persen MS (34 persen), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MA (21 persen), kultur dengan

pH awal 5.9 (7 persen) dan kultur dengan penambahan sistein-HCl 0.3 g/l (6 persen). Semakin berat beban limbah justru semakin meningkatkan COD *removal*.

Perombakan melanoidin menjadi fraksi-fraksi sederhana mendominasi aktivitas koloni bakteri selama masa kultivasi, dilihat dari tingkat dekolorisasi, produksi biogas dan peningkatan *reducing sugar* (RS)-nya. Penurunan RS terjadi menjelang akhir kultivasi. Selama perombakan pH kultur cenderung stabil, berkisar 7-8.

Tingkat dekolorisasi tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah campuran 5 persen MS-MA (3 persen), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 4 persen MA (18 persen), kultur dengan pH awal 5 (8 persen) dan kultur dengan penambahan sistein-HCl 0.2 g/l (5 persen).

Produksi dan *slope* biogas tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah residu 1 persen MS (231 ml, 6.41), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MA (176 ml, 5.05), kultur dengan pH awal 7 (21 ml, 2.16) dan kultur dengan penambahan sistein-HCl 0.3 g/l (18 ml, 2.33).

Hasil analisa CH<sub>4</sub> dengan menggunakan CH<sub>4</sub>-analyzer menunjukkan rendahnya CH<sub>4</sub> dalam biogas, berkisar 1-2 persen.

Secara keseluruhan kultur dengan beban limbah 4 persen MA, 6 persen MLSS, pH 7, penambahan sistein-HCl 0.3 g/l merupakan formulasi terbaik untuk menghasilkan efluen optimal dalam kajian-kajian selanjutnya.

**KAJIAN AWAL KEMAMPUAN *SLUDGE*  
UNTUK MENDEGRADASI MELANOIDIN  
SECARA ANAEROBIK**

Oleh

**BAMBANG ARIF NUGRAHA**

**F 27. 0907**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar  
**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**  
Pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

1995

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**

**KAJIAN AWAL KEMAMPUAN *SLUDGE*  
UNTUK MENDEGRADASI MELANOIDIN  
SECARA ANAEROBIK**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar  
**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**  
Pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

Oleh

**BAMBANG ARIF NUGRAHA**  
F 27. 0907

Dilahirkan pada tanggal 3 Pebruari 1972  
di Sukoharjo



*Muhammad Romli*

**Dr.Ir. Muhammad Romli, MSc**  
Dosen Pembimbing I

*Koesnandar*

**Dr.Ir. Koesnandar, MEng.**  
Dosen Pembimbing II

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadlirat Allah SWT, yang hanya dengan taufik dan hidayah-Nya sajalah skripsi ini dapat diselesaikan.

Penulis menghaturkan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr.Ir. Muhammad Romli, MSc. dan Bapak Dr.Ir. Koesnandar, MEng, selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan arahan dan bimbingan selama Penulis menyelesaikan masalah khusus ini.
2. Bapak Ir. Djuma'ali yang telah memberikan izin penelitian di UPT EPG BPP Teknologi, Sulusuban, Lampung Tengah.
3. Rama, Ibu, Eyang R.Ngt. Umar Hadi *ing kang tuhu kinabekten*. Yang tercinta Mbak Luluk-Kangmas Is, Mbak Lilik-Kangmas Simon, Kangmas Kokok-Mbak Eni, Dimas Wahyu, Dimas Anto, serta *special baby* dik Ochi, dik Novi dan dik Hanung yang *imut-imut*. Terima kasih juga buat Om Minarto dan Om Agus, MBA. beserta keluarga.
4. Keluarga besar (KB) ex Karaton Kartasura Hadiningrat, KB. KH. Chamid Dawud, KB. Kariyo Semito, KB. Men Mahawarman Yon VII/SK Ki-A/IPB, KB. TS Putera Muhammadiyah IPB, KB. AYUMAS atas do'a restunya.
5. Peneliti dan karyawan UPT EPG BPP Teknologi yang telah membantu penulis selama mengadakan penelitian. Terima kasih penulis sampaikan khususnya kepada Bp.Dr. Agus, Ibu Ir.Diah, Bp.Ir. Bambang, Bp. Ir. Dadang, Mas Ir. Agusmanto, Mbak Ir. Ika, Pak Hartono, Pak Mamat (alm), Mas Asep, Mbak Catur, Mas Iwan MSc., Mas Joko MSc., Mas Edi, Fikri, Christon, Beni, Diah, Betty dan Nita.



6. Adik Euis dan adik Wati, *special thanks* atas dorongan morilnya. *Thank* juga untuk adik Kisti, Amy, Pitta, Crew Solo Inn (Mats , Dick, Boed, Arno, Senx, Bass), Joko, Yono, Chopin, rekan-rekan *Agrielevent*, dan semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis yakin skripsi ini masih jauh dari sempurna dan untuk itu kritik serta saran sangat penulis harapkan. Akhirnya, penulis hanya dapat memohon kepada Allah SWT, semoga skripsi yang sangat sederhana ini dapat dimanfaatkan bagi semua pihak yang memerlukannya.

Bogor, akhir Pebruari 1995

Penulis











## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 1.	Pola umum degradasi polisakarida menjadi metana dalam fermentasi anaerobik .....	15
Gambar 2.	Metoda kerja <i>enrichment culture</i> dan degradasi kuantitatif melanoidin oleh koloni bakteri anaerobik .....	30
Gambar 3.	Pengaruh beban limbah campuran (5% MS-MA) pada aktivasi <i>sludge stock</i> selama 2 hari, 6% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	36
Gambar 4.	Pengaruh beban limbah residu 1% MS pada aktivasi <i>sludge stock</i> selama 2 hari, 6% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	37
Gambar 5.	Pengaruh beban limbah residu + 2% MS pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	42
Gambar 6.	Pengaruh beban limbah residu + 2% MA pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	43
Gambar 7.	Pengaruh beban limbah residu + 4% MS pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	44
Gambar 8.	Pengaruh beban limbah residu + 4% MA pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	45
Gambar 9.	Pengaruh beban limbah residu + 6% MS pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	46
Gambar 10.	Pengaruh beban limbah residu + 6% MA pada kultivasi <i>sludge stock</i> selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin .....	47
Gambar 11.	Perbandingan kualitas produksi biogas pada berbagai taraf beban limbah, 2% MLSS dan 1 bulan kultivasi <i>sludge stock</i> .....	48

Gambar 12. Pengaruh pH awal 5 pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin ..... 58

Gambar 13. Pengaruh pH awal 5.9 pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin ..... 59

Gambar 14. Pengaruh pH awal 7.0 pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin :..... 60

Gambar 15. Perbandingan kualitas dekolorisasi dan *reducing sugar* pada berbagai taraf pH, transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA, 1% MLSS dan 1 bulan kultivasi *sludge stock* ..... 61

Gambar 16. Pengaruh penambahan 0.1 g/l sistein, pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin ..... 66

Gambar 17. Pengaruh penambahan 0.2 g/l sistein, pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin ..... 67

Gambar 18. Pengaruh penambahan 0.3 g/l sistein, pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin ..... 68

Gambar 19. Perbandingan kualitas dekolorisasi dan *reducing sugar* pada berbagai taraf penambahan sistein-HCl, transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA, 1% MLSS dan 1 bulan kultivasi *sludge stock* ..... 69



Hal. Cipta Mitra IPB University  
 IPB University  
 Institut Pertanian Bogor

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil analisa kultur penyuburan dan degradasi anaerobik koloni bakteri anaerobik pendegradasi melanoidin .....	79
Lampiran 2. Prosedur Analisa Penelitian .....	84
Lampiran 3. Penyiapan Reagen-Reagen Analisa .....	88
Lampiran 4. Daftar Istilah Asing/ Belum Dibakukan ....	91

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Sebagai produk samping industri gula, molases mempunyai potensi yang cukup besar untuk digunakan sebagai bahan baku industri fermentasi, karena masih mempunyai kandungan gula total 48-58 persen (So di dalam Migo et al., 1993a). Produksi molases di Indonesia mencapai 954 829 ton pada tahun 1986 dan meningkat sampai 1 047 089 ton pada tahun 1989. Industri fermentasi alkohol, monosodium glutamat dan asam amino merupakan sektor industri yang banyak menyerap molases sebagai bahan baku.

Pada proses distilasi pembuatan etanol dari molases, produk yang diperoleh (kadar 96 persen) hanya 10-20 persen, selebihnya merupakan limbah cair dengan BOD melebihi 60 000 ppm (Sirianuntapiboon et al., 1988).

Menurut Malina dan Pohland (1992), penanganan anaerobik mampu mereduksi COD dan BOD limbah antara 80-90 persen. Untuk mencapai mutu efluen yang memuaskan, setelah penanganan secara anaerobik dilakukan penanganan aerobik, antara lain dengan menggunakan *activated sludge* yang mampu menghasilkan 90 persen BOD *removal* pada efluen. Namun demikian kombinasi penanganan anaerobik dan *activated sludge* yang membutuhkan aerasi tersebut, hanya mampu menurunkan BOD efluen sampai 2000 mg/l

(Sirianuntapiboon *et al.*, 1988). Penanganan untuk menghasilkan efluen yang memenuhi baku mutu (antara lain BOD di bawah 100 ppm) terhambat oleh kompleks melanoidin.

Perkembangan yang pesat pada industri fermentasi pengguna molases maupun industri makanan dan minuman seperti khamir roti, bir dan saus kecap, sangat berpeluang menghasilkan limbah dengan kandungan melanoidin yang tinggi.

Melanoidin yang terbentuk karena reaksi non-enzimatik Maillard antara gula dan asam amino sukar sekali didegradasi. Hingga sekarang belum ada metoda penanganan standar yang direkomendasikan. Selain karena masih terbatas penelitian laboratorium, belum adanya kajian tekno-ekonomis yang memadai membuat kalangan industri masih enggan menerapkan teknologi penanganan yang ditawarkan.

Perlakuan fisik, fisiko-kimia dan kimia seperti perlakuan  $H_2O_2$ , penambahan koagulan dan ozonolisis, walaupun mampu mendekolorisasi melanoidin, ternyata tidak layak secara tekno-ekonomis. Penanganan biologis secara aerobik menggunakan kapang juga kurang aplikatif, mengingat besarnya biaya yang harus dikeluarkan. Satu-satunya penanganan yang diharapkan paling layak dalam mendegradasi kompleks melanoidin adalah menggunakan koloni bakteri anaerobik.





Dengan latar belakang inilah, penelitian ini diarahkan untuk mendapatkan *sludge* yang terdiri dari koloni bakteri anaerobik pendegradasi melanoidin. *Sludge* tersebut disuburkan dari kotoran sapi dan limbah cair distilasi etanol dari molases. Sebagai kajian awal, diharapkan dari penelitian ini akan terbuka jalan untuk menemukan metoda penanganan yang aplikatif pada degradasi melanoidin menggunakan koloni bakteri anaerobik.

## B. TUJUAN

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan kultur penyuburan dan degradasi kuantitatif melanoidin dari koloni bakteri anaerobik .
2. Mendapatkan optimalitas proses degradasi melanoidin secara anaerobik dengan melakukan variasi komposisi *seed sludge*, beban limbah, pH dan variasi penambahan agen pereduksi sistein-HCl.

Tahapan isolasi koloni bakteri akan dilakukan pada penelitian selanjutnya.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. MELANOIDIN

Karakteristik kimia dan komposisi tiga tipe limbah cair molases disajikan pada Tabel 1. Perbedaan tipe limbah memberikan perbedaan pada karakteristik dan komposisi limbah. Dari Tabel 1 dapat diketahui nilai-nilai pH, TOC (*Total Organic Carbon*), Total N, Total P dan *reducing sugar* yang sangat mempengaruhi keberhasilan proses kultivasi mikroorganisme pendegradasi melanoidin (Migo et al., 1993a).

Tabel 1. Karakteristik kimia dan komposisi tiga tipe limbah cair dari molases

Karakteristik/ komposisi	Limbah segar					Efluen Biodigester <sup>a</sup>	Efluen Lagoon <sup>b</sup>
	ABS 1 <sup>a</sup>	ABS 2 <sup>b</sup>	ALC <sup>b</sup>	ORC <sup>c</sup>	GODO <sup>d</sup>		
pH	4.55	4.37	4.05	4.93	5.02	7.71	7.85
Absorbansi (475 nm)	18.02	20.72	23.08	19.13	33.05	29.92	27.86
TOC ( $\times 10^4$ ppm)	3.18	3.24	3.18	1.77	4.08	1.68	1.55
F <sup>-</sup> (ppm)	710	1100	1147	229	477	116	52
Cl <sup>-</sup> (ppm)	3786	1548	2182	1802	3032	3308	4646
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	2741	2525	2586	843	4689	100	60
Na <sup>+</sup> (ppm)	133	445	278	296	455	140	152
K <sup>+</sup> (ppm)	7614	3693	3630	3122	5708	7884	10720
Ca <sup>2+</sup> (ppm)	2746	796	865	698	1174	1666	370
Mg <sup>2+</sup> (ppm)	384	249	249	188	545	370	389
Fe <sup>3+</sup> (ppm)	74	20	35	21	92	12	17
Al <sup>3+</sup> (ppm)	112	66	74	61	154	103	112
Total N (ppm)	1644					1690	1476
Total P (ppm)	131					141	60
Red. sugars (g/l)	10.02					2.00	2.60
Tot. sugars (g/l)	16.00					1.50	3.10

- <sup>a</sup> Absolut Chemical Inc., Filipina  
<sup>b</sup> Alcolox Corporation, Filipina  
<sup>c</sup> Oriental Yeast Co. Ltd., Jepang  
<sup>d</sup> Godo Shusei Co., Ltd, Jepang

Melanoidin terbentuk dari reaksi non-enzimatik Maillard antara gula dan asam amino. Kompleknya reaksi kesetimbangan melanoidin alami terutama yang terjadi pada proses pembuatan gula, menyebabkan proses dan mekanisme koagulasinya sukar dilakukan. Karena itu untuk kebutuhan analisa sifat dan karakteristik melanoidin biasanya digunakan melanoidin sintetis (Migo et al., 1993b).

Melanoidin sintetis disiapkan dengan melarutkan 1 M glukosa, 1 M glisin dan 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  atau masing-masing dengan perbandingan 6 : 2.2 : 1.8 dalam 1 liter air bebas ion dan diotoklaf selama 3 jam (Migo et al., 1993b). Menurut Murata et al. (1992) perlakuan dialisis dilakukan untuk memperoleh *nondyalizable melanoidin*. Pada dialisis senyawa-senyawa yang mempunyai berat molekul rendah (kurang dari 10 KDa) terbebaskan, sehingga mempercepat perolehan mikroorganisme yang superior.

Struktur kimia dan karakteristik melanoidin secara lengkap dan pasti belum diketahui sampai sekarang. Pendekatan struktur kimia melanoidin yang telah dipublikasikan masih sangat beragam tergantung sumber pigmen dan perbandingan fraksi-fraksi yang ada di dalamnya.

Perlakuan ozonolisis dan pirolisis dapat mengidentifikasi fraksi-fraksi yang terdapat dalam melanoidin. Dengan  $^{15}\text{N}$  CP-MAS NMR diketahui bahwa melanoidin sintetis setelah ozonolisis mempunyai ikatan utama nitrogen pada sinyal 70-120 ppm dan berasal dari glisin

yang berkonjugasi membentuk ikatan amina (Hayase *et al.*, 1986). Hasil perolehan kembali asam amino dari melanoidin alami yang sudah terdekolorisasi oleh *Coriolus versicolor* Ps4a menunjukkan jenis asam amino yang lebih bervariasi, terutama asam glutamat, leusin dan serin (Ohmo, *et al.*, 1985c).

Tabel 2. Beberapa pendekatan formula empirik melanoidin

Formula empirik	Sumber melanoidin	Keterangan
$C_6H_{6.4}O_2N(CH_2)(CO_2H)_{0.5}$	glukosa : glisin = 1 : 10	Wolfrom <i>et al.</i> di dalam Reynolds (1963)
$(C_{9.2}H_{13.8}NO_{5.7})_{30.6}$	1 M glukosa, 1 M glisin dan 0.2 M natrium bikarbonat (6 : 3 : 1).	Kim <i>et al.</i> (1985)
$C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$	dialisis molases tebu	Binkley di dalam Reynolds (1963)
$C_{9.4}H_{11.4}O_{4.6}N = 1.29C_6H_{12}O_6 + C_2H_5NO_2 - 4.5H_2O - 0.3 CO_2$	melanoidin sintetis setelah perlakuan pirolisis (perbandingan C/N berkisar 7-8)	Hayase dan Kato, 1981

Informasi paling aktual mengenai sifat dan karakteristik melanoidin dijelaskan oleh Migo *et al.* (1993b) dimana melanoidin dilaporkan bermuatan negatif, mempunyai kelarutan yang tinggi dalam air, non volatil, mempunyai absorpsi maksimum pada panjang gelombang 297 nm dan mempunyai berat molekul sekitar 19 K Dalton.

## B. DEKOLORISASI DAN DEGRADASI MELANOIDIN

Metoda dekolbrisasi dan degradasi melanoidin yang telah dipublikasikan mencakup perlakuan fisik, fisiko-kimia, kimia dan biologis. Hayase dan Kato (1981) berhasil mendapatkan komponen volatil yang terpirolisa dari melanoidin dengan degradasi termal. Perlakuan lainnya dengan menggunakan *electrofocusing electrophoresis* menunjukkan bahwa pada pI 3.0 didapatkan rendemen pigmen yang maksimal, sedangkan pada pI rendah aktivitas reduksi melanoidin mencapai optimal. Penambahan HCl akan meningkatkan viskositas melanoidin, dan melanoidin akan terpresipitasi pada pH 3.0 - 3.5 (Homma et al., 1982). Migo et al. (1993b) juga melaporkan bahwa pada pH sekitar 2.5 (titik isoelektrik), dekolorisasi mencapai 67 persen.

Perlakuan fisiko-kimia dengan prinsip flokulasi menggunakan aluminium dan garam besi ternyata sukar untuk dapat menghilangkan warna kompleks melanoidin. Migo et al. (1993a) menerangkan perlakuan fisiko kimia yang cukup layak, yaitu menggunakan flokulan inorganik ferik hidroksi sulfat dengan penambahan CaO ke dalamnya, yang mampu mendekolorisasi melanoidin sebesar 93 persen (pH 11.5). Lebih lanjut dilaporkan bahwa perlakuan ferik hidroksi sulfat dan CaO dengan penambahan kharsoal aktif mampu memberikan 99 persen tingkat dekolorisasi melanoidin pada pH 9. Pada perlakuan ferik hidroksi sulfat dan CaO

dengan penambahan 5 N HCl nilai pH-nya 6.6, namun tingkat pemucatannya tidak setinggi dengan kharsoal aktif.

Dengan  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  dan  $^{15}\text{N}$  CP-MAS NMR dekolorisasi secara kimia dengan ozonolisis mampu mereduksi fraksi-fraksi melanoidin (Hayase et al., 1986). Ozonolisis pada suhu  $-1^{\circ}\text{C}$  selama 10 dan 90 menit berhasil mendekolorisasi melanoidin, masing-masing 84 persen dan 97 persen (Kim et al., 1985). Hayase et al. (1984) juga melaporkan perlakuan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6.7 persen) pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7 dan 10 selama 28 jam, kemampuan dekolorisasinya masing-masing 64 dan 97 persen. Metoda injeksi yang tidak ideal dan alasan ekonomi menyebabkan metoda dekolorisasi secara kimia jarang digunakan (Migo et al., 1993a).

Dibandingkan dengan penggunaan bakteri, penggunaan kapang dalam dekolorisasi dan absorpsi melanoidin lebih banyak. Pada kondisi optimal *Coriolus* sp. No.20 mampu mendekolorisasi melanoidin sampai 80 persen dengan penambahan glukosa atau sorbosa (Watanabe et al., 1981).

Enzim intraselular yang dihasilkan oleh *Basidiomycetes* seperti *Coriolus versicolor* Ps4a pada kondisi optimal mampu mendekolorisasi melanoidin 80 persen, seiring dengan pertumbuhan miselia. Dekolorisasi melanoidin oleh kapang *Basidiomycetes* yang mencapai fase logaritmik pada hari ke-3 kultivasinya, tidak akan tercapai tanpa adanya glukosa. *Basidiomycetes* dan *Ascomycetes* mempunyai pola dekolorisasi yang berbeda dengan

bakteri dan kapang lainnya, yaitu fraksi-fraksi dengan berat molekul tinggi lebih cepat terdekolorisasi. Fraksi dengan BM tinggi yang banyak didominasi oleh protein dan polisakarida lebih disukai oleh *Basidiomycetes* dan *Ascomycetes* daripada fraksi-fraksi BM rendah yang merupakan hasil perombakan melanoidin (Aoshima *et al.*, 1985).

Diversifikasi enzim dari *Coriolus versicolor* Ps4a 1985) yaitu P III (36-50 ppm) dan P IV (51-66 ppm) dapat menjelaskan bahwa enzim P IV mampu mendekolorisasi melanoidin secara langsung tanpa glukosa dan oksigen. Sebaliknya glukosa dan oksigen menjadi prasyarat dekolorisasi melanoidin oleh enzim P III (Ohmomo *et al.*, 1985a).

Ohmomo *et al.* (1985b) menerangkan bahwa *Coriolus versicolor* Ps4a terimobilisasi, pada kondisi awal sistem kontinyu mampu mendekolorisasi melanoidin 75 persen dengan *bubbling column reactor*. Setelah kondisi konstan, dekolorisasi mencapai 66 persen pada kecepatan dilusi (D) = 0.22/ jam, 0.5 persen glukosa, 0.05 persen pepton, DO 1 ppm selama 16 hari. Selain itu didapatkan COD dan TOC removal masing-masing 53 dan 46 persen.

Dekolorisasi kontinyu strain termofilik *Aspergillus fumigatus* pada D 0.014/ jam adalah 70 persen. Dialisis dapat meningkatkan COD (51 persen) dan TOC removal (56 persen), namun tingkat dekolorisasinya justru menurun menjadi 40 persen (Ohmomo *et al.*, 1987).



Pemakaian sistem semi kontinyu pada dekolorisasi melanoidin alami (MA) dengan *Mycelia sterilia* pada 3 kali penyesuaian nutrien, mampu memberikan tingkat dekolorisasi 80 persen. BOD removal efluen mencapai 70 persen, yaitu dari 15 300 menjadi 5200 mg/l (tahap 1), 16 000 menjadi 4200 mg/l (tahap 2) dan dari 26 000 menjadi 6700 pada tahap ke-3 sistem semi kontinyunya (Sirianuntapiboon et al., 1988).

Sirianuntapiboon et al. (1988) juga menjelaskan terjadinya penurunan nilai BOD, COD, pH, *reducing sugar* (RS), seiring dengan peningkatan aktivitas dekolorisasi dan berat kering sel setelah perlakuan. Pengaruh penyimpanan dan penanganan mulai dari limbah segar, kolam anaerobik sampai kolam aerobik sangat nyata dalam menurunkan nilai COD, BOD, RS, nitrogen organik dan intensitas warna. Pemberian glukosa dan nutrien lainnya akan meningkatkan tingkat dekolorisasi dari 17.5 persen menjadi 80 persen pada sistem *batch*. Hal ini membuktikan bahwa melanoidin tidak bisa dipaksakan menjadi sumber karbon, seperti terjadi pada strain *Coriolus versicolor* Ps4a, *Aspergillus fumigatus* G-2-6 dan *Mycelia sterillia*. Tingkat dekolorisasi juga akan menurun dengan adanya kontaminan, walaupun BOD removal-nya meningkat.

Sumber nitrogen pada kultur mempengaruhi aktifitas dekolorisasi melanoidin.  $\text{NaNO}_3$  dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tidak bagus untuk pertumbuhan miselia dari *Aspergillus oryzae* Y-2-32,



walaupun  $\text{NaNO}_3$  menunjukkan aktifitas dekolorisasi yang cukup tinggi (61 persen). Pepton sangat bagus untuk pertumbuhan miselia, namun menurunkan aktivitas dekolorisasinya. Pada kapang semakin besar konsentrasi miselia, kemampuan dekolorisasinyapun meningkat. Mineral pada konsentrasi berlebih dapat merepresi aktivitas dekolorisasi. Pencucian dengan 0.1 persen *tween 80* dan 0.1 persen *sodium dodecylsulfat* masing-masing menurunkan dekolorisasi 50 dan 100 persen. Penambahan 10 persen  $\text{NaCl}$  pada konsentrasi *buffer* tinggi (1 M) akan menutupi struktur melanoidin, sehingga sukar diadsorpsi oleh miselia (Ohmomo et al., 1988a).

Sumber energi dari pati (2 persen) dan ekstrak khamir (1 persen) pada strain *Streptomyces werraensis* mampu mendekolorisasi melanoidin sebesar 64 persen secara *batch* dan kondisi optimal (Murata et al., 1991).

Penggunaan bakteri anaerobik fakultatif dipandang lebih layak secara tekno-ekonomis daripada penggunaan kapang. Pakaew et al. (1988) menerangkan bahwa bakteri anaerobik fakultatif strain C-82 yang diisolasi dari sampel tanah di Lampang, Thailand mampu mendekolorisasi melanoidin sebesar 19 persen. Dengan menggunakan fermentor anaerobik, pH medium 7.5, glukosa 1 persen, ekstrak khamir 0.5 persen dan suhu  $37^\circ\text{C}$ , imobilisasi sel akan meningkatkan tingkat dekolorisasinya menjadi 45 persen. Imobilisasi lebih efektif jika diberikan sedikit oksigen

meningkat pada fraksi BM rendah. Kecenderungan ini dibuktikan dengan lebih tingginya aktivitas dekolorisasi melanoidin sintetis dari glukosa dan glisin dibandingkan dengan melanoidin alami. Limbah cair molases dari gula bit yang banyak terdistribusi pada fraksi BM rendah juga lebih besar aktivitas dekolorisasinya daripada limbah cair molases dari tebu. Produksi asam laktat dari *Lactobacillus hilgardii* W-NS yang mencapai 90 persen dari glukosa awal, 40 persennya berasal dari degradasi melanoidin, karena produksi asam laktat strain ini dari glukosa hanya 50 persen (Ohmomo *et al.*, 1988b).

Pada penelitian selanjutnya, Ohmomo *et al.* (1988c) memperlihatkan bahwa pemakaian kembali sel terimobilisasi masih mampu memberikan tingkat dekolorisasi sekitar 35 persen. Kondisi optimal pertumbuhan dicapai pada konsentrasi glukosa 1 persen, pH medium 5 dan suhu 45°C. Untuk menjaga tingkat dekolorisasi tidak turun menjadi 10 persen, 0.05 persen pepton ditambahkan sebagai sumber nitrogen. Penurunan pH menjadi 3.2 - 3.5 dari pH awal 5 karena produksi asam laktat yang berlebih, menyebabkan tingkat dekolorisasi secara kontinyu pada reaktor tipe kolom tinggal 20 persen. Nilai tersebut diperoleh setelah hari ke-5 sejak sistem kontinyu mulai dijalankan.

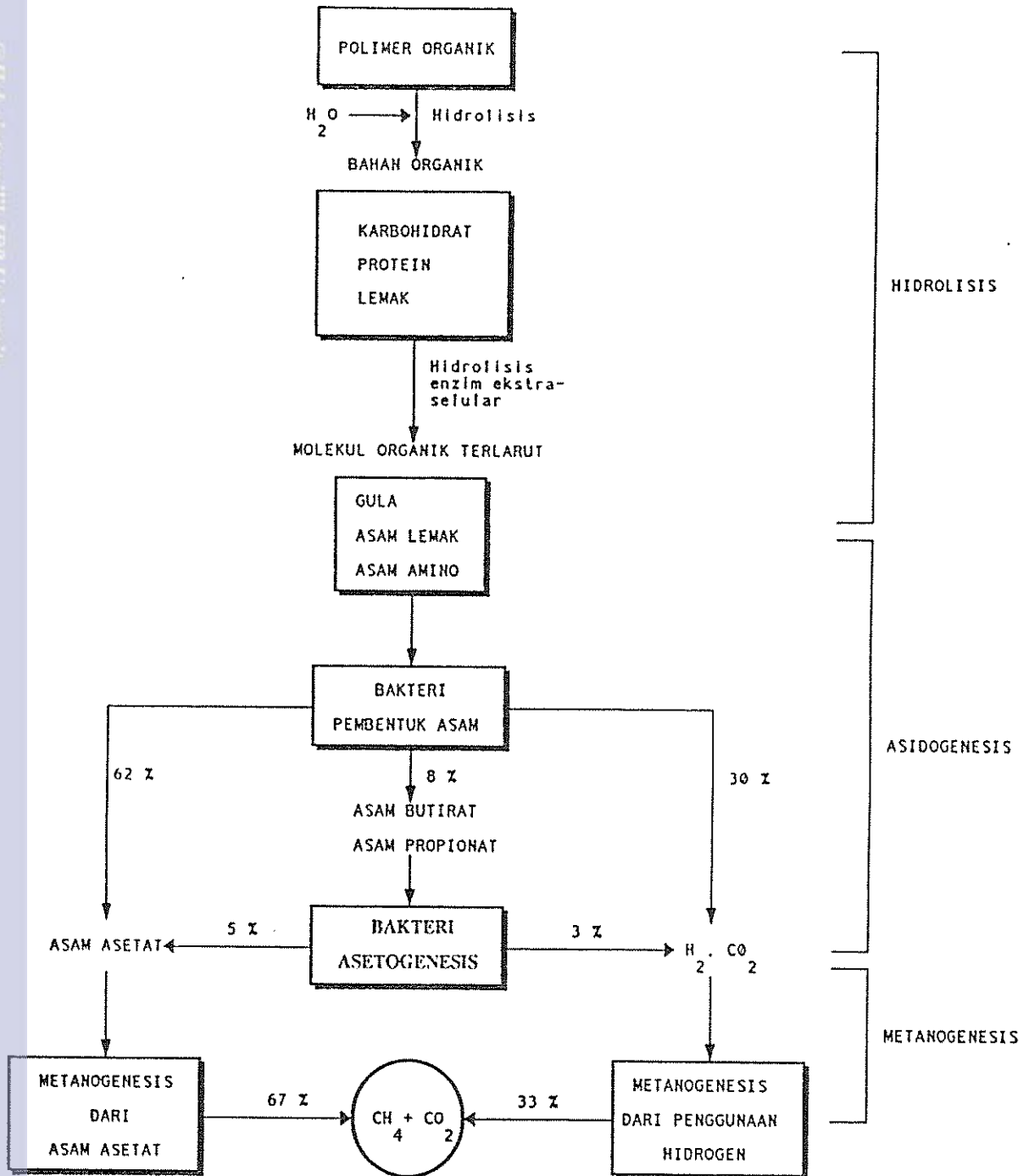
Penelitian-penelitian degradasi melanoidin dengan menggunakan kapang dan bakteri yang telah dilaporkan, umumnya kurang dapat diaplikasikan (Migo *et al.*, 1993a).

Selain mahalnnya biaya penanganan, laju degradasi MA terutama oleh kapang yang cukup tinggi, hanya dapat dicapai bila MA sebagai suplemen fermentasi ditambahkan pada konsentrasi rendah (kurang dari 1 persen). Penelitian-penelitian tersebut belum mampu menggunakan limbah cair yang mengandung melanoidin sebagai substrat dan media pertumbuhan, melainkan hanya sebagai suplemen pada media fermentasinya.

### C. PROSES ANAEROBIK

Price dan Paul (1981) telah menjelaskan bahwa pembentukan biogas berlangsung melalui suatu proses fermentasi anaerobik yang merupakan suatu reaksi oksidasi-reduksi di dalam sistem biologis yang menghasilkan energi, dimana sebagai donor dan akseptor elektronnya adalah senyawa organik. Fermentasi anaerobik hanya dapat dilakukan oleh mikroba yang dapat menggunakan molekul selain oksigen, sebagai akseptor elektronnya.

Denac et al. (1986) menjelaskan tahap-tahap proses fermentasi anaerobik, yaitu hidrolisa, asidogenesis dan metanogenesis, seperti disajikan pada Gambar 1. Pada tahap hidrolisa, senyawa organik yang kompleks direduksi menjadi senyawaan sederhana oleh bakteri hidrolitik, pada suhu 30-40°C (mesofilik) atau 50-60°C (termofilik). Nilai pH optimum selama kultivasi sekitar 6-7.



Gambar 1. Pola umum degradasi polimer organik menjadi metana dalam fermentasi anaerobik. (Malina dan Pohland, 1992)

Pada tahap metanogenesis, konversi asam organik menjadi metana, CO<sub>2</sub> dan gas lain sangat dipengaruhi oleh pH dan suhu. Nilai pH optimum adalah 7.0-7.5, sedangkan pada pH 6.2 beberapa *strain* bakteri metana yang peka terhadap penurunan pH akan mengalami keracunan. Selain itu bila substrat hanya mengandung sedikit nitrogen, penyangga yang ditambahkan tidak akan mampu mempertahankan pH pada selang netral (Dissanayake, 1987).

Malina dan Pohland (1992) menjelaskan bahwa pada saat awal kultivasi, pH akan turun sampai di bawah toleransi minimum bagi proses metanogenesis. Penurunan pH ini akan menyebabkan ketidakseimbangan sistem fermentasi. Bila penyebab penurunan pH tersebut adalah material toksik, pengeluaran material tersebut dari kultur harus dilakukan. Namun bila penyebabnya adalah produksi asam yang berlebih, waktu kultivasi perlu diperpanjang. Selain itu perlu juga dilakukan pengontrolan pH sehingga penurunan pH secara drastis tidak terjadi. Semakin banyak asam yang dikonversi menjadi metana, aktivitas metanogenesis semakin meningkat antara lain ditandai dengan peningkatan pH.

Waktu penggandaan yang diperlukan oleh bakteri pengkonversi asam asetat menjadi metana, seperti pada *strain Methanosarcina* dan *Methanothrix* cukup lama, yaitu 24 jam. Hal ini menyebabkan kompetisi yang merugikan



dengan hidrogen pengoksidasi metana yang hanya membutuhkan 1-4 jam waktu penggandaan (Malina dan Pohland, 1992).

Malina dan Pohland (1992) menjelaskan bahwa metanogenesis juga akan terhambat dengan adanya akseptor elektron seperti nitrat atau sulfat. Kondisi ini disebabkan karena reaksi nitrat atau sulfat dengan hidrogen akan membentuk  $\text{NH}_3$  (amoniak) dan  $\text{H}_2\text{S}$  dalam konsentrasi yang melebihi produksi metana.

Konversi oleh bakteri anaerobik akan efisien jika dijalankan pada kondisi yang bebas inhibitor. Hidrogen sebagai inhibitor potensial pada konsentrasi berlebih, seringkali dibutuhkan pada pemecahan asetat dan reduksi  $\text{CO}_2$ . Sintropi produksi hidrogen dan penggunaannya pada metanogenesis akan membentuk kesetimbangan sistem termodinamika. Sistem yang mereduksi proton hidrogen ini mencegah inhibisi hidrogen sehingga reduksi  $\text{CO}_2$  menjadi metana berjalan optimal (Malina dan Pohland, 1992).

Waktu generasi bakteri pengoksidasi butirat dan propionat menjadi asetat dan hidrogen sangat lambat. Konversi sempurna membutuhkan waktu retensi yang lama, karena strain seperti *Syntrophomonas wofei* dan *Syntrophobacter wolinii* masing-masing membutuhkan 3 dan 7 hari waktu generasinya. Penggabungan bakteri asetogenesis dengan metanogenesis menyebabkan pembatasan produksi metana. Akumulasi asam lemak, seperti asam propionat



merupakan indikator terjadinya represi pada sistem degradasi anaerobik (Malina dan Pohland, 1992).

Kesuksesan kultivasi bakteri anaerobik tergantung pada efektifitas pengusiran oksigen (udara) dari media pertumbuhan oksigen pada fasa gas yang berhubungan dengan media. Gas pengusir yang dipakai adalah  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  atau campurannya (Ljungdahl dan Wiegel, 1990). Pengkondisian anaerobik dapat dicapai dengan menggunakan modifikasi teknik *Hungate* yang dikombinasikan dengan teknik botol serum, seperti dilakukan oleh Koesnandar et al. (1990).

Mikroorganisme anaerobik tidak mampu hidup pada kondisi aerobik karena tidak memiliki sistem enzim superoksida dismutase dan katalase. Sistem enzim tersebut merupakan pelindung sel dari pengaruh anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Anion superoksida dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat menyebabkan kerusakan sel yang diawali dengan tidak berfungsinya sistem enzim, kerusakan asam nukleat dan kerusakan lainnya (Hespell, 1990).

Kondisi kultivasi anaerobik lainnya yang harus dijaga adalah total padatan (optimal 7-9 persen) dan rasio C/N substrat (optimal 25:1). Besaran C/N yang terlalu rendah akan menyisakan banyak nitrogen yang berubah menjadi amoniak sehingga meracuni bakteri (Singh di dalam Dissanayake, 1987).

Kebanyakan bakteri anaerobik membutuhkan tempat tumbuh dengan nilai potensial redoks  $-50$  mV atau lebih

rendah. Nilai tersebut tidak dapat dicapai hanya dengan menghilangkan oksigen dari media tumbuh. Senyawa pereduksi seperti sistein, sulfida dan titanium sitrat harus ditambahkan pada media kultivasi (Hespell, 1990).

Menurut Koesnandar *et al.* (1990), selain sebagai agen pereduksi sistein juga merupakan sumber sulfur yang diperlukan pada fermentasi anaerobik dalam konsentrasi sangat rendah. Pada saat kultivasi sistein-HCl akan teroksidasi menjadi sistein dan menurunkan potensial redoks cairan fermentasi. Ljungdahl dan Wiegel (1990) menjelaskan sistein-HCl pada konsentrasi 0.02-0.08 persen mampu memberikan nilai potensial redoks media sebesar -210 mV. Namun karena sistein bersifat asam, maka dalam konsentrasi yang berlebih sistein dapat menurunkan pH media. Untuk mencegah penurunan pH ini, perlu ditambahkan penyangga alkali sebelum inokulasi dilakukan.

Pemberian penyangga pada media anaerobik sangat diperlukan untuk menetralisasi pH, karena pengaruh sistein-HCl bersifat asam. Bakteri anaerobik selain membutuhkan media pertumbuhan yang tercukupi sumber energinya, juga membutuhkan ekstrak khamir, tripton, vitamin, mineral dan agen pereduksi untuk mengoptimalkan pertumbuhannya (Ljungdahl dan Wiegel, 1990).

Malina dan Pohland (1992) menjelaskan bahwa penanganan secara anaerobik sangat disarankan untuk menurunkan BOD<sub>5</sub> dan COD limbah yang mencapai lebih dari 20 000 mg/l.







### III. BAHAN DAN METODA

#### A. BAHAN

##### 1. Koloni Bakteri

Koloni bakteri diperoleh dari penyuburan *seed culture* yang berasal dari kotoran sapi dan *sludge lagoon* Unit Pelaksana Teknis Etanol Protein Sel Tunggal dan Gula Badan Pengembangan dan Penerapan Teknologi (UPT EPG BPP Teknologi).

##### 2. Media Pertumbuhan

Penyuburan dilakukan pada media basal "miskin hara" dengan suplemen melanoidin. Komposisi media basal, larutan vitamin dan *trace element* masing-masing disajikan pada Tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Komposisi media fermentasi (media basal)

No.	Nama bahan	Komposisi (g/l)
1.	$K_2HPO_4$	0.3800
2.	$KH_2PO_4$	0.2500
3.	$NH_4Cl$	0.0560
4.	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0450
5.	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1000
6.	NaCl	0.1250
7.	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0001
8.	larutan vitamin	1.0000 ml
9.	larutan <i>trace element</i>	0.3000 ml
10.	Sistein-HCl	0.0200

Tabel 4. Komposisi vitamin pada media basal

No.	Nama bahan	Komposisi (g/l)
1.	<i>biotin</i>	0.02
2.	<i>fatic acid</i>	0.02
3.	<i>pyrodoxine HCl</i>	0.10
4.	<i>thiamine</i>	0.05
5.	<i>riboflavin</i>	0.05
6.	<i>nicotinic acid</i>	0.05
7.	<i>DL-calcium penthothenate</i>	0.05
8.	<i>lipoic acid</i>	0.05
9.	<i>P-amino benzoic acid</i>	0.05

Tabel 5. Komposisi *trace element* pada media Basal

No.	Nama bahan	Komposisi (g/l)
1.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10
2.	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.03
3.	$H_3BO_3$	0.30
4.	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.20
5.	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01
6.	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.02
7.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.03

Bahan-bahan lain yang digunakan adalah 1 M glukosa, 1 M glisin, 0.5 M  $Na_2CO_3$ , air destilata, air bebas ion, gas  $N_2$ , parafilm, tube selulosa (berat molekul 10 KDa).

## B. ALAT

Alat-alat yang digunakan adalah tabung gas  $N_2$  (HP), botol serum 100 ml, *water bath shaker*, otoklaf, pH meter digital, lemari pendingin, kotak inokulasi anaerobik,

spektrofotometer *Simadzu* UV-160A,  $\text{CH}_4$ -Analyzer, sentrifuge (*Hitachi*, kecepatan 18 000 rpm), timbangan analitik, syringe 1, 5, 10, 20 dan 50 ml (dengan jarum suntiknya).

### C. WAKTU DAN TEMPAT

Penelitian dilakukan selama 6 bulan, mulai bulan Juli sampai dengan Desember 1995. Penelitian dilakukan di Laboratorium Proses, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Analisa, Balai Penerapan Teknologi Industri, UPT EPG, BPP Teknologi, Sulusuban, Lampung.

### D. METODA PENELITIAN

#### 1. Penyiapan Kotak Inokulasi Anaerobik (KIA)

KIA dibuat dari bahan kaca bening datar yang memiliki ketebalan 5 mm. Alat ini berbentuk segilima dengan dua lubang di sisi muka (diameter 10 cm) dan 1 lubang (diameter 12 cm) di bagian atas.

#### 2. Penyiapan Melanoidin

Melanoidin sintetis disiapkan dengan melarutkan 1 M glukosa, 1 M glisin dan 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (masing-masing dengan perbandingan (6 : 2.2 : 1.8) dalam 1 liter air bebas ion dan diotoklaf selama 3 jam (Migo et al., 1993b). Dialisis melanoidin alami dan melanoidin sintetis dilakukan selama 4 hari.

### 3. Penyiapan *Seed Culture* dan Media Pertumbuhan

*Sludge* dari kotoran sapi dan *lagoon* UPT EPG BPP Teknologi dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi untuk dijadikan sebagai *seed culture*.

Media basal sebagai media pertumbuhan kultur, dibuat dan dipersiapkan secara anaerobik dengan menggunakan modifikasi teknik Hungate pada botol serum (Koesnandar et al., 1990). Seluruh bahan seperti disajikan pada Tabel 3 dan Tabel 5, dilarutkan dalam 1 liter air bebas ion dan dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya media didinginkan dalam air mengalir sambil dialirkan nitrogen secara kontinyu. Media yang dipakai untuk inokulasi diotoklaf terlebih dahulu dalam botol serum. Larutan vitamin dan sistein-HCl diinjeksikan pada botol serum paling akhir pada saat dimulainya kultivasi.

### 4. Kultivasi Pada Media Basal

#### a. Variasi konsentrasi *seed sludge* kultur

*Seed sludge* untuk inokulasi I ini berasal dari *sludge stock* yang telah dikultivasi selama 2 bulan. Inokulasi untuk kultur yang disuburkan dari beberapa variasi konsentrasi kotoran sapi dan *sludge lagoon* UPT EPG BPP Teknologi ini dilakukan dalam kotak inokulasi anaerobik. Variasi konsentrasi



*seed sludge* dilakukan dalam 4 taraf dan 2 ulangan, seperti disajikan pada Gambar 2. *Seed sludge* yang disuburkan mempunyai kandungan MLSS (*Mixed Liquor Suspended Solid*) sebesar 1 persen (w/v). Tabung erlenmeyer 100 ml digunakan sebagai bioreaktor pertumbuhan.

**b. Variasi beban limbah kultur**

Variasi beban limbah dilakukan pada 2 inokulasi, yaitu inokulasi II untuk *seed sludge* (6 persen MLSS) dari *sludge stock* yang diaktivasi selama 2 hari dan inokulasi III untuk *seed sludge* (2 persen MLSS) dari *sludge stock* yang dikultivasi selama 1 bulan. Variasi untuk memperoleh konsentrasi beban limbah yang optimal bagi degradasi melanoidin ini dilakukan dalam 2 taraf (inokulasi II) dan 6 taraf (inokulasi III) dengan 2 ulangan. Bioreaktor yang digunakan adalah erlenmeyer 100 ml (inokulasi II) dan botol serum 100 ml (inokulasi III).

Pengkondisian anaerobik pada saat inokulasi dalam *clean bench* dapat dilakukan dengan menggunakan *syringe* 50 ml sebagai alat transfer *seed sludge* dari botol stok ke botol serum dengan pengaliran nitrogen secara kontinu. Botol serum selanjutnya ditutup dengan tutup silikon dan aluminium. Untuk bioreaktor erlenmeyer digunakan tutup propilen yang

dilengkapi dengan pipa pengambilan sampel dan gas, serta dilapisi parafilm.

Kultivasi dilakukan dalam *water bath shaker* selama 36 hari, pH medium awal 7.5, suhu 37°C secara semi kontinyu.

Penyesuaian konsentrasi nutrien (*replacement*) dilakukan secara periodik dengan menginjeksikan 10 persen (v/v) medium segar yang mempunyai konsentrasi 8 kali lipat pada kultur, sehingga konsentrasi final nutrien pada medium kultur bisa terus dijaga seperti konsentrasi awal.

#### c. Variasi pH awal kultivasi

*Seed sludge* (1 persen MLSS) yang digunakan dalam variasi pH (inokulasi IV) berasal dari transfer kultur dengan beban limbah melanoidin alami pada inokulasi III. Inokulasi yang dilakukan dalam *water bath shaker* selama 9 hari kultivasi, suhu 37°C dan penambahan sistein 0.3 g/l ini dibuat dalam 3 taraf pH (5, 5.9 dan 7) dengan 2 ulangan.

Pengaruh penekanan gas yang mungkin masih ada dalam botol serum dibebaskan dengan penyisipan jarum steril pada penutup silikonnya. Dengan demikian akan diperoleh tekanan yang sama di dalam dan diluar botol serum (1 atmosfer).



horizontal). Sebagai pembanding sampel yang dianalisa, dibuat juga blanko (air) dengan perlakuan sama.

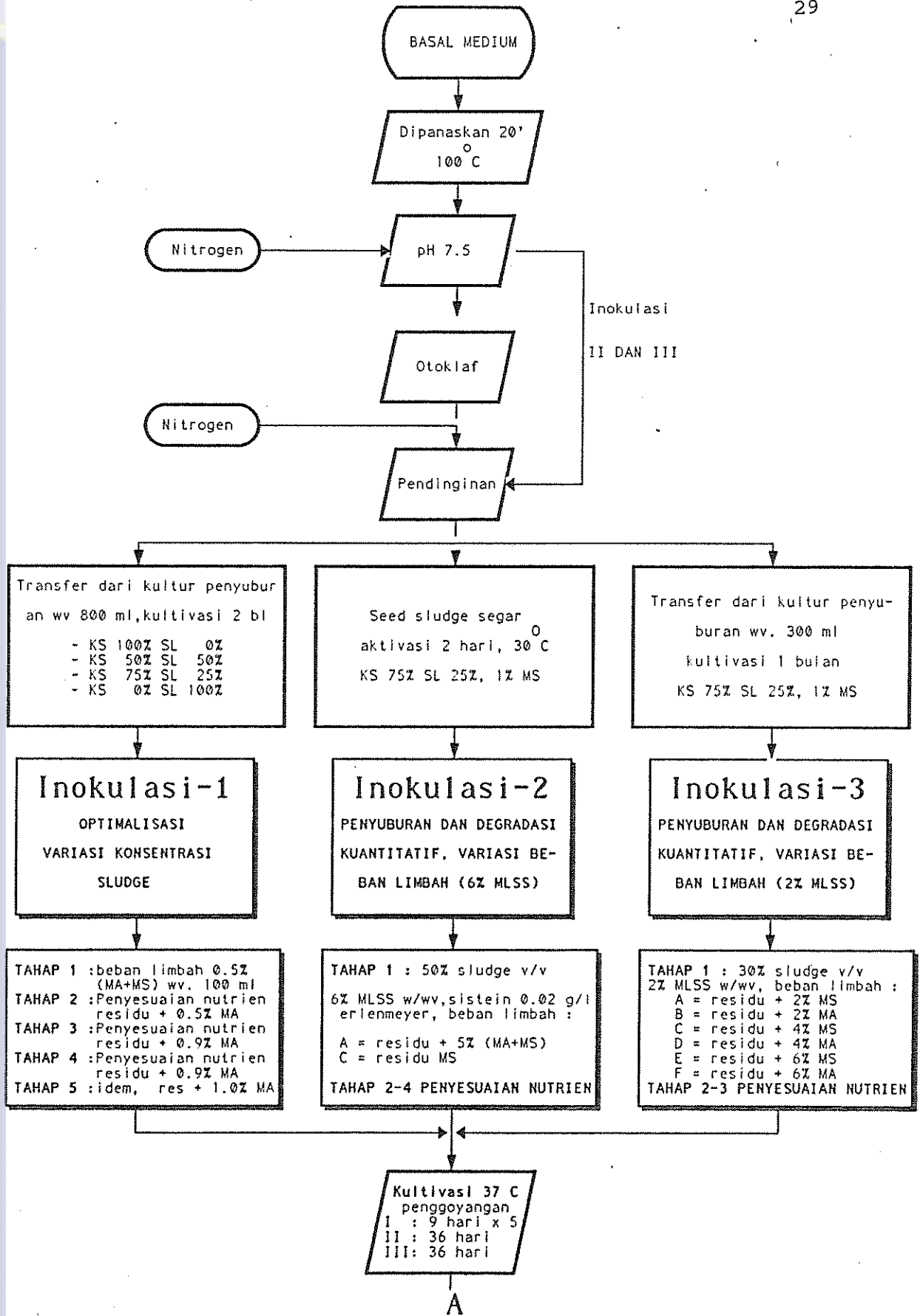
Tingkat dekolorisasi diukur dari penurunan absorbansi sampel hari ke-0 kultivasi dengan sampel pada akhir kultivasi. Pengukuran absorbansi setiap sampel menggunakan kurva standar melanoidin sintetis dialisis 4 hari, pada panjang gelombang 450 nm.

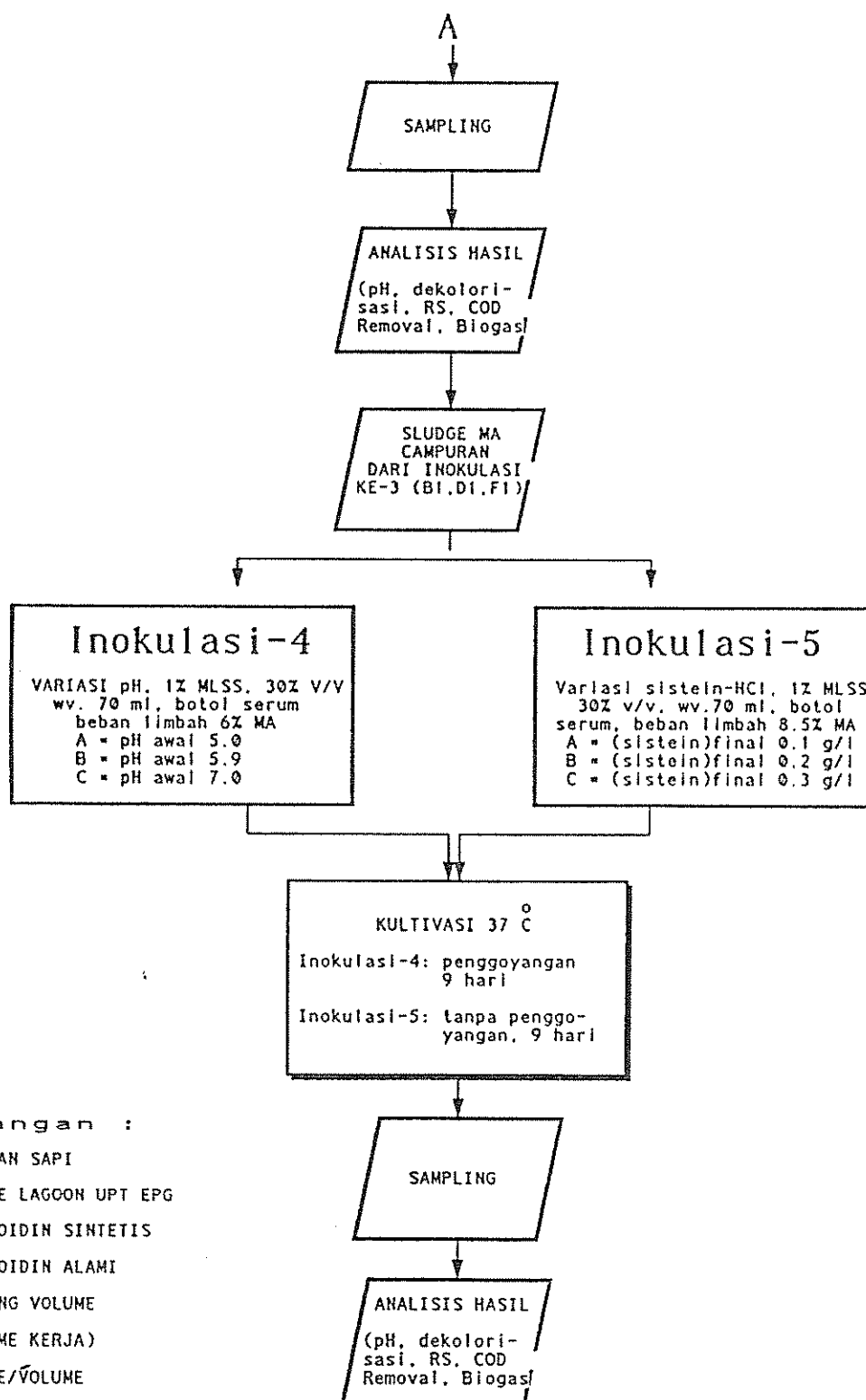
COD *removal* dihitung dari penurunan nilai COD kultur (mg/l) mulai hari ke-0 sampai hari terakhir kultivasi dan nilainya dinyatakan dalam persen. Metoda pengukuran COD yang digunakan adalah metoda  $\text{KMnO}_4$  pada kondisi asam.

Biogas yang diproduksi kultur diukur secara langsung dengan menyisipkan jarum suntik pada penutup silikon botol serum, sehingga biogas akan mendorong *syringe*-nya. Dengan menggunakan skala ml yang terdapat pada *syringe*, produksi biogas dapat dihitung.  $\text{CH}_4$  yang dihasilkan selama masa kultivasi dikuantifikasi dengan menggunakan  $\text{CH}_4$ -*analyzer*.









Gambar 2. Metoda kultur penyuburan dan degradasi kuantitatif melanoidin oleh koloni bakteri anaerobik

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### A. MELANOIDIN

Dari hasil analisa diketahui bahwa nilai COD dari limbah cair distilasi etanol dari molases (MA) UPT EPG adalah 134 400 mg/l, jauh lebih tinggi dari nilai COD melanoidin sintetis (Migo et al., 1993b) yang bernilai 69 600 mg/l. Nilai COD menunjukkan kebutuhan oksigen yang diperlukan untuk merombak senyawa-senyawa organik secara kimiawi. Nilai COD merupakan indikator tingkat pencemaran limbah yang paling sering digunakan, selain BOD.

Nilai BOD tidak bisa diperoleh karena bangsal percobaan etanol yang mensuplai limbah segar sedang tidak memproduksi. Namun demikian nilai BOD yang menyatakan jumlah oksigen yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk merombak bahan organik limbah, dari data sekunder diketahui melebihi 60 000 mg/l (Sirianuntapiboon et al., 1988).

Karena proses perombakan bahan organik oleh mikroorganisme yang telah berlangsung di lagoon anaerobik, beban limbah yang diinjeksikan ke dalam kultur penyuburan sudah berkurang dibandingkan dengan beban limbah yang berasal dari limbah segar distilasi etanol. Selain berasal dari fraksi-fraksi melanoidin, beban limbah juga berasal dari fraksi-fraksi non melanoidin tersisa lainnya sehingga pola degradasinya lebih kompleks.

Pada saat inokulasi dalam media basal, nilai COD awal untuk variasi beban limbah sekitar 20 000 mg/l (6 persen MLSS) dan 10 000 - 13 000 mg/l (2 persen MLSS). Untuk kultur dengan variasi pH dan sistein-HCl (1 persen MLSS), nilai COD awal berkisar 8 000 - 10 000 mg/l.

Pembuatan melanoidin sintetis dengan menggunakan cara Migo *et al.* (1993b) didasarkan pada pertimbangan kepraktisan pembuatannya, tanpa merubah struktur dan kualitas melanoidin yang dihasilkan.

Perbedaan formula empirik dan karakteristik lainnya, baik secara parsial maupun keseluruhan pada melanoidin alami dan sintetis dari para peneliti, diduga karena perbedaan perolehan fraksi-fraksi yang terkandung dan perbedaan sumber melanoidin. Perlakuan degradasi juga akan merubah sifat dan karakteristik melanoidin. Hal ini misalnya nampak dari besaran C/N melanoidin alami pada Tabel 1 sekitar 10.5 yang menurun karena ozonolisis menjadi sekitar 7-8 (Hayase dan Kato, 1985).

Glisin yang berkonjugasi membentuk ikatan yang kuat pada melanoidin diduga merupakan penyebab sulitnya degradasi melanoidin, selain karena ikatannya dengan gula-gula sederhana. Pada melanoidin alami (MA), ikatan antara berbagai jenis asam amino, terutama asam glutamat, leusin dan serin diduga lebih stabil daripada konjugasi glisin pada melanoidin sintetis (MS).



Hipotesa yang diambil dengan muatan negatif melanoidin adalah absorpsi dan dekolorisasinya lebih optimal bila dilakukan oleh senyawa yang bermuatan positif. Dengan demikian akan terjadi tarik menarik ion yang akhirnya dapat mendestabilisasi struktur melanoidin.

## B. DEGRADASI DAN DEKOLORISASI MELANOIDIN

Fraksinasi dan pemisahan komponen-komponen melanoidin, baik dengan pirolisa, ozonolisis maupun cara lain mampu memberikan informasi tentang fraksi melanoidin yang mudah, sulit dan tidak dapat didegradasi.

Perlakuan ozonolisis dan  $H_2O_2$  yang mahal, dimungkinkan hanya untuk meneliti sifat dan karakteristik kompleks melanoidin, sehingga dapat ditentukan metoda dan langkah yang paling efektif untuk mendegradasi melanoidin.

### 1. Variasi Konsentrasi *Seed Sludge* Kultur (Inokulasi I)

Waktu kultivasi *sludge stock* yang digunakan sebagai *seed sludge* pada inokulasi I ini cukup lama, yaitu 2 bulan. Dengan demikian diduga *seed sludge* telah cukup adaptif untuk mendegradasi melanoidin. Optimalisasi variasi konsentrasi *seed sludge* seperti disajikan pada Tabel 5, memberikan rekomendasi variasi *seed sludge* yang terus digunakan dalam kajian-kajian selanjutnya.

Penggunaan kotoran sapi sebagai salah satu penyusun *seed sludge* didasarkan pada keunggulan sistem lambung sapi yang merupakan sistem alami yang paling kondusif bagi pertumbuhan mikroorganisme anaerobik. Selain itu sapi diyakini mampu mencerna rumput-rumputan yang mempunyai kandungan selulosa sangat tinggi. Keberadaan mikroorganisme anaerobik yang mampu hidup dalam limbah etanol mendorong penggunaan *sludge* dari lagoon UPT EPG sebagai penyusun *seed sludge* selain kotoran sapi.

Tabel 6. Tingkat dekolorisasi (%) tiap tahap kultivasi pada variasi konsentrasi *seed sludge* kultur (inokulasi I)\*)

Kultur	Tahap-1	Tahap-3	Tahap-5
100% KS 0%SL (C)**)	-	20	-
75% KS 25%SL (F)	31	9	7
50% KS 50%SL (H)	20	-	-
0% KS 100%SL (P)	-	-	-

\*) Tahap-1 : beban limbah 0.5% MA+MS

Tahap-3 : beban limbah residu 1-2 + 0.9% MA

Tahap-5 : beban limbah residu 1-4 + 1.0% MA masing-masing dengan 2 ulangan

\*\*\*) KS = kotoran sapi, SL = *sludge* dari lagoon UPT EPG

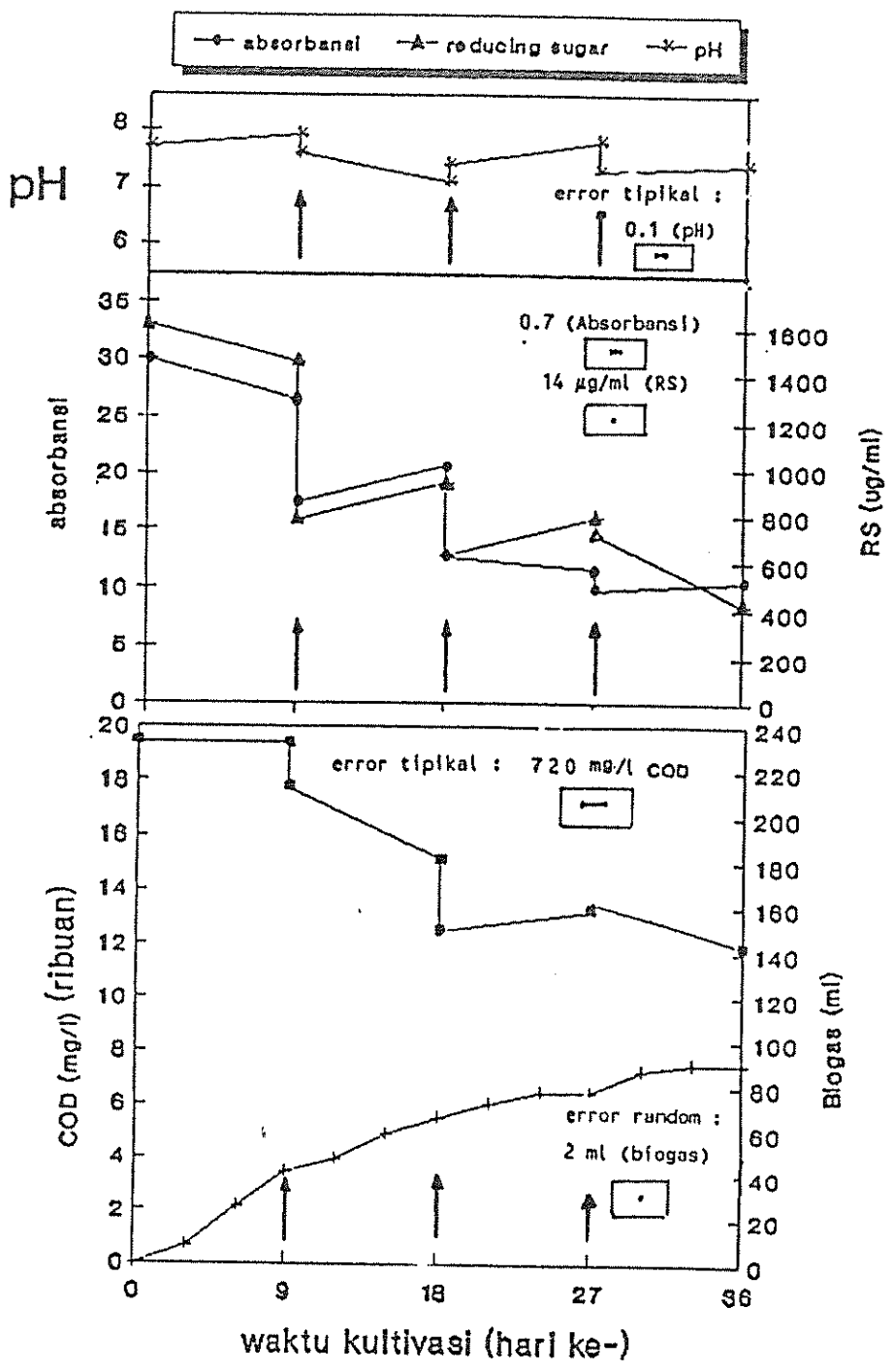
Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa kultur F yang *seed sludge*-nya tersusun dari 75 persen kotoran sapi (KS) dan 25 persen *sludge lagoon* (SL) mempunyai

aktifitas dekolorisasi yang konsisten sampai tahap ke-5 sistem semi kontinyunya. Konsentrasi 75 persen KS dan 25% SL diduga mampu memberikan sistem metabolisme bakteri yang sinergis dalam mendegradasi melanoidin.

Seperti dijelaskan oleh Sirianuntapiboon *et al.* (1988) dan Ohmomo *et al.* (1988c), penurunan tingkat dekolorisasi pada kultur F dengan bertambahnya tahap kultivasi diduga karena pengaruh kejutan nutrien baru yang ditambahkan, semakin kompleknya struktur fraksi-fraksi melanoidin yang tersisa, dan karena pengaruh anion superoksida ( $O_2$ ) yang belum tereduksi secara sempurna. Disamping itu fraksi padat *sludge* yang hanya 1 persen nilai MLSS-nya (*Mixed Liquor Suspended Solid*) jauh dari fraksi padat optimal (7-9 persen) untuk mendapatkan aktifitas dekolorisasi yang konstan.

Kultur dengan 50 persen KS dan 50 persen SL (H) serta 0 persen KS dan 100 persen SL (P) diduga terlalu tinggi kandungan MA-nya sehingga sulit untuk memberikan aktifitas dekolorisasi.

Perbedaan sifat dan karakteristik koloni bakteri yang hidup di dalam masing-masing *seed sludge* dan perbedaan distribusi berat molekul fraksi-fraksi penyusun melanoidin, juga menyebabkan perbedaan tingkat dekolorisasi. Pada kultur F distribusi berat molekul diduga terfokuskan pada fraksi-fraksi yang mempunyai berat molekul rendah, sehingga seperti



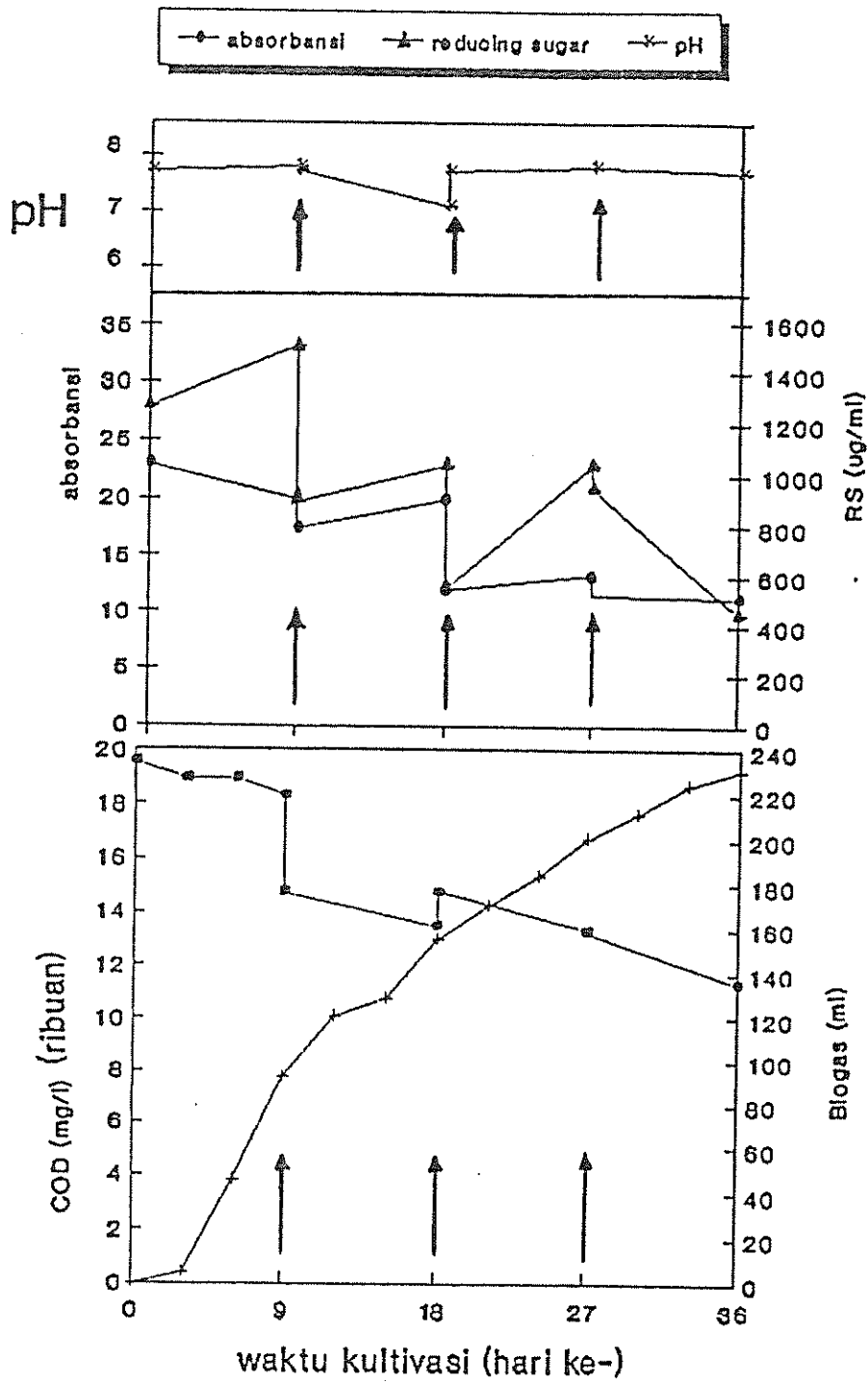
**A** —●— COD    —+— Biogas    ↑ = penyesuaian nutrisi

residu + 2.5% MA + 2.50% MS  
 50% (v/v) KS:SL = 75% : 25%  
 orlenmeyer, 6% MLSS, 2 ulangan

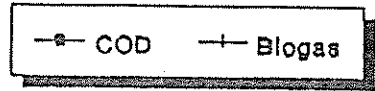
Gambar 3. Pengaruh beban limbah campuran (5% MS-MA) pada aktivasi *sludge stock* selama 2 hari, 6% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin

Halo Guru Pendidikan Lingkungan  
 1. Dukung kegiatan belajar-mengajar yang berorientasi pada pengembangan dan peningkatan sumber daya manusia  
 2. Berikan bimbingan, arahan, dan motivasi kepada mahasiswa dalam proses belajar-mengajar  
 3. Berikan penilaian yang objektif dan adil terhadap prestasi belajar mahasiswa  
 4. Berikan umpan balik yang konstruktif kepada mahasiswa untuk meningkatkan kualitas belajarnya  
 5. Berikan informasi yang akurat dan terkini mengenai perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi  
 6. Berikan informasi yang akurat dan terkini mengenai perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi





C



residu 1% MS sludge stock  
 50% (v/v) K3:SL = 75% : 25%  
 erlenmeyer, 6% MLSS, 2 ulangan

Gambar 4. Pengaruh beban limbah residu 1% MS pada aktivasi *sludge stock* selama 2 hari, 6% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin

umumnya mekanisme koloni bakteri anaerobik, kondisi tersebut sangat mendukung terjadinya dekolorisasi. Kondisi yang terakhir ini tidak dipunyai oleh kultur yang tersusun dari 100 persen KS dan 0 persen SL (C), 50 persen KS dan 50 persen SL (H), serta 0 persen KS dan 100 persen SL (P). Dengan demikian kultur dengan 75 persen KS dan 25 persen SL direkomendasikan untuk digunakan pada kajian-kajian selanjutnya.

## 2. Variasi Beban Limbah Melanoidin

- a. Variasi beban limbah pada kultur dengan 6 persen MLSS dan aktifasi *sludge stock* selama 2 hari (Inokulasi II).

Pada inokulasi ini, variasi dilakukan dalam 2 taraf dengan 2 ulangan, yaitu kultur dengan beban limbah campuran 5 persen MS-MA (A) dan kultur dengan beban limbah residu 1 persen MS dari kulti-vasi *sludge stock* (C). Selain pengaruh aktifasi *sludge stock* yang hanya 2 hari dan kandungan MLSS sebesar 6 persen, pengaruh pencampuran MS dan MA juga akan dianalisa untuk mendapatkan kualitas penanganan yang terbaik.

Pada Gambar 3 dan 4 disajikan error dari masing-masing parameter bioreaktor. Nilai error untuk pH, RS, absorbansi dan COD merupakan error tipikal, masing-masing adalah 0.1, 14  $\mu\text{g/ml}$ , 0.7

(absorbansi) dan 720 mg/l. Untuk produksi biogas kumulatif digunakan *error random* yang besarnya 2 ml. Nilai-nilai *error* ini berlaku juga untuk inokulasi-inokulasi selanjutnya.

Pada tahap kultivasi, koloni bakteri akan terlebih dahulu mendegradasi MS (baik residu maupun MS segar) untuk mendapatkan sumber energi bagi pertumbuhannya. Pertumbuhan kultur dengan beban limbah residu 1 persen MS (C) lebih baik dibandingkan kultur dengan campuran 5 persen MS-MA (A). Pada kultur C produksi biogas kumulatif mencapai 239 ml, dengan *slope* 6.41, jauh lebih tinggi dari kultur A yang hanya 90 ml dengan *slope* 2.34.

Dengan aktifasi *sludge stock* yang hanya 2 hari pada kultur yang mengandung MA tinggi (A), produksi biogasnya berkurang. Untuk meningkatkan laju produksi biogas pada kultur A waktu adaptasi *sludge stock* harus diperpanjang. Pada kultur A, pencampuran MS dan MA juga menyebabkan laju produksi biogas menurun begitu fraksi-fraksi sederhana yang berasal dari MS habis dirombak oleh koloni bakteri. Dengan demikian hidrolisa melanoidin (MA dan MS) menjadi fraksi-fraksi yang lebih sederhana merupakan faktor pembatas yang akan menentukan keberhasilan proses degradasi melanoidin.



Nilai pH pada tahap kedua kultivasi (hari ke-9 sampai ke-18) menurun, seperti terlihat pada Gambar 3 dan 4. Penurunan pH tersebut terjadi karena pada tahap awal metanogenesis, sistem fermentasi menjadi tidak seimbang, antara lain diakibatkan oleh laju asetogenesis yang melebihi metanogensisnya (Malina dan Pohland, 1992).

Meskipun koloni bakteri lebih mudah merombak MS, namun kemampuan dekolorisasi yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan apabila koloni bakteri tersebut berhasil merombak MA. Hal ini dapat dilihat dari tingkat dekolorisasi kultur dengan beban limbah 5 persen MS-MA (A=3 persen) yang lebih tinggi dibandingkan kultur dengan beban limbah residu 1 persen MS (C=0 persen).

Hipotesa yang bisa dikemukakan adalah koloni bakteri yang mampu menggunakan MA untuk metabolis-nya akan lebih cepat beradaptasi pada kondisi pertumbuhan yang kurang menguntungkan. Setelah kemampuan adaptasi tersebut diperoleh, koloni bakteri akan terus merombak struktur MA untuk mempertahankan hidupnya. Bila perombakan/ hidrolisa struktur MA yang merupakan faktor pembatas tersebut sudah tidak mengalami hambatan, dengan sendirinya tingkat dekolorisasi, produksi biogas dan COD *removal*-nya akan mencapai optimal.

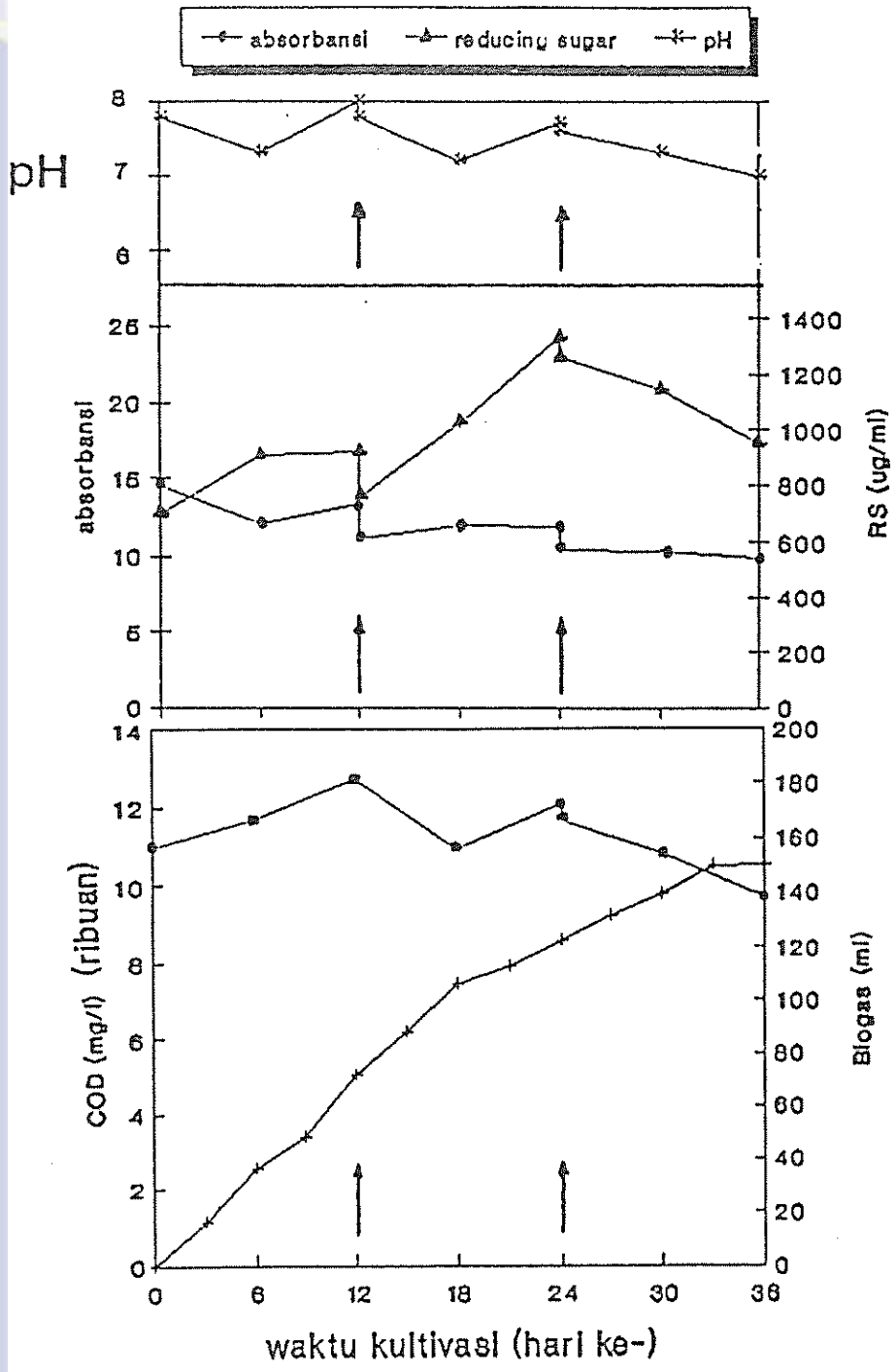
Seperti disajikan pada Gambar 3 dan 4, setelah hari ke-24 proses hidrolisa kurang dominan, dilihat dari tingkat dekolorisasi, COD kultur dan RS-nya. Diduga penurunan aktifitas hidrolisa ini akan mencapai maksimal bila koloni bakteri sudah tidak mampu merombak fraksi-fraksi kompleks pada melanoidin. Dengan demikian selama masih ada kompleks yang dirombak dan menghasilkan fraksi-fraksi dengan BM rendah, kenaikan RS masih mungkin terjadi lagi.

COD *removal* yang dihasilkan oleh kultur dengan beban limbah campuran 5 persen MS-MA (A) yaitu 34 persen dan kultur dengan residu 1 persen MS (C) yaitu 22 persen pada inokulasi II melebihi COD *removal* pada inokulasi selanjutnya. Diduga kecenderungan ini diakibatkan karena secara kuantitas, *seed sludge* inokulasi II paling besar dibandingkan inokulasi lainnya. Waktu aktivasi yang hanya 2 hari menyisakan MS yang lebih mudah dirombak oleh koloni bakteri dan kondusif bagi pencapaian COD *removal*, walaupun jelek aktivitas dekolorisasinya.

Hasil kuantifikasi kandungan metana dari biogas yang hanya 1-2 persen, sementara COD *removal* dapat mencapai 34 persen (kultur A), merupakan hasil yang cukup bagus bagi degradasi melanoidin tanpa adanya aktifitas bakteri metanogenesis. Selanjutnya perlu dilakukan kajian tentang kemungkinan



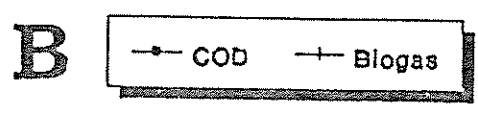
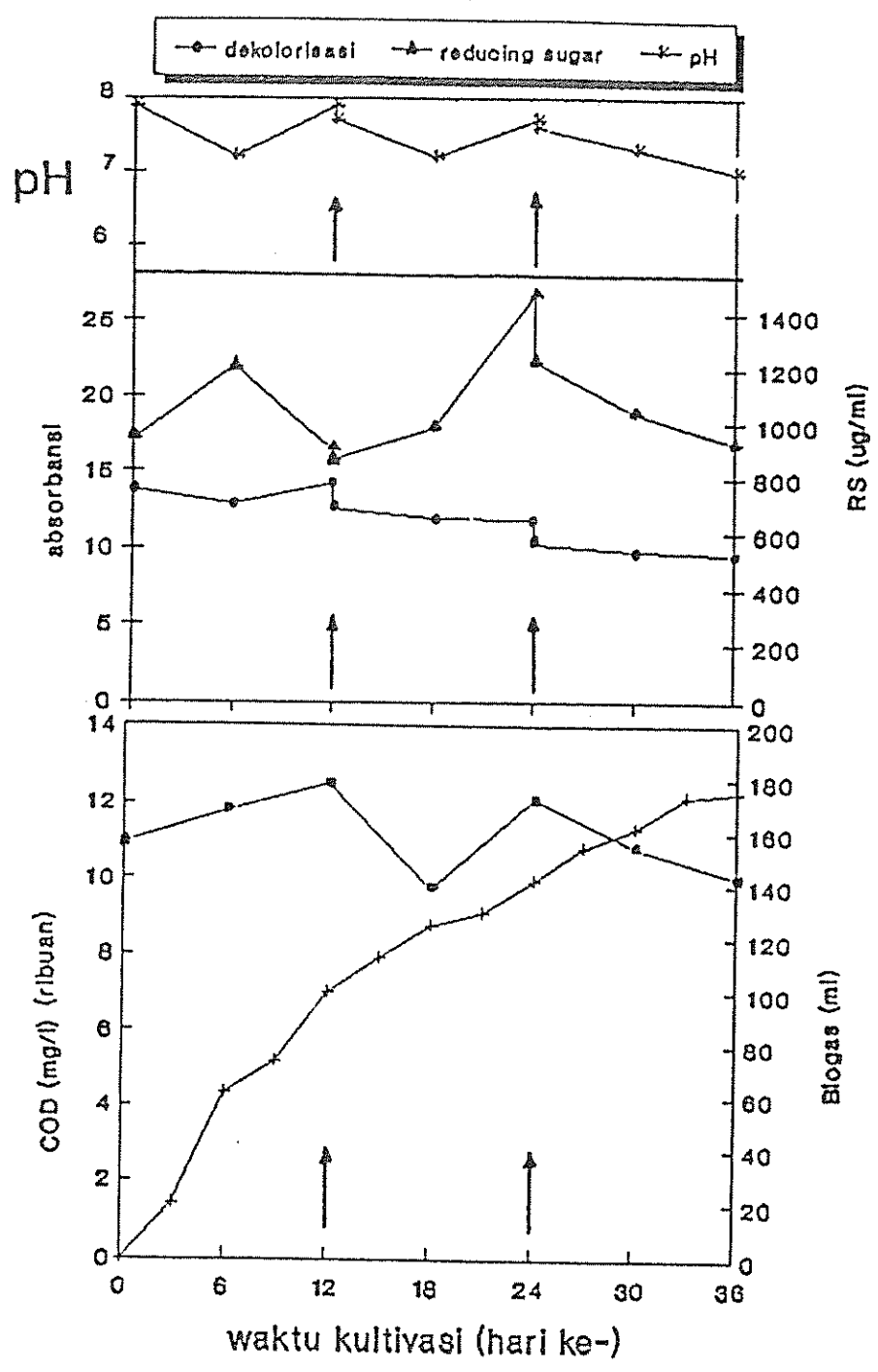
Uick cpa mltk IPB University



**A** —●— COD    —+— Biogas    ↑ = penyesuaian nutrisi

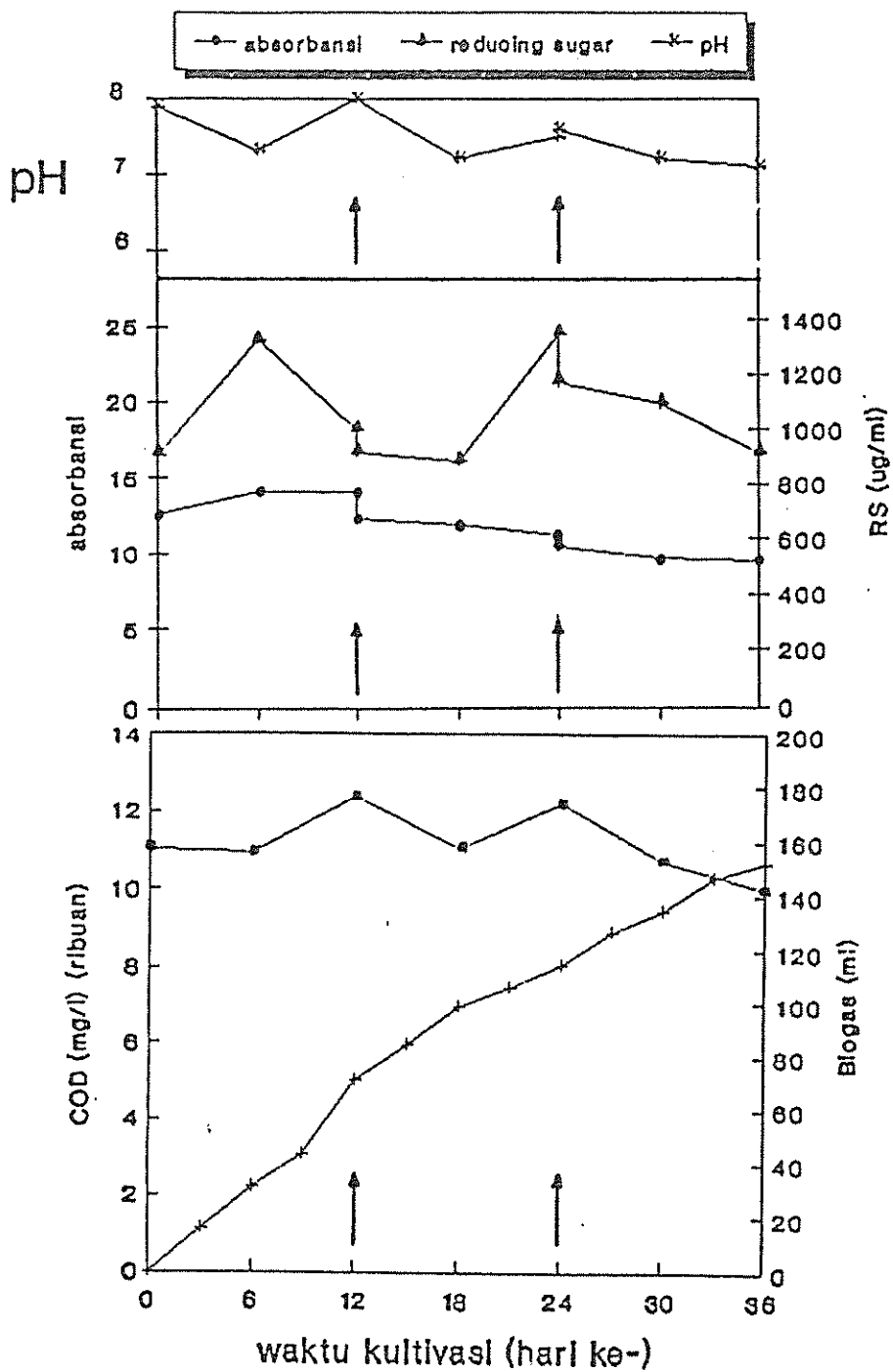
residu + 2% MS, botol serum  
30% (v/v) K9:9L = 75% : 25%  
2% MLSS, 2 ulangan

Gambar 5. Pengaruh beban limbah residu + 2% MS pada kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



residu 1% MS + 2% MA, botol serum  
30% (v/v) KS:SL=75%:25%, 2 ulangan  
variasi beban limbah (2% MLSS)

Gambar 6. Pengaruh beban limbah residu + 2% MA pada kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin

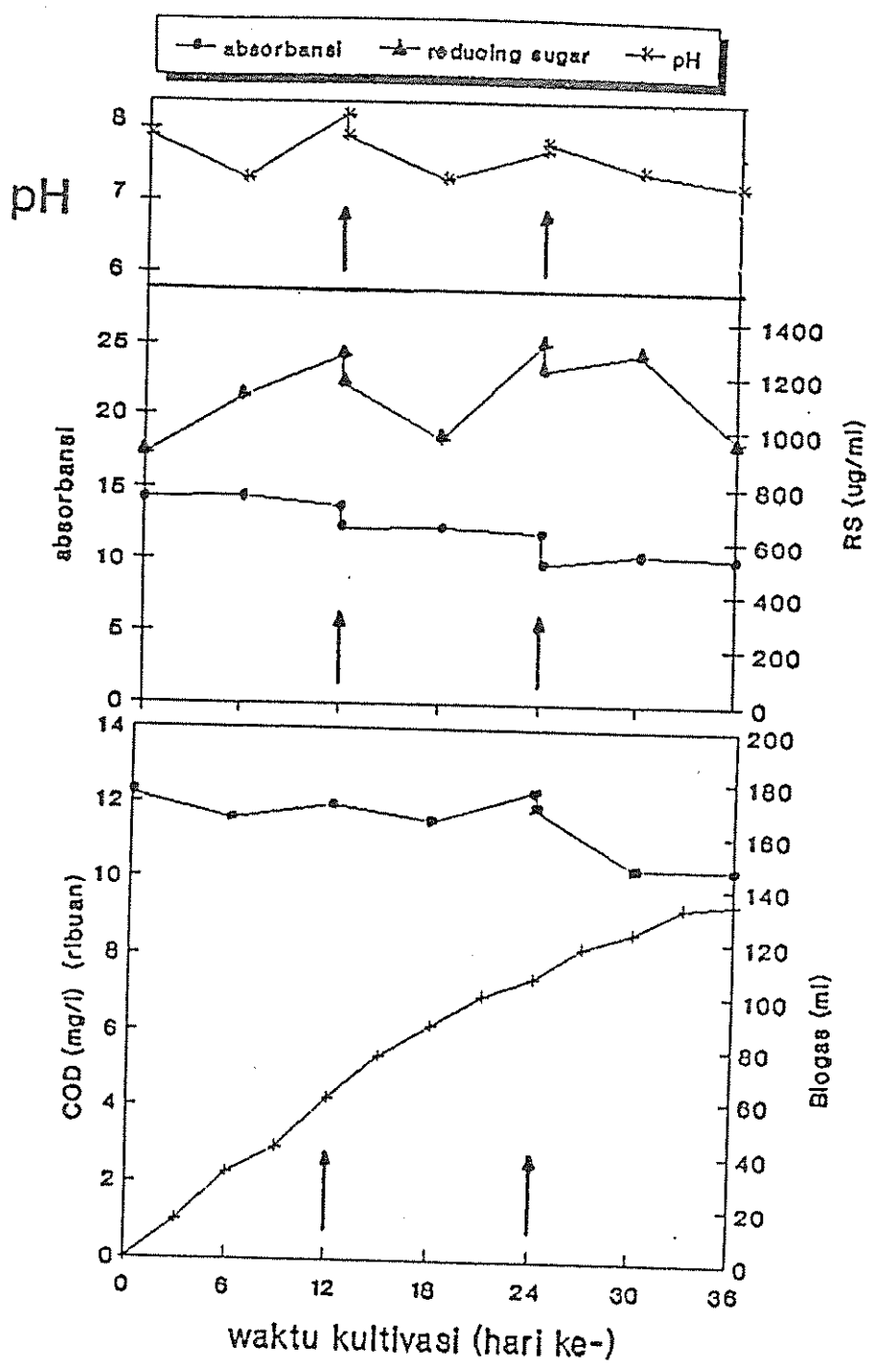


**C** — COD — Biogas

residu + 4% MS, botol serum  
30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%  
2% MLSS, 2 ulangan

Gambar 7. Pengaruh beban limbah residu + 4% MS pada kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin

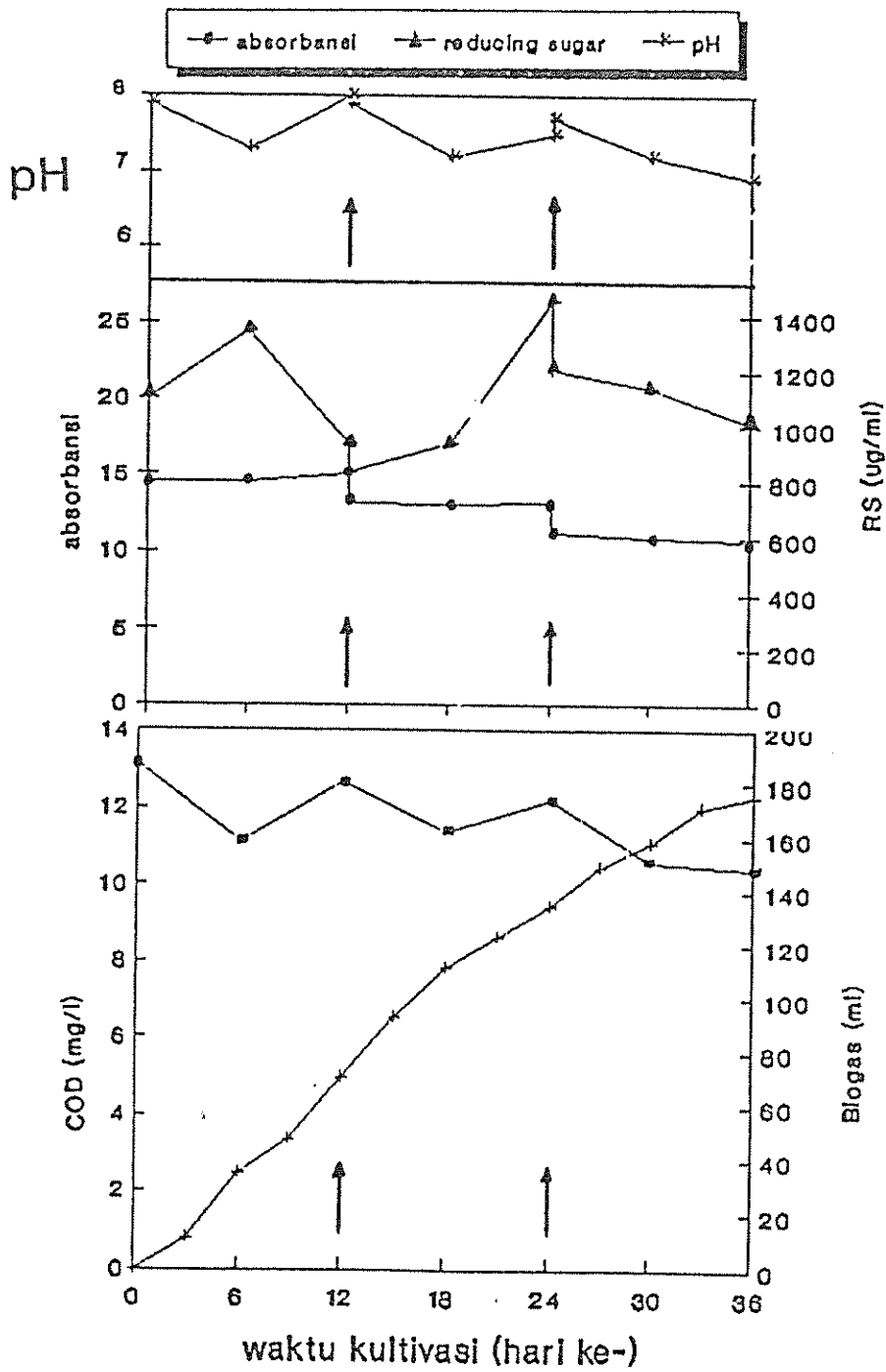




**E**  $\bullet$  COD  $\times$  Biogas

residu + 6% MS, botol serum  
30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%  
2% MLSS, 2 ulangan

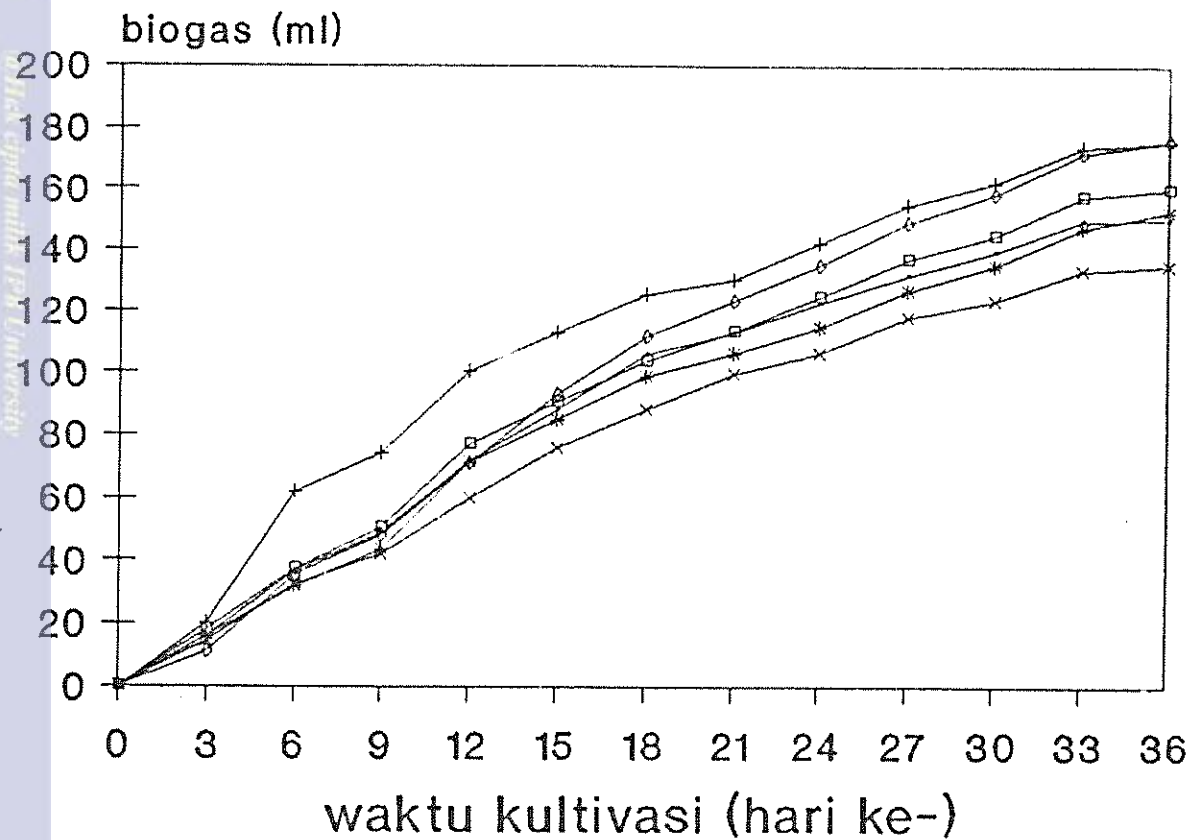
Gambar 9. Pengaruh beban limbah residu + 6% MS pada kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



**F**      —●— COD      —▲— Biogas

residu + 6% MA, botol serum  
 30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%  
 2% MLSS, 2 ulangan

Gambar 10. Pengaruh beban limbah residu + 6% MA pada kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan, 2% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



Keterangan : Konsentrasi *seed sludge* 30 persen, 2 persen MLSS dengan variasi beban limbah sebagai berikut :

1. Kultur A (—) : residu MS + 2 persen MS
2. Kultur B (—+ ) : residu MS + 2 persen MA
3. Kultur C (—\* ) : residu MS + 4 persen MS
4. Kultur D (—□ ) : residu MS + 4 persen MA
5. Kultur E (—X ) : residu MS + 6 persen MS
6. Kultur F (—◇ ) : residu MS + 6 persen MA

Kandungan  $\text{CH}_4$  dalam biogas sangat rendah, berkisar 1-2 persen (4 ulangan pengukuran pada sampel yang berbeda dengan  $\text{CH}_4$ -analyzer)

Gambar 11. Perbandingan kualitas produksi biogas pada berbagai taraf beban limbah, 2% MLSS dan 1 bulan kultivasi *sludge stock*

bakteri non-metanogenesis yang mampu memberikan kontribusi COD *removal* tersebut.

Untuk inokulasi selanjutnya, pemberian beban limbah campuran MS dan MA sebaiknya dihindarkan karena memberikan hasil penanganan yang kurang baik. Kecenderungan ini diakibatkan karena begitu fraksi-fraksi sederhana dari MS dirombak, koloni bakteri menjadi sangat sulit untuk segera dapat mendegradasi MA yang jauh lebih kompleks.

**b. Variasi beban limbah pada kultur dengan 2 persen MLSS dan kultivasi *sludge stock* selama 1 bulan (Inokulasi III).**

Variasi beban limbah dalam 6 taraf dengan 2 ulangan (residu MS dari kultivasi *sludge stock* ditambah 2 persen MS, 2 persen MA, 4 persen MS, 4 persen MA, 6 persen MS dan 6 persen MA) ini memisahkan suplemen MS dan MA sebagai beban limbah. Hasil analisa disajikan pada Gambar 5-11 dan Tabel 7. Walaupun secara kuantitas *seed sludge* inokulasi III (2 persen MLSS) lebih kecil dibandingkan inokulasi II (6 persen MLSS), namun secara kualitas *seed sludge* inokulasi III diharapkan lebih superior karena lebih lama disuburkan (1 bulan).

Mekanisme dekolorisasi dari *sludge* inokulasi III diduga mempunyai persamaan dengan enzim P IV yang dihasilkan *strain Coriolus versicolor* Ps4a

(Ohmomo et al., 1985a). Mekanisme yang dimaksud adalah dekolorisasi secara langsung dari fraksi-fraksi melanoidin, tanpa melalui sub reaksi oksidasi glukosa. Dengan demikian untuk memperoleh aktifitas dekolorisasi pada kultur penyuburan tidak perlu ditambahkan glukosa. Pada inokulasi yang telah dilakukan, imobilisasi sel belum dapat diterapkan, karena belum diisolasinya koloni bakteri.

Perlakuan dialisis dapat meningkatkan COD removal dan TOC removal pada kapang, namun menurunkan aktifitas dekolorisasinya (Ohmomo et al., 1987). Kecenderungan ini diduga juga berlaku bagi koloni bakteri anaerobik, karena dialisis mengakibatkan senyawa-senyawa sederhana (berat molekul kurang dari 10 K Dalton) yang dapat langsung digunakan untuk metabolisme bakteri, dikeluarkan dari sistem. Namun demikian dialisis akan memperpendek waktu perolehan koloni bakteri superior.

Tingkat dekolorisasi tertinggi diperoleh kultur D (18 persen) yang mempunyai beban limbah residu MS dan 4 persen MA (Gambar 8). Hipotesa tentang pola dekolorisasi pada kultur dengan beban limbah residu MS dan 4 persen MA (kultur D) yang dapat dikemukakan adalah kesamaannya dengan pola dekolorisasi enzim P III dan P IV dari *Coriolus versicolor* Ps4a, dimana MA pada konsentrasi optimal



mempunyai tingkat dekolorisasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan MS (Ohmomo et al., 1985a).

Aktifitas dekolorisasi pada kultur yang disuburkan juga dapat dijelaskan dengan penelitian Murata et al. (1991) yang menggunakan pati sebagai sumber karbon untuk mendegradasi melanoidin. Pada penelitian tersebut pati yang seperti halnya MA merupakan struktur kompleks (polimer) harus dihidrolisa terlebih dahulu menjadi fraksi-fraksi dengan BM rendah. Salah satu indikator bahwa fraksi-fraksi sederhana hasil perombakan tersebut telah dikonsumsi oleh koloni bakteri adalah penurunan warna kompleks melanoidin.

Pada kultur dengan beban limbah residu MS dan 2 persen MS (A), residu dan 2 persen MA (B) serta residu dan 4 persen MS (C), tingkat dekolorisasinya hampir sama, masing-masing 9, 9 dan 6 persen. Namun demikian, beban limbah yang terlalu tinggi akan menurunkan aktifitas dekolorisasi. Semakin tinggi beban limbah yang diinjeksikan, akumulasi fraksi-fraksi yang tersisa dari proses hidrolisa melanoidin juga semakin kompleks. Penurunan dekolorisasi ini nampak pada Gambar 9 dan 10 dimana tingkat dekolorisasi kultur dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MS (E) serta residu dan 6 persen MA (F), masing-masing hanya 1 dan 0 persen.



Untuk pengembangan penelitian dekolorisasi selanjutnya, disarankan menggunakan formulasi kultur dengan beban limbah 4 persen MA (D). Untuk mencapai efluen yang memenuhi baku mutu, penggabungan dengan koloni bakteri lain yang spesifik mereduksi beban limbah lainnya seperti BOD dan COD pada reaktor yang sama dapat dipertimbangkan.

Supernatan limbah cair distilasi etanol dari molases (MA) mempunyai kandungan RS 2563  $\mu\text{g/ml}$ , lebih besar dari RS MS yang hanya 533  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai tersebut diperoleh setelah melanoidin didialisis selama 4 hari. Pada semua kultur inokulasi III semakin besar konsentrasi melanoidin yang ditambahkan, RS awal sebelum kultivasi juga meningkat. Karena komposisi gula-gula sederhana yang lebih bervariasi, pada konsentrasi yang sama kultur dengan beban limbah MA mempunyai RS yang lebih tinggi dibandingkan kultur dengan beban limbah MS.

Pada variasi beban limbah dengan 2 persen MLSS ini, kompleks melanoidin akan terpecahkan menjadi fraksi-fraksi dengan berat molekul rendah dan secara dominan berlangsung sampai dengan hari ke-24. Dengan mempertimbangkan error tipikal pengukuran RS (12  $\mu\text{g/ml}$ ), kandungan RS akan menurun secara signifikan setelah hari ke-24 kultivasi.



Namun demikian, muncul hipotesa bahwa belum semua fraksi-fraksi melanoidin yang bisa didegradasi, terutama fraksi-fraksi dengan berat molekul tinggi. Keberadaan fraksi-fraksi non-melanoidin tersisa lainnya semakin mempersulit proses degradasi. Dengan semakin seringnya transfer *broth*, peningkatan beban limbah, optimalisasi kondisi pertumbuhan, dan isolasi koloni bakteri, diharapkan fraksi-fraksi melanoidin maupun non-melanoidin yang tersisa yang mempunyai berat molekul tinggi tersebut dapat dirombak.

Kisaran pH antara 7-8 pada variasi beban limbah (2 persen MLSS) selama 36 hari kultivasi, seperti disajikan pada Gambar 5-10 cukup aman bagi keseimbangan proses fermentasi. Nilai pH masih di atas 6.2 yang pada *strain* bakteri metana tertentu mempunyai pengaruh toksik (Dissanayake, 1977). Dengan pH relatif konstan ini akumulasi produksi asam yang berlebihan diperkirakan dapat ditekan.

Untuk memperoleh kualitas penanganan yang tinggi, selain pH, kebutuhan karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan koloni bakteri harus tercukupi. Pada penelitian ini, kebutuhan nitrogen antara lain berasal dari  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dalam konsentrasi yang sangat rendah (0.056 g/l). Kekurangan sumber nitrogen, sebagaimana sumber karbon diperkirakan berasal dari





degradasi melanoidin. Meskipun prinsip media "miskin hara" ini pada tahap awal sukar sekali memenuhi kualitas yang diharapkan, dalam jangka panjang diduga akan aplikatif, murah dan efisien.

COD *removal* yang tinggi hanya dapat dicapai oleh sistem fermentasi kontinyu dan keberadaan bakteri metanogenesis yang mengkonversi bahan organik menjadi metana. COD *removal* tidak pernah memuaskan bila sistem dilakukan secara curah ataupun semi kontinyu. Pada sistem kontinyu, gula-gula bebas secara terus-menerus tersedia dari medium segar yang diumpankan, dan secara otomatis akan menurunkan COD limbah yang ditangani. Dengan demikian sumber karbon yang masih berupa fraksi-fraksi kompleks melanodin tidak kondusif terhadap pencapaian COD *removal* yang tinggi.

Dilihat dari COD *removal*, dengan semakin beratnya beban limbah, justru akan semakin meningkatkan COD *removal*-nya. COD *removal* yang cukup tinggi pada kultur dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MS (E) yaitu 11.8 persen serta residu dan 6 persen MA (F) yaitu 21 persen, antara lain disebabkan tingginya kandungan RS awal pada kedua kultur tersebut. Tingginya RS sebelum kultivasi lebih memudahkan koloni bakteri menggunakannya sebagai sumber energi, walaupun hanya sebatas pada

tahap awal kultivasi. Dari Gambar 5-10 terlihat bahwa melanoidin didegradasi setelah konsentrasi RS kultur dalam keadaan sangat terbatas, sehingga COD removal-nyapun menurun.

Bila dilihat grafik COD dari masing-masing kultur inokulasi III (Gambar 5-10), terjadi kenaikan nilai COD kultur menjelang hari ke-12 dan hari ke-24 kultivasi (di atas error sistematis yang ditoleransi sebesar 720 mg/l). Kenaikan COD yang seharusnya tidak terjadi pada sistem fermentasi semi kontinyu ini, diduga diakibatkan pengaruh kejutan karena penurunan suhu pertumbuhan. Suhu pertumbuhan 37°C seringkali tidak bisa dipertahankan karena aliran listrik mati dan intensitas terbesarnya terjadi menjelang hari ke-12 dan hari ke-24 kultivasi.

Penurunan COD kultur secara nyata terjadi setelah hari ke-24 kultivasi (Gambar 5-10). Diduga setelah hari ke-24 kultivasi, konsumsi gula-gula sederhana hasil pemecahan melanoidin mencapai optimal. Sebaliknya penurunan RS yang juga terjadi secara signifikan setelah hari ke-24 kultivasi mengindikasikan aktifitas hidrolisa melanoidin menurun. Keadaan demikian sangat kondusif bagi koloni bakteri dalam merombak COD kultur.



Nilai COD tidak berubah pada saat sebelum dan sesudah penyesuaian nutrisi (hari ke-12 dan hari ke-24 kultivasi). Kecenderungan ini dapat diterima, mengingat konsentrasi 10 persen medium segar yang diinjeksikan, hanya merubah nilai COD sekitar 100 mg/l dan tidak terdeteksi oleh metoda pengukur.

Produksi biogas bertambah secara kontinyu, seiring dengan bertambahnya waktu kultivasi. Produksi biogas mencapai optimal (*slope* paling tegak) pada tahap-1 kultivasi, yaitu sampai dengan hari ke-12. Kecenderungan ini diduga karena kandungan fraksi-fraksi melanoidin yang relatif lebih sederhana, cukup tersedia pada awal inokulasi. Setelah hari ke-12 *slope* produksi biogas cenderung menurun, meskipun tidak tajam.

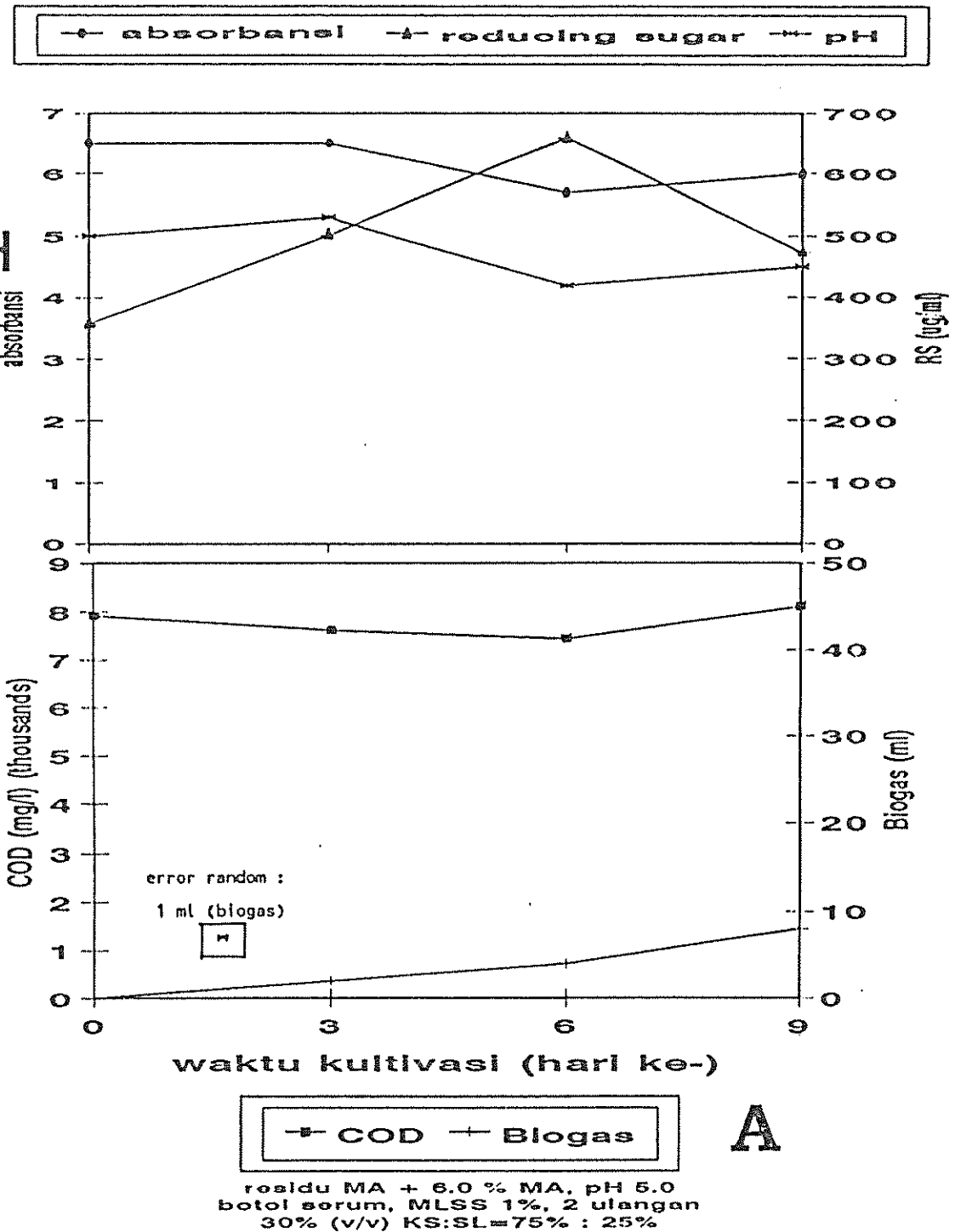
Pada variasi beban limbah (2 persen MLSS), kultur yang menggunakan MA sebagai sumber energinya lebih banyak memproduksi biogas dibandingkan dengan kultur yang menggunakan MS (Gambar 6, 8, dan 10). Hal ini semakin memperkuat hipotesa sebelumnya, meskipun MA sukar untuk didegradasi, namun bila koloni bakteri telah berhasil merombaknya, kandungan dan variasi gula-gula sederhana akan semakin banyak. Kultur F dengan beban limbah terberat (residu+6 persen MA) memberikan produksi dan *slope* biogas tertinggi, yaitu 176 dan 5.05 (Gambar 10).

Dari Gambar 11 dapat dilihat produksi dan *slope* biogas kultur dengan 4 persen MA (D=160 ml, 4.32) dan kultur dengan 2 persen MA (B=175 ml, 4.30). Kultur dengan beban limbah MS lebih kecil produksi biogasnya, masing-masing adalah kultur dengan 4 persen MS (C=152 ml, 4.14), 2 persen MS (A=150 ml, 4.12) dan 6 persen MS (E=135 ml, 3.72).

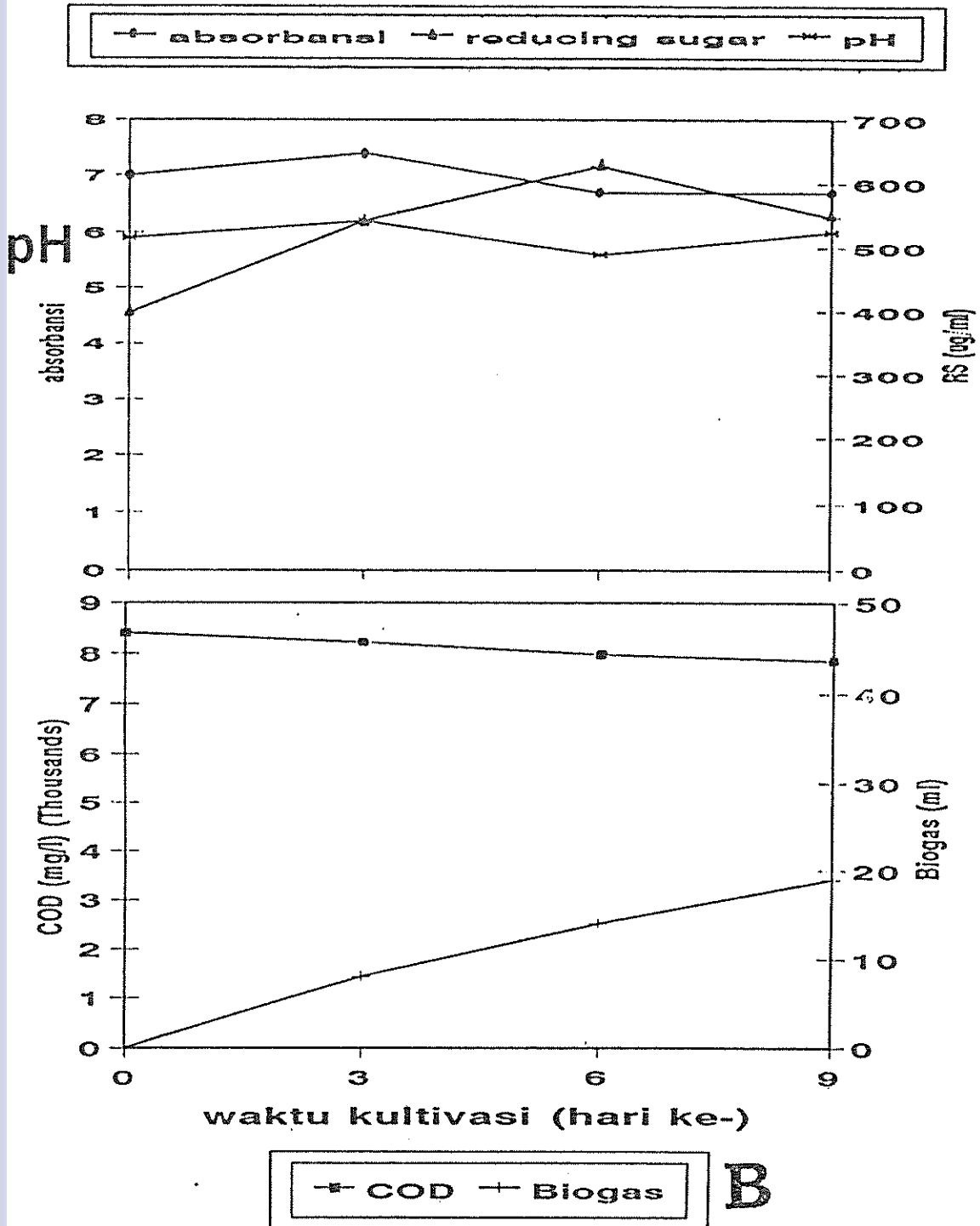
Hasil analisa  $\text{CH}_4$  dengan menggunakan  $\text{CH}_4$ -*analyzer* menunjukkan sangat rendahnya konsentrasi  $\text{CH}_4$  dalam biogas (1-2 persen). Hipotesa pertama yang muncul adalah ketidakadaan strain bakteri metanogenesis yang mengkonversi bahan organik menjadi metana. Akibatnya terjadi ketidakseimbangan pemakaian hidrogen untuk mengoksidasi metana dengan hidrogen yang mereduksi akseptor elektron (sulfat dan nitrat) menjadi  $\text{H}_2\text{S}$ , amoniak dan nitrogen. Ketidakseimbangan sintropi tersebut mengakumulasikan hidrogen dalam konsentrasi berlebih. Akumulasi hidrogen inilah yang menginhibisi proses metanogenesis. Bila hal ini yang terjadi, disarankan dilakukan penambahan strain bakteri metana seperti *Methanosarcina*, *Methanothrix* dan *Methanobacterium* pada kultur.

Hipotesa lainnya adalah keberadaan material toksik pada limbah yang ditangani dan menyebabkan represi pada aktivitas metanogenesis. Bila hal ini



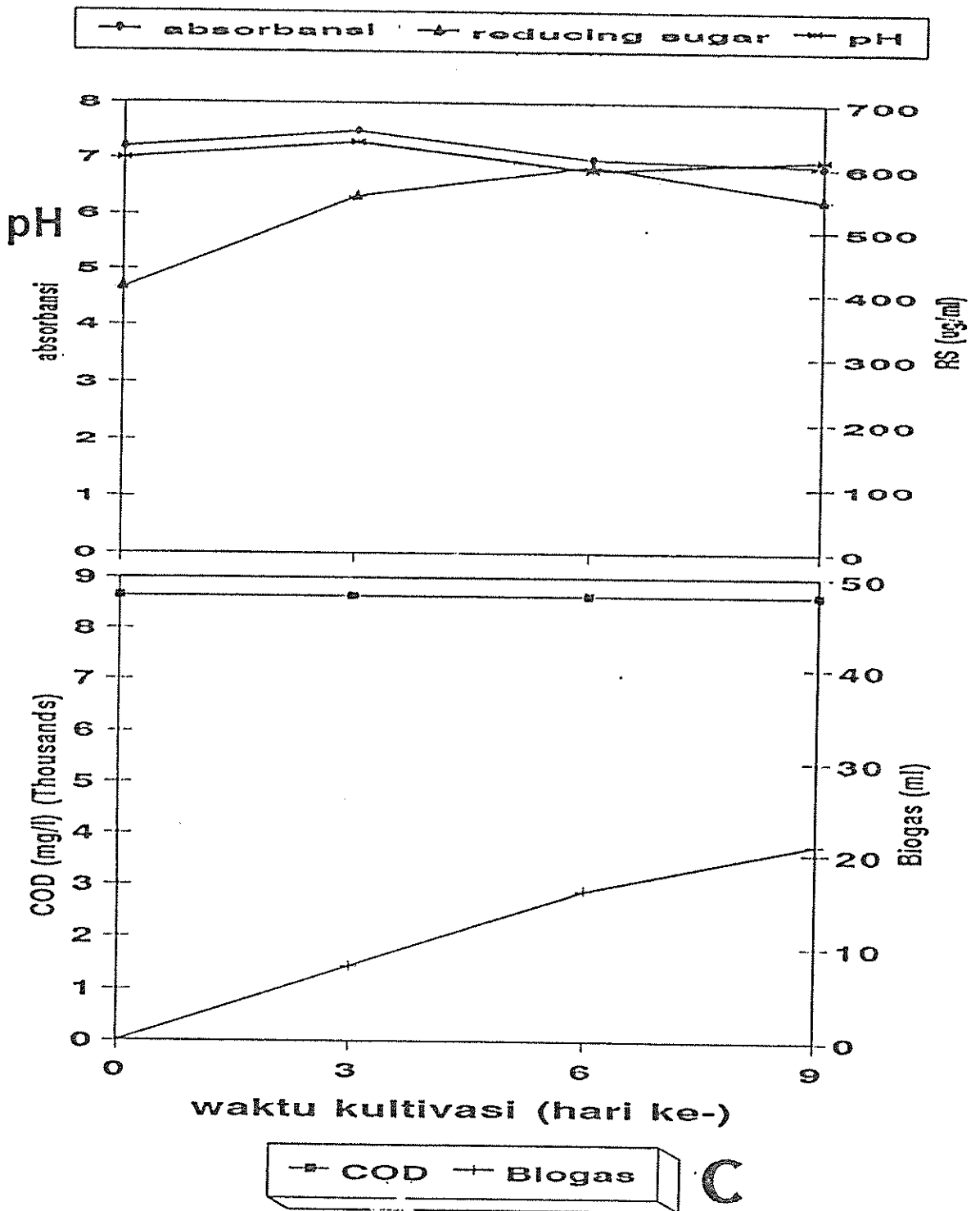


Gambar 12. Pengaruh pH awal 5 pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



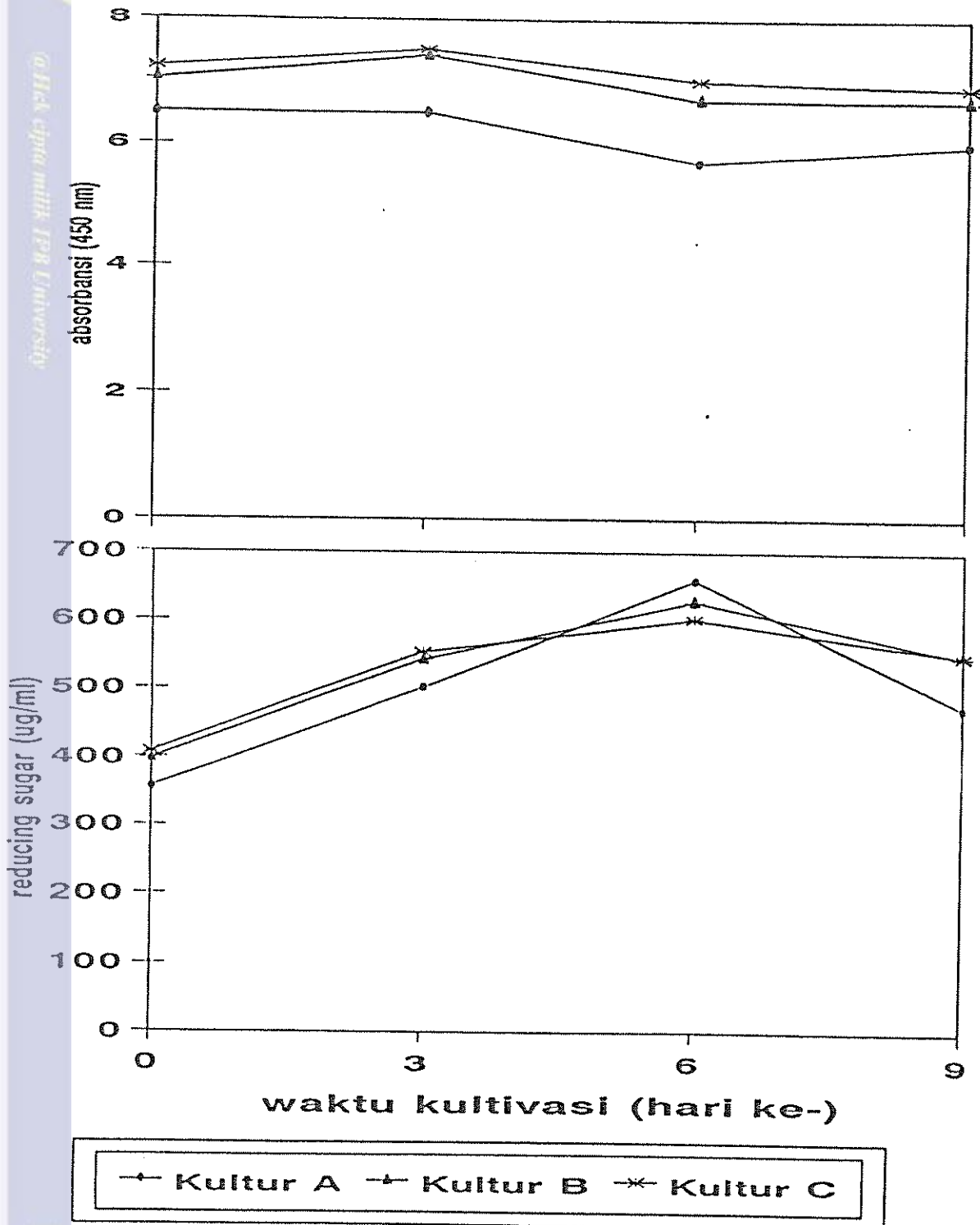
residu MA + 6.0 % MA, pH 5.9  
 botol serum, MLSS 1%, 2 ulangan  
 30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%

Gambar 13. Pengaruh pH awal 5.9 pada transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



residu MA + 6.0 % MA, pH 7.0  
botol serum, MLSS 1%, 2 ulangan  
30% (v/v) KS:SL=75% : 25%

Gambar 14. Pengaruh pH awal 7.0 pada transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



residu MA + 6.0 % MA  
 botol serum, MLSS 1% , 2 ulangan  
 30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%

Gambar 15. Perbandingan kualitas dekolorisasi dan reducing sugar pada berbagai taraf pH, transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA, 1% MLSS dan 1 bulan kultivasi sludge stock



yang terjadi, setelah material toksik tersebut teridentifikasi, secepatnya harus dikeluarkan dari sistem fermentasi. Belum adanya kajian tentang metanogenesis pada degradasi melanoidin secara anaerobik sampai saat ini, memungkinkan masih terdapatnya faktor-faktor lain yang menghambat dan merepresi proses metanogenesis.

Secara keseluruhan dari variasi beban limbah pada 2 persen MLSS (inokulasi III) didapatkan suatu rekomendasi bahwa kultur dengan beban limbah residu MS dan 4 persen MA (D) memberikan kualitas penanganan paling optimal.

### 3. Variasi pH Awal Kultivasi (Inokulasi IV)

Setelah diperoleh hasil optimal pada variasi beban limbah, dilakukan transfer *broth* dari kultur dengan beban limbah MA (B=2 persen MA, D=4 persen MA dan F=6 persen MA) untuk divariasikan nilai pH-nya. Nilai pH optimal dari 3 taraf percobaan dengan 2 ulangan (pH 5, 5.9 dan 7) diharapkan dapat diperoleh dari inokulasi IV ini. Beban limbah baru yang diinjeksikan cukup tinggi, yaitu 6 persen MA. Dengan langkah ini diharapkan koloni bakteri yang disuburkan akan semakin superior dalam mendegradasi melanoidin.

Pada penyuburan kultur dengan variasi pH ini tingkat dekolorisasi yang berhasil dicapai sangat



rendah, yaitu 4-8 persen. Hipotesa yang dapat dikemukakan adalah terjadinya penurunan tingkat dekolorisasi, diduga diakibatkan karena belum cukupnya waktu kultivasi (hanya 9 hari), MLSS yang semakin encer karena transfer *broth* (1 persen), beban limbah yang bertambah dan variasi perlakuan yang belum diadaptasi sempurna. Waktu kultivasi harus ditingkatkan bila diinginkan tingkat dekolorisasi yang lebih tinggi.

Pada inokulasi dengan variasi pH ini, kultur dengan pH awal 5 (A), paling tinggi tingkat dekolorisasinya (8 persen), sedangkan kultur dengan pH awal 5.9 dan 7 memberikan kontribusi dekolorisasi yang sama, yaitu 4 persen. Tingkat dekolorisasi yang lebih tinggi justeru pada pH rendah (pH 5), diduga karena pada pH rendah aktifitas koloni bakteri anaerobik penghasil asam yang mempunyai kemampuan mendekolorisasi melanoidin meningkat. Akibatnya *slope* biogas kultur A paling rendah (1.0) dan terjadi penurunan pH pada hari ke-6 dan ke-9, masing-masing 4.2 dan 4.5 dari pH awal 5. Pada kajian selanjutnya, perlu dilakukan langkah identifikasi apakah pola dekolorisasi pada pH 5 ini mempunyai kesamaan dengan dekolorisasi oleh *Lactobacillus hilgardii* (Ohmomo et al., 1988a).

Kemungkinan *Lactobacillus hilgardii* juga mampu memberikan aktivitas dekolorisasi yang tinggi pada kondisi *strick* anaerobik, masih memerlukan kajian



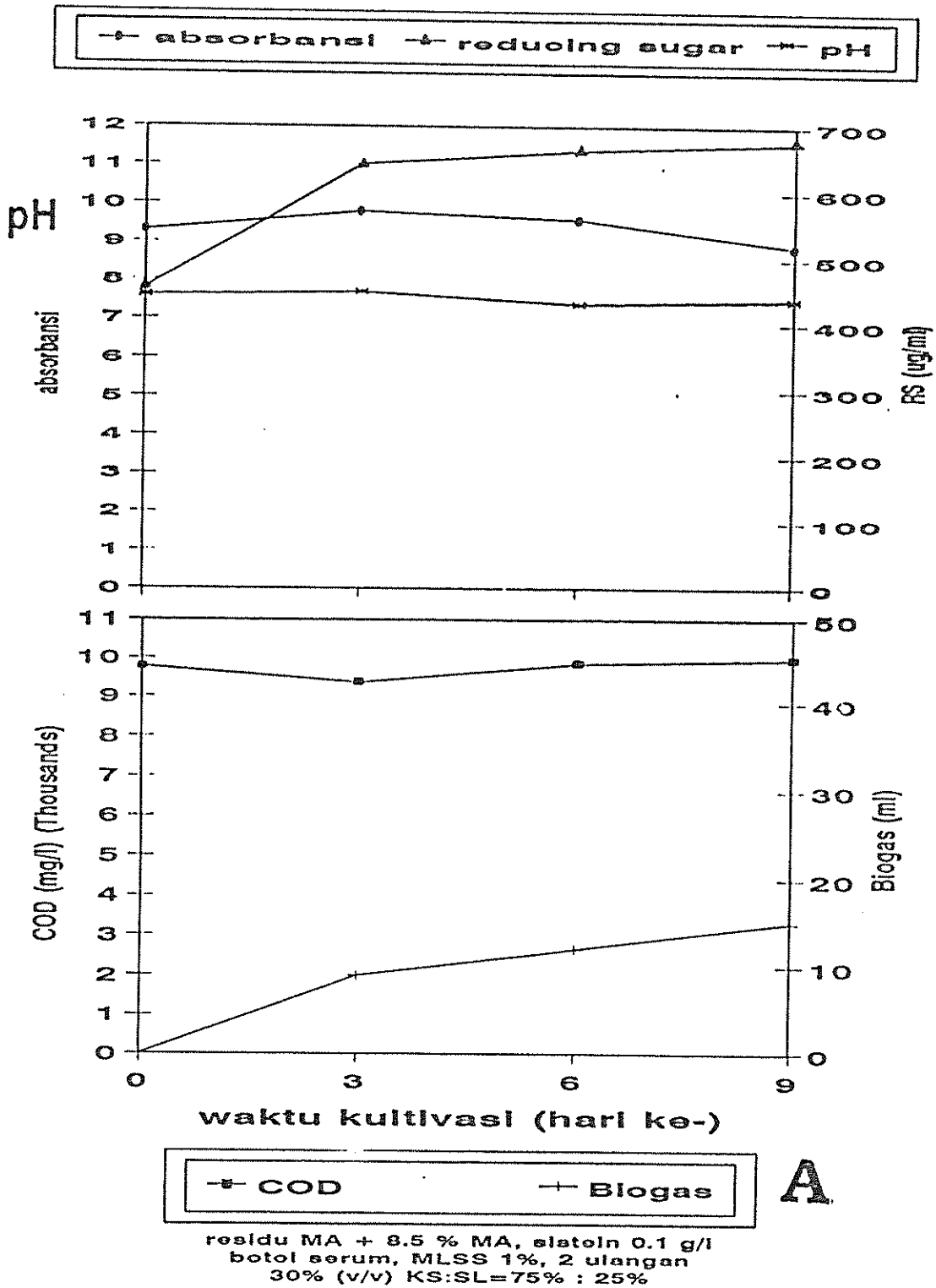
dengan variasi pH ini, hanya kultur dengan pH awal 5.9 (B) yang mampu memberikan 7 persen COD *removal*.

Meskipun pH netral (pH 7) tidak mampu memberikan tingkat dekolorisasi yang tinggi (hanya 4 persen), dilihat dari produksi biogasnya menduduki peringkat tertinggi (21 ml). Salah satu penyebabnya adalah jumlah koloni bakteri pembentuk biogas yang lebih banyak terdapat pada kultur dengan pH netral. Hanya saja pada produksi biogas tersebut tidak diikuti penurunan COD (Gambar 14). Pada inokulasi dengan variasi pH ini, sistem metabolisme sintropik yang diharapkan masih membutuhkan waktu yang lama untuk menghasilkan kualitas penanganan optimal.

Kondisi pertumbuhan lainnya yang juga harus dijaga adalah suhu. Pada penelitian ini, suhu diusahakan konstan, yaitu 37°C, termasuk kondisi mesofilik. Untuk penelitian selanjutnya koloni bakteri diarahkan mempunyai ketahanan terhadap suhu tinggi, melebihi 40°C. Dengan demikian pada tahap pengaplikasiannya nanti diharapkan akan lebih toleran terhadap pengaruh kejutan suhu operasi yang seringkali terjadi.

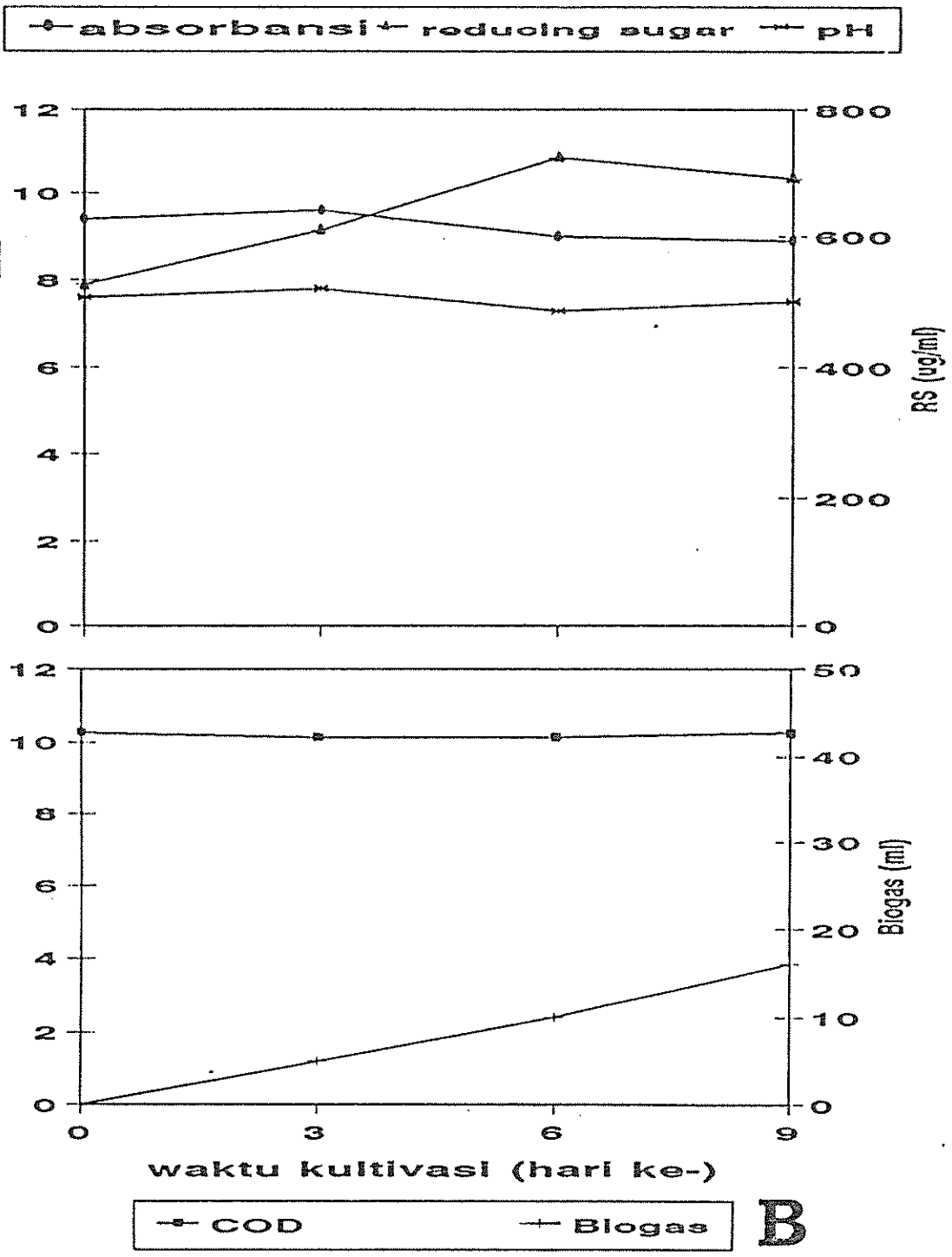
Rekomendasi yang bisa diberikan dari variasi pH ini untuk memperoleh hasil penanganan yang optimal (tingkat dekolorisasi, RS, biogas dan COD *removal*), adalah tetap digunakannya pH netral (pH 7) untuk kajian-kajian selanjutnya.



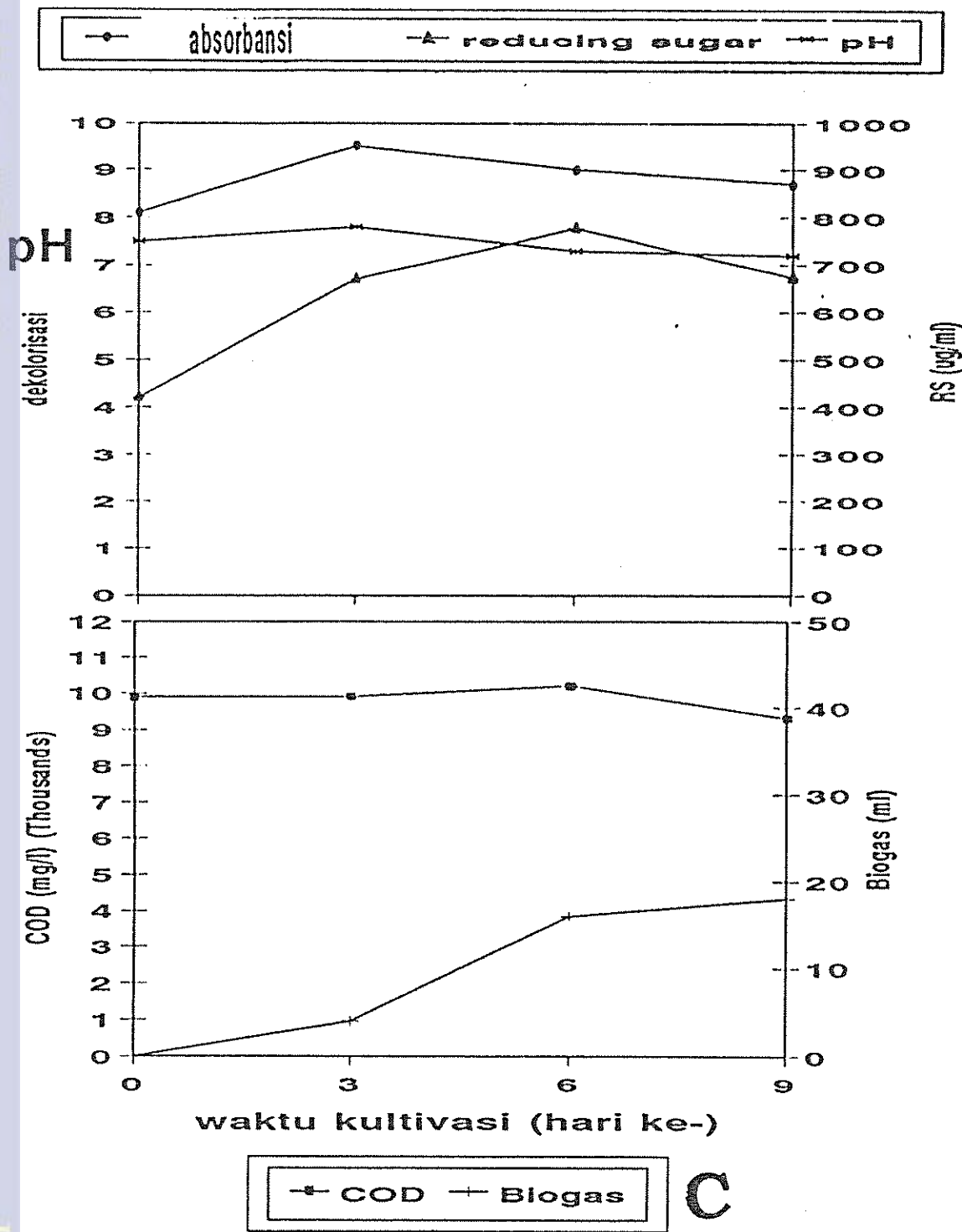


Gambar 16. Pengaruh penambahan 0.1 g/l sistein, pada transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin

Glick cipta milik IPB University

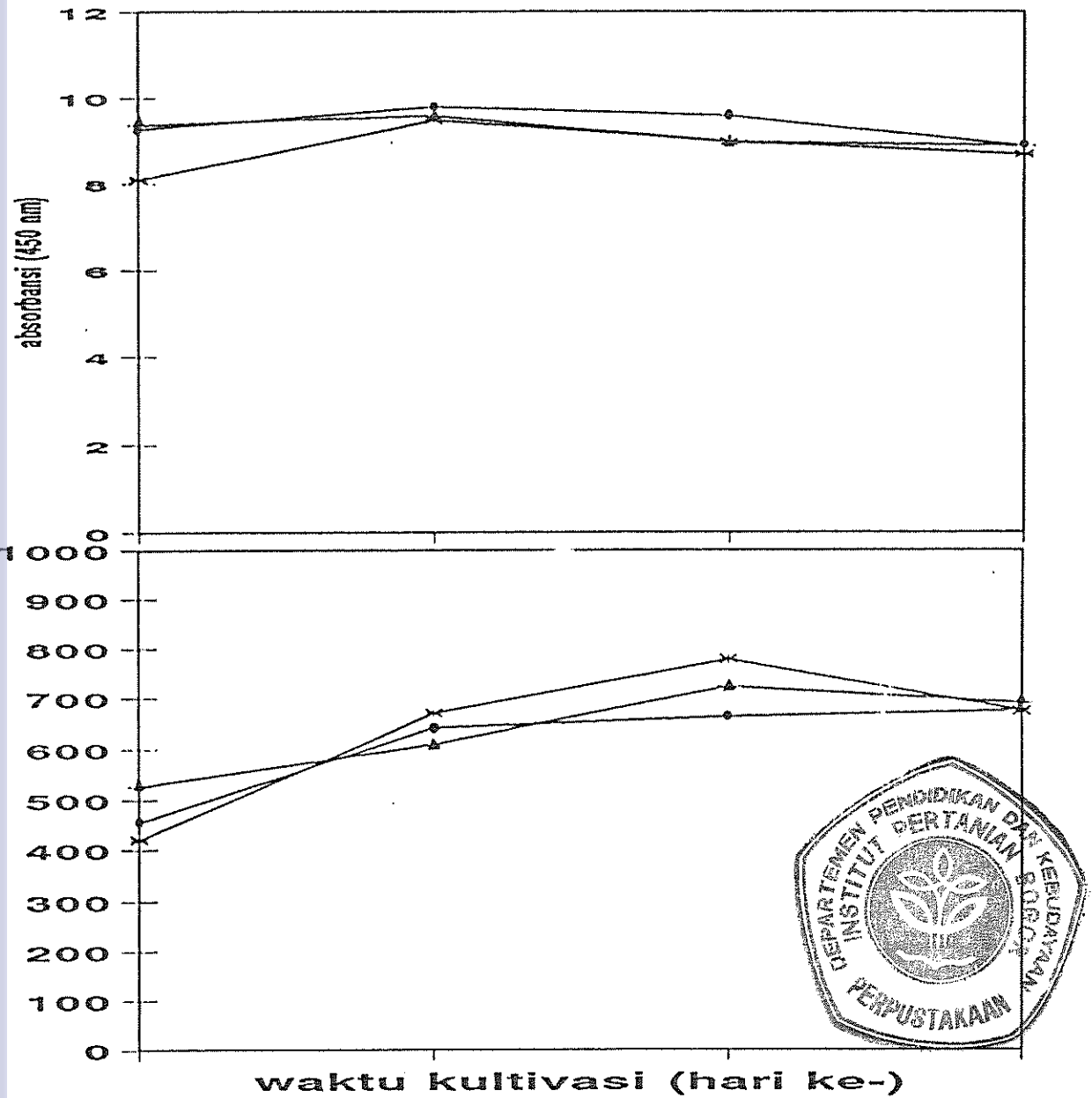


Gambar 17. Pengaruh penambahan 0.2 g/l sistein, pada transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



residu MA + 8.5 % MA, sistein 0.3 g/l  
 botol serum, MLSS 1% , 2 ulangan  
 30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%

Gambar 18. Pengaruh penambahan 0.3 g/l sistein, pada transfer *broth* ke-3, beban limbah residu MA + 8.5% MA dan 1% MLSS terhadap kualitas degradasi melanoidin



←● Kultur A   ←▲ Kultur B   ←\* Kultur C

residu MA + 8.5 % MA3, variasi sistein  
 botol serum, MLSS 1% , 2 ulangan  
 30% (v/v) KS:SL = 75% : 25%

Gambar 19. Perbandingan kualitas dekolorisasi dan reducing sugar pada berbagai taraf penambahan sistein-HCl, transfer broth ke-3, beban limbah residu MA + 6% MA, 1% MLSS dan 1 bulan kultivasi sludge stock

#### 4. Variasi Sistein-HCl (Inokulasi V)

Dari variasi penambahan sistein dengan 3 taraf percobaan dan 2 ulangan ini (0.1, 0.2 dan 0.3 g/l), diharapkan akan diperoleh konsentrasi optimal sistein yang mampu mereduksi superoksida ( $O_2$ ) secara optimal. Dengan langkah ini diharapkan represi superoksida terhadap kultivasi kultur dapat dihindarkan. Karakteristik *seed sludge* pada inokulasi dengan variasi sistein ini sama dengan inokulasi dengan variasi pH, hanya saja beban limbah ditambah sampai 8.5 persen MA (v/v).

Kondisi pertumbuhan dipertahankan pada pH awal 7.5, suhu  $37^{\circ}C$  dalam *water bath shaker* selama 9 hari kultivasi. Hasil penanganan pada taraf penambahan sistein yang berbeda, disajikan pada Gambar 16-19.

Tingkat dekolorisasi yang dicapai pada masing-masing kultur dengan variasi sistein sangat rendah, yaitu 0 persen (0.3 g/l sistein-HCl), 4 persen (0.1 g/l sistein) dan 5 persen (0.2 g/l sistein-HCl). Seperti juga terjadi pada inokulasi dengan variasi pH, waktu kultivasi yang lebih lama dan optimalisasi kondisi pertumbuhan akan meningkatkan tingkat dekolorisasi yang dicapai oleh kultur. Penurunan pH menjadi 7.2 pada akhir kultivasi dari pH awal 7.5, diduga memberikan kontribusi tidak tercapainya dekolorisasi pada kultur dengan penambahan 0.3 g/l sistein-HCl.





Pada Gambar 19 dapat dilihat bahwa kultur dengan 0.3 g/l sistein-HCl memberikan kenaikan RS paling optimal. Pada semua kultur, penurunan RS terjadi menjelang akhir kultivasi (hari ke-9).

Penambahan 0.1 dan 0.2 g/l sistein-HCl tidak menurunkan kisaran pH selama kultivasi. Namun pemberian 0.3 g/l sistein-HCl diduga terlalu berlebih, karena pengaruh asam yang ditimbulkannya mampu menurunkan pH pada akhir kultivasi (Ljungdahl dan Wiegel, 1990). Bila tetap diinginkan penambahan 0.3 g/l sistein-HCl pada kultur, konsentrasi *buffer* dapat ditingkatkan.

Seperti juga pada variasi pH, pemberian beban limbah yang sangat tinggi pada inokulasi dengan variasi sistein (8.5 persen MA) semakin mempersulit adaptasi kondisi pertumbuhan oleh koloni bakteri anaerobik. Kultur dengan penambahan 0.1 dan 0.2 g/l sistein-HCl tidak mampu memberikan penurunan COD. COD *removal* yang tertinggi hanya 6 persen dan dicapai oleh dengan 0.3 g/l sistein-HCl.

Kultur dengan penambahan sistein-HCl 0.3 g/l juga memberikan produksi dan *slope* biogas tertinggi (18 ml, 2.33). Produksi dan *slope* biogas pada kultur lain masing-masing adalah 16 ml dan 1.83 (0.2 g/l sistein-HCl) serta 15 ml dan 1.00 (0.1 g/l sistein-HCl).

Rekomendasi yang bisa diberikan pada variasi sistein ini adalah penambahan 0.3 g/l sistein-HCl



## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Melanoidin sintetis (MS) dibuat dengan cara Migo et al. (1993b). Melanoidin alami (MA) yang merupakan supernatan limbah cair distilasi etanol dari molases dan MS selanjutnya didialisis selama 4 hari.

Hanya variasi 75 persen kotoran sapi dan 25 persen *sludge lagoon* UPT EPG yang mempunyai konsistensi dalam mendekolorisasi melanoidin selama 5 tahap kultivasi. Dengan variasi ini kultivasi selanjutnya dilakukan pada media "miskin hara" tanpa glukosa dan ekstrak khamir.

Sistem semi kontinyu, ketidaktersediaan *strain* bakteri metanogenesis dan substrat glukosa mengakibatkan COD *removal* kultur rendah. COD *removal* tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah residu 1 persen MS (34 persen), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MA (21 persen), kultur dengan pH awal 5.9 (7 persen) dan kultur dengan sistein-HCl 0.3 g/l (6 persen). Semakin berat beban limbah justru semakin meningkatkan COD *removal* kultur.

Perombakan melanoidin menjadi fraksi-fraksi sederhana mendominasi aktivitas bakteri selama masa kultivasi, dilihat dari tingkat dekolorisasi, produksi biogas dan



peningkatan *reducing sugar* (RS)-nya. Penurunan RS terjadi menjelang akhir kultivasi.

Tingkat dekolorisasi tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah campuran 5 persen MS-MA (3 persen), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 4 persen MA (18 persen), kultur dengan pH 5 (8 persen) dan kultur dengan sistein 0.2 g/l (5 persen). Selama kultivasi pH relatif konstan, berkisar 7-8.

Produksi dan slope biogas tertinggi pada masing-masing variasi dicapai oleh kultur 6 persen MLSS dengan beban limbah residu 1 persen MS (231 ml, 6.41), kultur 2 persen MLSS dengan beban limbah residu MS dan 6 persen MA (176 ml, 5.05), kultur dengan pH 7 (21 ml, 2.16) dan kultur dengan sistein 0.3 g/l (18 ml, 2.33).

Hasil analisa  $\text{CH}_4$  dengan menggunakan  $\text{CH}_4$ -analyzer menunjukkan rendahnya kandungan  $\text{CH}_4$  dalam biogas, berkisar 1-2 persen.

Secara keseluruhan kultur dengan beban limbah 4 persen MA, 6 persen MLSS, pH 7, penambahan sistein-HCl 0.3 g/l merupakan formulasi terbaik untuk menghasilkan efluen optimal.



## B. SARAN

1. Kultur penyuburan dan degradasi kuantitatif melanoidin perlu ditingkatkan lagi keoptimalannya dengan memperbanyak proses transfer dan variasi perlakuan. Kemungkinan penambahan *strain* bakteri yang sudah terbukti mampu mendekolorisasi melanoidin (misalnya *Lactobacillus hilgardii*) juga disarankan. Dengan demikian hidrolisa kompleks melanoidin yang merupakan faktor pembatas dapat berjalan lebih sempurna.
2. Laju produksi biogas dengan kandungan metana yang tinggi dapat ditingkatkan dengan penambahan kultur murni *Methanosarcina* atau *Methanothrix* (pengkonversi asam asetat menjadi metana) serta *Methanobacterium* (pengkonversi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> menjadi metana).

## DAFTAR PUSTAKA

- Aoshima I., Y. Tozawa, S. Ohmomo, dan K. Ueda. 1985. Production of Decolorizing Activity for Molasses Pigment by *Coriolus versicolor* Ps4a. *Agric. Biol. Chem.* 49:2041 - 2045.
- Denac, M., A.Miguel dan I.J.Dunn. 1986. Modeling Dynamic Experiments on Anaerobic Degradation of Molasses Wastewater. *Biotech Bioeng* 31:1-10.
- Dissanayake, M.G. 1977. Biogas Production by Anaerobic Digestion. Thesis. AIT, Bangkok.
- Hayase, F. dan H. Kato. 1981. Volatile Component Formed by Thermal Degradation of Nondialyzable Melanoidin Prepared from Sugar Amino Acid Reaction System. *Agric. Biol. Chem.* 45(11):2559-2567.
- Hayase, F., S.B. Kim, dan H. Kato. 1984. Decolorization and Degradation Products of the Melanoidins by Hidrogen Peroksida. *Agric. Biol. Chem.* 48:2711 - 2717.
- Hayase, F., S.B. Kim, dan H. Kato. 1986. Analyses of the Chemical Structures of Melanoidins by  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  CP-MAS NMR Spectrometri. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1951 - 1957.
- Homma, S., T. Tomura dan M. Fujimaki. 1982. Fractination of Nondialyzable Melanoidin into Components by Electro-focusing Electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.* 46(7): 1791-1796.
- Hespell, R.B. 1990. Isolation of Anaerobic Microorganisms. Di dalam Labeda, D.P. Isolation of Biotechnological Microorganisms from Nature. Mc Grew-Hill Publishing Co., New York.
- Kim, S.B., F. Hayase, and H. Kato. 1985. Decolorization and Degradation Products of the Melanoidins on Ozonolysis. *Agric. Biol. Chem.* 49:785 - 792.
- Koesnandar, N. Nishio, K. Kuroda dan S. Napai. 1990. Methanogenesis of Glucose by Defined Thermophilic Cocultur of *Clostridium thermoaceticum* and *Methanosarcina* sp. *J. Ferm. Bioeng.* 70(6):398-403.
- Ljungdahl, L.G. dan J. Wiegel. 1990. Working with Anaerobic Bacteria.

- Migo, V.P., M. Matsumura., E.J.D. Rosario dan H. Katakhoa. 1993a. Decolorization of Molasses Wastewater Using an Inorganic Flocculant. *J. Ferm. Bioeng.* 75(6):438-442.
- Migo, V.P., M. Matsumura., E.J.D. Rosario dan H. Katakhoa. 1993b. The effect of pH and Calcium Ions on The Destabilization of Melanoidin. *J. Ferm. Bioeng.* 76(1):29-32.
- Murata, M., N. Terasawa dan S. Homma. 1991. Screening of Microorganisms to Decolorize a Model Melanoidin and The Chemical Properties of a Microbially Treated Melanoidin. *Biosct. Biotech. Biochem.* 56(8):1182-1187.
- Malina, J.F. Jr. dan F.G. Pohland. 1992. Design of Anaerobic Processes for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes. *Water Quality Management Library, Vol 7.* Technoloc Publishing Co. Inc. Washinton DC, USA.
- Ohmomo S., I. Aoshima, Y. Tozawa, N. Sakurada, dan K. Ueda. 1985a. Purifications and Some Properties of Melanoidin Decolorizing Enzymes, P III and P IV, from Mycelia of *Coriolus versicolor* Ps4a. *Agric. Biol. Chem.* 49:2047-2053.
- Ohmomo S., N. Itoh, Y. Watanabe, Y. Tozawa, dan K. Ueda. 1985b. Continous decolorization of molasses wastewater with mycelia of *Cariolus versicolor* Ps4a. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2551-2555.
- Ohmomo S., I. Aoshima, Y. Tozawa, dan K. Ueda. 1985c. Detection on Lactic Acid and Amino Acids from Melanoidin Decolorized by Enzymes of *Coriolus versicolor* Ps4a. Note. *Agric. Biol. Chem.* 49:2767-2768.
- Ohmomo, S., Y. Kaneko., S. Sirianuntapiboon., P. Samchai., P. Atthasampunna dan I. Nakamura. 1987. Decolorization of Molasses Waste Water by Thermophilic Strain, *Aspergillus fumigatus* G-2-6. *Agric. Biol. Chem.* 51(12):3339-3346.
- Ohmomo S., M. Kainuma, K. Kamimura, S. Sirianuntapiboon, I. Aoshima, dan P. Atthasampunna. 1988a. Adsorption of melanoidin to the mycelia of *Aspergillus oryzae* Y-2-32. *Agric. Biol. Chem.* 52:381-386.
- Ohmomo S., W. Daengsubha, H. Yoshikawa, M. Yui, K. Nozaki, T. Nakajima, dan I. Nakamura. 1988b. Screening of anaerobic bacteria with the ability to decolorize molases melanoidin. *Agric. Biol. Chem.* 52:2429-2435.

- Ohmomo S., H. Yoshikawa, K. Nozaki, T. Nakajima, W. Daengsu-  
bha, dan I. Nakamura. 1988c. Continous decolorization  
of molasses wastewater using immobilized *Lactobacillus*  
*hilgardii* cells. Agric. Biol. Chem. 52:2437-2441.
- Pakaew, C, S. Ohmomo dan H. Katakhoa. 1988. Decolorization of  
Molasses Melanoidin by Bacteria. Annul. Report of I.C.  
Biotech.
- Reynolds, T.M. 1963. Chemistry of Non-enzymic Growning 1.  
The Reaction between Aldoses and Amines. Adv. Food  
Research. 12:1-52.
- Sirianuntapiboon S., P. Samchai, P. Sihanonth, P. Atthasam-  
punna, dan S. Ohmomo. 1988. Microbial decolorization  
of molasses wastewater by *Mycelia sterilia* D 90.  
Agric. Biol. Chem. 52:387-392.
- So, R. 1991. Intl. Symp.Adv. Technol., Japan. Di dalam  
Migo,V.P., M.Matsumura., E.J.D. Rosario dan H.Katakhoa.  
1993a. Decolorization of Molasses Wastewater Using an  
Inorganic Flocculant. J. Ferm. Bioeng. 75(6):438-442.
- Watanabe,Y., R.Sugi, Y.Tanaki dan S.Hayashida. 1981. En-  
zymatic Decolorization of Melanoidin by *Cariolus* sp.  
No.20. Agric.Biol.Chem. 46(6):1623-1630.



Hal Cipta Milik IPB University  
 1. Dilindungi sebagai hak cipta oleh undang-undang dan peraturan pemerintah  
 2. Pengutipan untuk tujuan pendidikan, penelitian, dan informasi harus diakui, diperbolehkan, dan tidak menimbulkan kerugian bagi IPB University  
 3. Pengutipan untuk tujuan komersial, promosi, dan iklan harus diakui, diperbolehkan, dan tidak menimbulkan kerugian bagi IPB University  
 4. Dilindungi sebagai hak cipta oleh undang-undang dan peraturan pemerintah

Lampiran 1. Hasil Analisa Kultur Penyuburan dan Degradasi Kuantitatif Koloni Bakteri Anaerobik Pendegradasi Melanoidin

Tabel 8 Hasil analisa tingkat dekolorisasi (%) kultur selama kultivasi

KULTUR	Deban limbah	HARI KE -										tingkat dekolorisasi (%)
		0	3	6	9	9*	18	18*	27	27*	36	
A-Inokulasi 2	reg+5% MSM	30.1	-	-	26.5	17.5	20.8	12.6	11.7	9.8	10.6	3.0
B-Inokulasi 2	reg sudge	22.9	-	-	19.9	17.4	19.9	12.0	13.3	11.5	11.3	0.0
		0	6	12	12*	18	24	24*	30	36		
A-Inokulasi 3	reg+2% MS	14.5	12.1	13.4	11.2	12.0	11.9	10.4	10.3	9.8	0.0	
B-Inokulasi 3	reg+2% MA	13.7	12.8	14.2	12.5	11.9	11.8	10.2	9.7	9.6	9.5	
C-Inokulasi 3	reg+4% MS	12.6	14.1	14.1	12.4	11.9	11.2	10.4	9.7	9.5	6.4	
D-Inokulasi 3	reg+4% MA	14.8	14.2	13.9	12.9	12.0	12.2	10.8	10.2	10.1	17.9	
E-Inokulasi 3	reg+6% MS	14.3	13.5	13.9	12.2	12.4	12.1	9.7	10.5	10.2	1.35	
F-Inokulasi 3	reg+6% MA	14.6	14.6	15.0	13.1	13.0	13.1	11.2	10.9	10.8	0.0	
		0	3	6	9							
A-Inokulasi 4	reg+6% MA	6.5	6.5	5.7	6.0						8.0	
B-Inokulasi 4	reg+6% MA	7.0	7.4	6.7	6.7						4.0	
C-Inokulasi 4	reg+6% MA	7.2	7.5	7.0	6.9						4.0	
		0	3	6	9							
A-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	9.3	9.8	9.6	8.9						4.0	
B-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	9.4	9.6	9.0	8.9						5.0	
C-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	8.1	9.5	9.0	8.7						0.0	

hasil analisa setelah penyesuaian nutrisi



Tabel 9 Hasil analisa reducing sugar (ug/ml) kultur selama kultivasi

KULTUR	Bahan Limbah	HARI KE -											
		0	3	6	9	9 <sup>o</sup>	18	18 <sup>o</sup>	27	27 <sup>o</sup>	36		
A-Inokulasi 2	YOG+5% MSMA	1625	-	-	1460	783	941	626	796	715	426		
B-Inokulasi 2	YOG +Ludge	1262	-	-	1504	888	1039	548	1038	947	449		
		0	5	12	13 <sup>o</sup>	18	24	24 <sup>o</sup>	30	36			
A-Inokulasi 3	YOG + 2% MS	699	906	920	750	1027	1330	1263	1149	949			
B-Inokulasi 3	YOG + 2% MA	942	1211	904	870	983	1473	1229	1033	927			
C-Inokulasi 3	YOG + 4% MS	911	1325	1002	918	888	1342	1168	1093	915			
D-Inokulasi 3	YOG + 4% MA	994	1119	953	929	944	1428	1162	1164	967			
E-Inokulasi 3	YOG + 6% MS	901	1110	1266	1162	958	1315	1214	1280	959			
F-Inokulasi 3	YOG + 6% MA	1098	1343	936	835	941	1451	1207	1142	1015			
		0	3	6	9								
A-Inokulasi 4	YOG + 6% MA	357	501	659	473								
B-Inokulasi 4	YOG + 6% MA	398	543	627	548								
C-Inokulasi 4	YOG + 6% MA	408	554	602	549								
		0	3	6	9								
A-Inokulasi 5	YOG +8.5% MA	455	642	663	675								
B-Inokulasi 5	YOG +8.5% MA	526	609	723	690								
C-Inokulasi 5	YOG +8.5% MA	420	670	778	674								

hasil analisa betelah penyesuaian nutrisi

Tabel 10 Hasil analisa COD removal (%) kultur selama kultivasi

KULTUR	BEBAN LIMBAH	HARI KE -												COD Removal (%)	
		0	3	6	9	9 <sup>+</sup>	18	18 <sup>+</sup>	27	27 <sup>+</sup>	36				
A-Inokulasi 2	reg+5% NSHA	19440	-	-	19440	17700	15180	12480	13200	13500	11880				22.35
B-Inokulasi 2	reg bludge	19560	18960	18960	18360	14700	13440	14760	13320	13200	11280				34.04
		0	6	12	12*	18	24	24*	30	36					
A-Inokulasi 3	reg+2% MS	10980	11700	12720	12720	10920	12060	11640	10800	9660					8.52
B-Inokulasi 3	reg+2% MA	10920	11760	12480	12480	9720	12120	12120	10800	10020					8.24
C-Inokulasi 3	reg+4% MS	11040	10920	12360	12360	11040	12180	12180	10680	9960					9.78
D-Inokulasi 3	reg+4% MA	11520	11280	12060	12060	11220	12180	12180	10860	10440					9.38
E-Inokulasi 3	reg+6% MS	12180	11580	11940	11940	11520	12360	11880	10320	10320					11.79
F-Inokulasi 3	reg+6% MA	13140	11100	12660	12660	11340	12180	12180	10560	10320					21.00
		0	3	6	9										
A-Inokulasi 4	reg+6% MA	7920	7620	7440	8100										0.00
B-Inokulasi 4	reg+6% MA	8400	8220	7980	7860										7.00
C-Inokulasi 4	reg+6% MA	8640	8640	8640	8640										0.00
		0	3	6	9										
A-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	9780	9360	9840	9960										0.00
B-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	10260	10140	10140	10260										0.00
C-Inokulasi 5	reg+8.5% MA	9900	9900	10200	9300										6.00

Keterangan : \*hasil analisa betelah penyesuaian nutrisi



Tabel II. Hasil analisa nilai pH kultur selama kultivasi

KULTUR	Beban Limbah	HARI KE -											
		0	3	6	9	9 <sup>a</sup>	18	18 <sup>a</sup>	27	27 <sup>a</sup>	36		
A-Inokulasi 2	ROS+5% KMA	7.7	-	-	7.9	7.6	7.1	7.4	7.8	7.3	7.4		
B-Inokulasi 2	ROS sludge	7.7	-	-	7.8	7.7	7.1	7.7	7.8	7.8	7.7		
		0	6	12	12 <sup>a</sup>	18	24	26 <sup>a</sup>	30	36			
A-Inokulasi 3	ROS + 2% MS	7.8	7.3	8.0	7.8	7.2	7.7	7.6	7.3	7.0			
B-Inokulasi 3	ROS + 2% MA	7.9	7.2	7.9	7.7	7.2	7.7	7.6	7.3	7.0			
C-Inokulasi 3	ROS + 4% MS	7.9	7.3	8.0	8.0	7.2	7.5	7.6	7.2	7.1			
D-Inokulasi 3	ROS + 4% MA	8.0	7.1	8.0	7.9	7.2	7.7	7.5	7.3	7.1			
E-Inokulasi 3	ROS + 6% MS	7.9	7.3	8.2	7.9	7.3	7.7	7.8	7.4	7.2			
F-Inokulasi 3	ROS + 6% MA	7.9	7.3	8.0	7.9	7.2	7.5	7.7	7.2	6.9			
		0	3	6	9								
A-Inokulasi 4	ROS + 6% MA	5.0	5.3	4.2	4.5								
B-Inokulasi 4	ROS + 6% MA	5.9	6.2	5.6	6.0								
C-Inokulasi 4	ROS + 6% MA	7.0	7.3	6.8	7.0								
		0	3	6	9								
A-Inokulasi 5	ROS + 0.5% MA	7.6	7.7	7.4	7.5								
B-Inokulasi 5	ROS + 0.5% MA	7.6	7.8	7.3	7.5								
C-Inokulasi 5	ROS + 0.5% MA	7.5	7.8	7.3	7.2								

\*hasil analisa setelah penyesuaian nutrien

Tabel 12. Hasil analisa produksi biogas kultur selama kultivasi

KULTUR	Bahan Lmdbah	HARI KE -																								SLOPE
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66		
A-Inokulasi 2	rog+5% KEMA	0	7	26	42	48	59	66	72	77	78	87	90	90											2.34	
B-Inokulasi 2	rog Alldgo	0	5	46	93	121	129	156	171	184	200	211	224	231											6.41	
A-Inokulasi 3	rog + 2% MS	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36												
B-Inokulasi 3	rog + 2% MA	0	20	62	74	101	113	125	130	142	155	162	174	175											4.30	
C-Inokulasi 3	rog + 4% MS	0	16	32	44	71	85	99	106	115	127	135	147	152											4.14	
D-Inokulasi 3	rog + 4% MA	0	18	37	51	77	91	104	113	124	137	145	157	160											4.32	
E-Inokulasi 3	rog + 6% MS	0	14	32	42	60	76	88	100	106	118	124	133	135											3.72	
F-Inokulasi 3	rog + 6% MA	0	11	35	48	71	93	112	123	135	149	158	172	176											5.05	
A-Inokulasi 4	rog + 6% MA	0	2	4	8																				1.00	
B-Inokulasi 4	rog + 6% MA	0	8	14	19																				1.83	
C-Inokulasi 4	rog + 6% MA	0	8	16	21																				2.16	
A-Inokulasi 5	rog +8.5% MA	0	9	12	15																				1.00	
B-Inokulasi 5	rog +8.5% MA	0	5	10	16																				1.83	
C-Inokulasi 5	rog +8.5% MA	0	4	16	18																				2.33	

## Lampiran 2. Prosedur Analisa Parameter Bioreaktor

### a. Penentuan pH

Sebelum digunakan pH meter dikalibrasi ke dalam pH netral (pH 7) dengan memasukkan elektroda ke dalam penyangga pH 7 hingga monitor digital menunjukkan angka 6.85. Setelah dicuci dengan air bebas ion, elektroda selanjutnya dimasukkan ke dalam penyangga pH 4 selama 3 menit, hingga monitor digital menunjuk angka 4.01. Elektroda yang telah dibilas dengan air bebas ion dimasukkan ke dalam sampel yang diukur. Nilai pH sampel dapat dilihat pada monitor digital setelah konstan.

### a. Penentuan tingkat dekolorisasi (%)

Sampel yang telah diukur nilai pH-nya ditimbang dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14300 rpm, 4°C, gravitasi 20 000 selama 15 menit. Sebanyak 0.5 ml supernatan diambil dan kemudian diencerkan 10 kali dengan air bebas ion. Sampel sebanyak 4 ml diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV 160A*.

Kurva standar melanoidin sintetis dibuat dari konsentrasi rendah sampai konsentrasi tinggi. Aktivitas dekolorisasi adalah total perbedaan absorbansi sampel akhir kultivasi dengan awal kultivasi pada setiap tahap kultivasi dibagi absorbansi awal kultivasi, dan dinyatakan dalam persen.

c. Penentuan *reducing sugar* (RS) dengan metoda Somogy-Nelson

Sampel yang telah diukur nilai pH-nya ditimbang dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14300 rpm, 4°C, gravitasi 20 000 selama 15 menit. Supernatan yang telah dipisahkan diambil 0.5 ml dan kemudian diencerkan 10 kali dengan air bebas ion. Sebanyak 0.5 ml reagen Somogy ditambahkan pada 0.5 ml sampel yang telah diencerkan dan dididihkan pada suhu 100°C selama 15 menit. Larutan sampel selanjutnya didinginkan selama 3 menit dalam air mengalir, sehingga suhunya mencapai 25°C.

Penambahan berikutnya ke dalam larutan sampel adalah 0.5 ml reagen Nelson dan kemudian dimasukkan vortex agar  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut. Sebanyak 11 ml air bebas ion ditambahkan pada larutan sampel dan kembali dimasukkan vortex untuk menjamin kehomogenannya. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang glukosa standar dengan menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV 160A. Untuk blanko, perlakuannya sama hanya sampel diganti dengan air bebas ion. Hasil absorbansi yang didapatkan menggunakan kurva standar glukosa merupakan *reducing sugar* sampel.

Kurva standar dibuat dengan menyiapkan glukosa standar mulai dari konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80 dan 100  $\mu\text{g/ml}$  dan secara otomatis Shimadzu UV 160A akan mampu membuat kurva standarnya.

### Lampiran 3. Pembuatan Reagen-Reagen Analisa

#### a. Reagen Somogy (1952)

- i. Sebanyak 14 g Na-karbonat anhidrous dan 12 g Na-kalium tartarat (garam Rochelle) dimasukkan dalam erlenmeyer yang berisi H<sub>2</sub>O 200 ml.
- ii. Sebanyak 4 g Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan 40 ml H<sub>2</sub>O diaduk merata dan dicampurkan pada larutan (i).
- iii. Air suling sebanyak 600 ml dididihkan pada erlenmeyer, kemudian ditambahkan 180 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat.
- iv. Setelah 10 menit ditambahkan 16 g NaHCO<sub>3</sub>, diaduk sampai rata dan dimasukkan dalam labu 1000 ml.
- v. Larutan dalam labu didiamkan pada ruang gelap selama 2 hari, dan setelah itu ditambahkan air suling hingga tera dan dikocok sampai rata.
- vi. Untuk menghilangkan *impuritas* larutan disaring dengan kertas saring. Reagen Somogy disimpan dalam botol gelap dan dapat digunakan selama 4 minggu.

#### b. Pereaksi Nelson (1944)

- i. Sebanyak 25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O dilarutkan dalam 900 ml air suling.
- ii. Sebanyak 2 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat diencerkan dengan 40 ml air suling.
- iii. Larutan (ii) ditambahkan ke larutan (i), kemudian ditambahkan 3 g Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O sedikit demi sedikit.

- iv. Larutan (iii) dimasukkan ke dalam labu ukur dan didiamkan selama 2 hari dalam ruang gelap.
- v. Setelah 2 hari ditambahkan air suling sampai tanda tera pada labu tercapai dan dikocok sampai merata.
- vi. Untuk menghilangkan *impuritas* larutan disaring dengan kertas saring. Reagen Nelson disimpan dalam botol gelap dan dapat digunakan selama 4 minggu.

**c. N/40 Sodium Oksalat**

- i. Sodium oksalat dikeringkan dalam oven pada suhu 150-200°C selama 1 jam.
- ii. Setelah didinginkan di desikator, sebanyak 1.6575 g sodium oksalat diambil dengan teliti.

**d. N/40 Potasium Permanganat**

- i. Sebanyak 0.8 g  $\text{KMnO}_4$  diambil dan dilarutkan dalam 1100 ml air bebas ion serta dipanaskan selama 1 jam.
- ii. Setelah dingin larutan disaring dengan gelas saring (3 G 4) dan dimasukkan ke dalam botol reagen berwarna coklat yang telah dicuci uap. Reagen disimpan pada tempat yang kedap sinar matahari.

**e. Penentuan Faktor (f) dari N/40  $\text{KMnO}_4$**

- i. Sebanyak 100 ml air bebas ion dimasukkan dalam erlenmeyer 300 ml.





- ii. Sebanyak 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  33 persen dan 10 ml N/40 sodium oksalat ditambahkan pada (i)
- iii. Larutan selanjutnya dipanaskan dan dititrasi pada suhu  $60-80^\circ\text{C}$  dengan larutan N/40  $\text{KMnO}_4$  hingga terbentuk warna merah jambu.
- iv. Untuk blanko, sebanyak 100 ml air bebas ion ditambah 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan dititrasi dengan N/40  $\text{KMnO}_4$  hingga terbentuk warna merah jambu.

$$f = 10/x, \text{ dimana } x = b-a$$

a = jumlah larutan N/40  $\text{KMnO}_4$  titran (ml)

b = jumlah larutan N/40  $\text{KMnO}_4$  blanko (ml)



#### Lampiran 4. Daftar Istilah Asing/ Belum Dibakukan

1. **Activated sludge** : *Sludge* yang telah diaktifkan dengan menambahkan mikroorganisme spesifik, nutrisi dan aerasi, sehingga kontak *sludge* tersebut dengan limbah organik akan merombak bahan-bahan organik yang terdapat di dalamnya.
2. **BOD (Biochemical Oxygen Demand)** : Kebutuhan oksigen yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk merombak bahan organik pada limbah. BOD yang seringkali diukur setelah sampel limbah berumur 5 hari ( $BOD_5$ ) mampu mengukur karbon organik dan nitrogen yang terdegradasi secara biologis.
3. **COD (Chemical Oxygen Demand)** : Kebutuhan oksigen kimiawi yang diperlukan untuk mendegradasi bahan organik limbah, termasuk yang tidak dapat dirombak secara biologis. Karbon organik total, oksidasi-reduksi sulfat, sulfida dan Fe diperhitungkan sebagai COD.
4. **Error** : Kisaran perbedaan data yang masih dianggap sama (masih ditoleransi).
5. **Lagoon/ Lagoon Anaerobik** : Suatu unit penanganan limbah cair yang berupa kolam dengan kedalaman tertentu, diberi muatan limbah sedemikian rupa sehingga aerasi permukaan dan aktifitas fotosintesis tidak dapat mempertahankan kondisi aerobik.
6. **Melanoidin/ Komplek Melanoidin** : Suatu senyawa kompleks yang terdapat dalam molases atau produk samping dari industri pangan seperti kecap, bir, dan khamir roti. Melanoidin terbentuk dari reaksi non-enzimatik Maillard antara gugus gula dan amina. Pembentukan melanoidin diawali dengan dehidrasi kompleks gula-amina menghasilkan aldehyd-aldehyd aktif yang selanjutnya terpolimerisasi melalui reaksi Amadori.

7. **MA = Melanoidin Alami** : Supernatan limbah cair industri pengguna molases, karena belum ada metoda untuk mengisolasi melanoidin alami murni pada limbah, mengingat kompleksnya mekanisme koagulasi melanoidin alami.
8. **MS = Melanoidin Sintetis** : Melanoidin yang dibuat dengan cara Migo *et al.*(1993b), yaitu melarutkan 1 M glukosa, 1 M glisin dan 0.5 M natrium bikarbonat dalam 1 liter air bebas ion. Untuk mendapatkan melanoidin sintetis, larutan tadi diotoklaf selama 3 jam, sedangkan untuk mendapatkan *nondyalizable melanoidin* larutan didialisis dalam *tube* selulosa (BM 10 K Dalton) selama 4 hari.
9. **MLSS (*Mixed Liquor Suspended Solid*)** : Konsentrasi fraksi padat yang merupakan padatan tersuspensi total (gram) yang terdapat dalam suatu cairan (ml). MLSS dinyatakan dalam persentase, dan seringkali digunakan sebagai ukuran kuantitas *seed sludge* yang akan diinokulasikan dalam cairan fermentasi.
10. ***Nondyalizable Melanoidin*** : Larutan melanoidin yang telah didialisis untuk membebaskan senyawa-senyawa sederhana (kurang dari 10 K Dalton).
11. **RS = *Reducing Sugar*** : Merupakan ukuran kuantitatif dari kandungan gula-gula pereduksi, seperti glukosa, selobiosa, dan laktosa dalam cairan fermentasi. Pemakaian istilah RS lebih ditekankan pada gula-gula pereduksi hasil perombakan kompleks melanodin.
12. ***Removal*** : Penurunan nilai/ hasil perombakan yang dinyatakan dalam persen. Sebagai contoh COD dan BOD removal berarti nilai COD dan BOD yang telah berhasil diturunkan dari nilai awalnya (%).

13. **Sludge** : Suatu fraksi padat dalam cairan yang bentuk visualnya seperti lumpur dan mengandung banyak sekali bentuk-bentuk kehidupan seperti bakteri, alga dan protozoa. *Sludge* yang banyak sekali mengandung koloni bakteri tersebut seringkali digunakan untuk merombak bahan organik limbah.
14. **Seed Sludge/ Seed Sludge Kultur** : *Sludge* yang dipakai sebagai kultur mikroorganisme yang akan diumpukan (bibit) dalam bioreaktor atau sebagai inokulum pada limbah yang akan ditangani.
15. **Seed Sludge Stock** : *Seed sludge* yang disimpan dalam bioreaktor penyimpanan dan dapat digunakan sewaktu-waktu setelah diaktifkan (dengan pemberian kondisi pertumbuhan yang sesuai).
16. **Slope** : Nilai tangen  $\alpha$  yang menunjukkan kemiringan/ linieritas kurva dan dapat diperoleh dari hasil regresi dua tipe data (sumbu vertikal dan horison-tal). Semakin tegak garis tangen  $\alpha$  semakin besar nilai *slope*-nya.
17. **Strain** : Sebutan untuk spesies tunggal, misalnya *strain* bakteri yang berarti satu jenis spesies bakteri (bukan koloni/ campuran).
18. **Strick Anaerobik** : Kondisi anaerobik yang benar-benar terbebas dari oksigen, dengan rendahnya potensial redoks kultur (dapat mencapai  $-330$  mV).

