



## SCREENING DAN ISOLASI MIKROBA PENGURAI H<sub>2</sub>S UNTUK PURIFIKASI BIOGAS DARI POME PADA PLT BIOGAS

Screening and Isolation of H<sub>2</sub>S Reducing Microba for Biogas Purification from POME On Biogas Power Plant

**Agustina Dyah Setyowati<sup>1)</sup>, Joni Prasetyo<sup>1,2)</sup>, Herlina Siregar<sup>1)</sup>, Maswa Lutfi<sup>1)</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Pamulang,

<sup>2</sup>Balai Bioteknologi BPPT, Gedung 630 Puspiptek Serpong Tangerang Selatan

Jl. Witana Harja No. 18b, Tangerang Selatan, 15417

\*Email : [agustin.2187@gmail.com](mailto:agustin.2187@gmail.com)

*Received : 3 Juli 2020; Accepted : 24 Juli 2020; Publish : Juli 2020*

### ABSTRACT

Biogas is a renewable alternative energy that can be produced from POME (Palm Oil Liquid Waste). The compound content in biogas generally consists of methane (CH<sub>4</sub>), Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) and a small amount of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S). As for nitrogen (N<sub>2</sub>) and oxygen (O<sub>2</sub>) usually from the remaining composition of the air analyzed in the sample. The H<sub>2</sub>S content in biogas is generally more than 1200 ppm which is corrosive so that it often becomes a problem in the surrounding environment because it can damage equipment. One way to minimize H<sub>2</sub>S compounds is by microbiological processes using microorganisms such as Thiobacillus. Thiobacillus is a chemotrophic bacteria capable of breaking down toxic chemical compounds into non-toxic chemical compounds. Therefore, this research will study the screening process and isolation of indigenous microbes which are able to bind H<sub>2</sub>S and can be used for biogas purification. This research was conducted in several stages, namely, the process of screening microbes in H<sub>2</sub>S gas, isolation of potential microbial media containing sulfur NaHS, analyzing data using sulphur analyzer. The results obtained from the stages carried out are the longer the sulfur content will be more and more, on the 20<sup>th</sup> day, the sulfur content will increase to 6.201 ppm with a pH of 5. The isolation and screening process for Indonesian microbes (indigeneous) uses conventional isolation methods, namely isolation using the process in stages with isolation stages: the first stage is taking samples from nature, the second stage is diluting the sample in sterile water, the third stage is storing the media for culture, the fourth stage is mixing agar in the petri dish sample, the fifth stage is incubation and the last is the stage of checking the results of the incubation. As for the separation of microbes using the agar etching method.

**Keywords:** Biogas, Thiobacillus, Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S), Isolation, Sodium Hydrosulfide (NaHS), Screening.



## PENDAHULUAN

Pabrik kelapa sawit menghasilkan limbah biomassa dengan jumlah yang cukup besar dalam bentuk limbah organik berupa limbah cair (*Palm Oil Mill Effluent/POME*). Pengolahan POME menjadi biogas tentu dapat mencegah terjadinya pencemaran lingkungan dan dijadikan sebagai energi terbarukan yang dapat memenuhi kebutuhan energi di dunia maupun di Indonesia yang semakin meningkat.

Biogas merupakan gas yang dihasilkan dari bahan-bahan organik misalnya seperti POME dengan proses fermentasi di dalam biodigester. Biogas terdiri dari 54-70% metana ( $\text{CH}_4$ ), 27-35% karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ), nitrogen ( $\text{N}_2$ ), hidrogen ( $\text{H}_2$ ), 0,1% karbon monoksida ( $\text{CO}$ ), 0,1% oksigen ( $\text{O}_2$ ) dan hidrogen sulfida ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Wahyono, 201).

Hidrogen sulfida ( $\text{H}_2\text{S}$ ) merupakan salah satu senyawa yang mempunyai bau seperti telur busuk dan terkadang lebih toksik daripada karbon monoksida. Hidrogen sulfida dapat dideteksi pada konsentrasi yang sangat rendah (0,002 mg/L) dan memiliki sifat beracun serta mempunyai sifat yang korosif dan mudah terbakar (Merck, 1980). Kandungan hidrogen sulfida ( $\text{H}_2\text{S}$ ) dalam biogas yaitu 10–40ppm menjadi masalah dalam penggunaannya karena dapat merusak peralatan dan mencemari lingkungan (Mary Elisabeth, 2010). Biogas perlu dimurnikan dari kandungan  $\text{H}_2\text{S}$  sebelum digunakan sebagai bahan bakar. Banyak cara untuk menghilangkan kandungan  $\text{H}_2\text{S}$  dalam biogas (Peyruze, 2009) seperti dengan menggunakan mikroorganisme contohnya *Thiobacillus*. *Thiobacillus* adalah bakteri *chemototroph* yang mampu menguraikan senyawa kimia beracun menjadi senyawa kimia yang tidak beracun. Ada beberapa macam spesies bakteri diantaranya *T. denitrificans*, *T. thiooxidans*, *T. novellus*, dan *T. ferrooxidans*. Salah satu bakteri (mikroba) yang digunakan pada penelitian ini adalah

*T. denitrificans*. *T. denitrificans* berfungsi menetralkan racun  $\text{H}_2\text{S}$  dan nitrit melalui reaksi denitrifikasi (Waluyo, 2005).

*T. denitrificans* adalah bakteri yang tersebar luas, ditemukan di habitat tanah dan air, meliputi : lumpur payau, tanah, air tawar dan sedimen laut, limbah domestik dan laguna limbah, tangki pencernaan, dan bahkan tambang yang ditinggalkan dengan suhu ideal dan pH untuk pertumbuhan adalah  $28^\circ\text{C}$  -  $32^\circ\text{C}$  dan 6,8 - 7,4. Meskipun *T. denitrificans* adalah organisme anaerobik, ia dapat hidup dalam kondisi aerobik.

Untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial dapat dilakukan proses *screening* dengan tahapan isolasi dan seleksi. Isolasi adalah kegiatan pemisahan suatu kultur mikroorganisme sari campuran pembiakan beberapa jenis mikroorganisme yang terdapat di alam. Seleksi dilakukan dengan manipulasi kondisi lingkungan (pH, suhu, aerob, anaerob, dsb) dan komposisi media tumbuh sehingga diperoleh suatu jenis mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan reaksi atau produk yang diinginkan.

Tahap isolasi yaitu pengambilan sampel dari alam, kemudian pengenceran sampel dalam air steril dan disimpan media agar pembiakan. Kemudian pencampuran agar pada sampel cawan petri lalu dilakukan inkubasi dan pemeriksaan hasil inkubasi.

Media adalah suatu substrat dimana mikroorganisme dapat tumbuh yang disesuaikan dengan lingkungan hidupnya. Media kultur dibedakan atas tiga macam yaitu, media cair (*liquid medium*), media semi padat (*semi solid medium*), dan media padat (*solid medium*). Contoh dari media cair yaitu NB (*Nutrient Broth*), *Lactose Broth* (LB) dan kaldu sapi. Contoh dari media semi padat yaitu agar dengan konsentrasi rendah 0,5%, dan SIM (*Sulfida Ino Motil*) dan satu syarat media yang baik ialah media harus mempunyai tekanan osmotik, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui proses *screening* dan isolasi mikroba asli Indonesia (*indigenous*) yang mampu mengikat  $\text{H}_2\text{S}$  dan dapat digunakan untuk pemurnian biogas.



## METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan adalah *hot plate*, stirer, pipet tetes, *petri dish*, gelas ukur, erlenmeyer, *autoclave*, neraca analitik, ose, spatula, pH indikator, *eppendorf*, *aluminium foil*, *wrapping paper*, dan *sulfur analyzer*.

Bahan yang digunakan untuk pertumbuhan mikrobiologi adalah bromophenol blue, potato dextrose agar,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , nutrient agar sedangkan bahan pendukung yaitu aquades dan etanol 70% serta bakteri dari tanah, limbah batu bara atau kotoran sapi.

### Membuat Media Untuk Pertumbuhan

Bahan-bahan yaitu 8gr potato dextrose agar, 0.6gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2gr  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0.2gr  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 ml. Kemudian dibuat menjadi 2 sampel kedalam erlenmeyer dan ditambahkan Bromo Phenol Blue (BPB) sebanyak 10 tetes. Setelah itu sampel akan di homogenkan menggunakan stirer tanpa pemanasan. Setelah itu dimasukkan kedalam autoclave dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit (Dwidjoseputro,1990). Kemudian ditambahkan mikroba dari sampel limbah batu bara. Setelah itu masing-masing sampel akan diamati dengan melakukan pengecekan pH.

### Membuat Media Seleksi Untuk Mikroba

Bahan-bahan yaitu 0,05 gr  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,3 gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , dan 0,15 gr  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan sebanyak 50 ml aquades, kemudian dibagi menjadi 2 erlenmeyer. Tutup erlenmeyer dengan aluminium foil. Kemudian dimasukkan kedalam mesin autoclave dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Setelah di autoclave kemudian didinginkan kemudian masukkan mikroba. Mengamati media seleksi dengan dilakukan pengecekan pH menggunakan indikator pH.

### Modifikasi Thiosulfat

Menimbang bahan-bahan yaitu 0,35gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25gr  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,25gr NaHS (dibuat menjadi 3x) dan 0,5gr NaHS. dilarutkan dengan aquadest sebanyak :

- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sebanyak 200 ml
- NaHS 0,25 gr (10 ml) dibuat menjadi 3x

c. NaHS 0,5 gr (10 ml)

Kemudian homogenkan dengan menggunakan *hot plate stirer* tanpa pemanasan. Masukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 4 buah dan masing-masing erlenmeyer dituangkan sampel sebanyak 50 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Setelah itu Kemudian NaHS yang telah dilarutkan akan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan konsentrasi yang berbeda. Selanjutnya semua sampel disterilkan dengan menggunakan autoclave dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit (Dwidjoseputro,1990). Setelah selesai autoclave maka sampel yang berisi  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  yang telah dibagi akan di masukkan NaHS dengan konsentrasi yang berbeda yaitu :

- Erlenmeyer 1 mengandung :  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaHS}$  0,25 gr sebagai control.
- Erlenmeyer 2 mengandung :  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaHS}$  0,25 gr diberi nama P.Kuning.
- Erlenmeyer 3 mengandung :  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaHS}$  0,25 gr diberi nama sampel 0,25 gr.
- Erlenmeyer 4 mengandung :  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaHS}$  0,5 gr diberi nama sampel 0,5 gr.

Kemudian sampel pada erlenmeyer ke-2 akan ditambahkan mikroba yang pada erlenmeyer. Setelah itu akan diamati perkembangannya dengan di cek pH menggunakan indikator pH. Setelah seminggu maka sampel pada 0,25 gr NaHS, 0,5 gr NaHS akan diambil untuk diinkubasi dengan ditetesi kedalam *eppendorf* dijadikan sebagai hari pertama tanpa sebelum dimasukkan mikroba menjadi hari ke-0 sebelum inokulasi. Masing-masing sampel diambil satu kali diberi nomer 1 dan 2. Kemudian masukkan mikroba dari P.kuning kedalam masing-masing sampel yaitu 0,25 gr NaHS, 0,5 gr NaHS dicatat sebagai hari ke-0 setelah inokulasi dan diambil sampel ditetesi pada *eppendorf* dengan diberi nama 3 dan 4 pengambilan sampel dilakukan masing-masing sekali. Sampel dimasukkan kedalam plastik diikat dengan rapat dan disimpan kedalam kulkas. Selanjutnya sampel akan diamati selama 20 hari dan pengambilan sampel 2 hari sekali seperti yang telah dilakukan sebelumnya. Setelah 20 hari kemudian maka sampel akan diuji kandungan sulfurnya.

### Pengambilan Sampel Inkubasi

Menyiapkan pipet tetes, tisu dan *eppendorf*. Kemudian sampel akan diambil dari botol dengan konsentrasi 0.25gr dan 0.5 gr dengan pipet tetes yang



berbeda. Semprotkan etanol pada tangan untuk sterilisasi sebelum mengambil sampel. Buka penutup tabung PCR atau *epENDORF* kemudian masukkan tisu yang telah dipotong menjadi kecil yang berfungsi sebagai kertas saring. Tisu akan diletakkan pada permukaan *epENDORF*. Setelah itu ambil sampel menggunakan pipet tetes secara perlahan dan teteskan ke *epENDORF* yang telah diberikan tisu di permukaannya. Di isi hingga batas maksimal pada bagian *epENDORF* kemudian tutup *epENDORF* dan diberi label nama sesuai sampel keberapa yang diambil. Lakukan hal yang sama pada sampel berikutnya yang akan diambil. Setelah selesai maka sampel tersebut disimpan kedalam plastik dan masukkan kedalam kulkas.

**Proses Screening Mikroba Pada Gas H<sub>2</sub>S**

Pada tahap ini pengambilan sampel yang dilakukan menggunakan sampel batu bara yang dimasukkan kedalam media tumbuh untuk mengetahui apakah terdapat mikroba pada sampel limbah batu bara yang diambil kemudian diamati beberapa hari dengan dilakukan pengecekan pH menggunakan pH indikator. Mikroba yang telah tumbuh akan dimasukkan kedalam media seleksi yang telah dibuat untuk diamati selama beberapa minggu dan dilakukan pengecekan pH setiap 2 hari sekali.

Mikroba tersebut selanjutnya dikembangbiakkan pada media cair yang menggunakan Natrium Hidrosulfida (NaHS). Pada media cair dilihat dengan perubahan warna yang terjadi dan diukur pH setiap 2 hari sekali. Selanjutnya mikroba akan diinkubasi. Inkubasi dilakukan selama 20 hari dengan pengambilan sampel 2 hari sekali. Hasil dari pengambilan sampel ini akan diuji menggunakan alat *sulfur analyzer* untuk diketahui berapa banyak kandungan sulfur yang diikat oleh bakteri tersebut.

**Analisa Data Menggunakan Sulfur Analyzer**

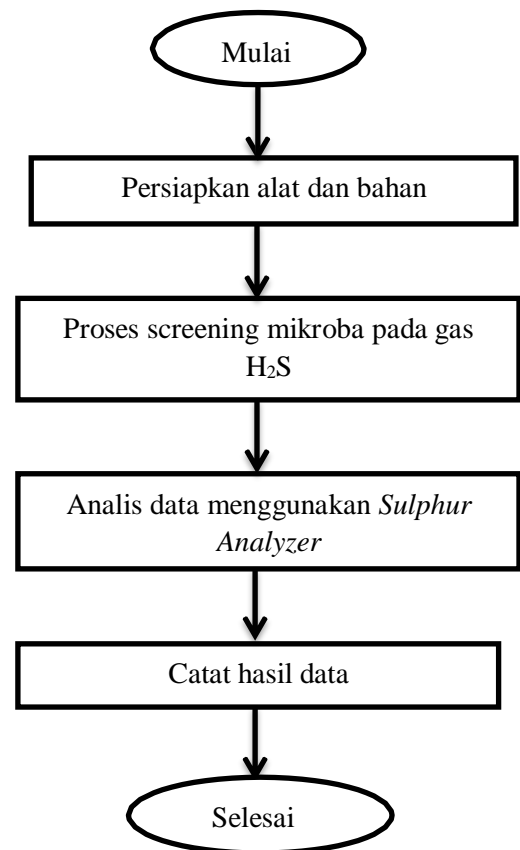
Analisa utama yang dilakukan pada riset ini terutama berkaitan dengan efektifitas penurunan H<sub>2</sub>S melalui *Gas Chromatography* atau *gas analyzer* yang portable. Gas lain yang perlu

diketahui adalah:

1. CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> yang diperkirakan akan mempengaruhi proses pemanfaatan biogas pada genset.
2. Analisa COD, TOC, BOD, kandungan minyak akan dilakukan untuk mengetahui besarnya konversi dari bahan baku (POME) menjadi biogas.
3. pH meter, temperature, DO di monitor dalam proses fermentasi ini. Parameter-parameter tersebut untuk mengetahui kondisi operasi yang optimum.

Prinsip Kerja *Sulfur Analyzer* adalah sampel didalam *crucible* dibakar dalam *combustion furnace* dan dibantu oleh oksigen untuk memudahkan pembakaran. Sampel yang dipanaskan sampai suhu ±1350°C akan melepaskan bermacam-macam gas diantaranya adalah sulfur. Gas sulfur hasil pembakaran tersebut akan berikatan dengan oksigen membentuk gas SO<sub>2</sub>. Kemudian gas tersebut akan dialirkan melalui *Anhydron Reagent* untuk menghilangkan uap air dan kemudian ke *IP Cell Detector*. Sulfur diukur sebagai SO<sub>2</sub>.

Bahan pendukung yaitu standar, oksigem UHP (g), dan dan *Compress Air* sedangkan alat pendukung yaitu neraca analitik, spatula dan krusibel.





**Gambar 3.5 Diagram Alir**

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Proses *Screening* Mikroba Pada Gas H<sub>2</sub>S**

Pada proses *screening* yang telah dilakukan didapatkan hasil pada tahap isolasi mikroba yaitu :

1. Pada media agar pertumbuhan mikroba terlihat bahwa mikroba dapat tumbuh seperti pada di gambar 4.1 pada media tumbuh pasir A memiliki pH=2 sedangkan untuk media tumbuh pasir B pH = 3 namun pada media tumbuh pasir

B mikroba tidak mengalami pertumbuhan seperti yang terjadi pada media tumbuh pasir A.



**Gambar 4.1 Sampel Media Tumbuh yang Telah Dimasukkan Mikroba**

2. Kemudian mikroba yang dimasukkan kedalam media seleksi akan diamati selama beberapa minggu dan didapatkan hasil bahwa mikroba berkembang dengan pengecekan pH yang rutin dan perubahan warna yang terjadi pada media seleksi.



**Gambar 4.2 Media Seleksi Yang Telah Mengalami Pertumbuhan Mikroba**

3. Pada gambar 4.3 memperlihatkan hasil dari perkembangbiakkan dari media cair terlihat adanya endapan warna kekuningan yang menunjukkan elemental sulfur (Dunger and Fielder,1989). Dan hasil dari pengecekan pH awal yaitu 6 menjadi pH akhir setelah diinkubasi menjadi 5.



**Gambar 4.3 Sampel Media Cair Dengan Mikroba yang Telah Berkembangbiak**

4. Mikroba yang berada dalam media cair akan dipindahkan kedalam tabung PCR atau *ependorf* untuk disimpan dalam kulkas selama 20 hari sebelum melakukan uji kandungan sulfur.

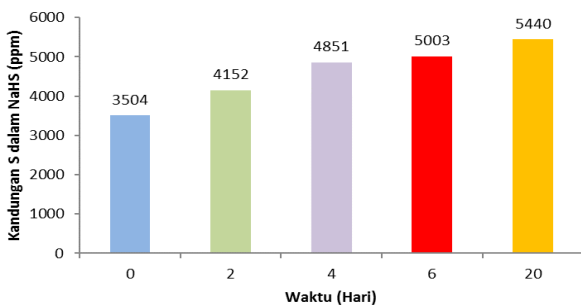




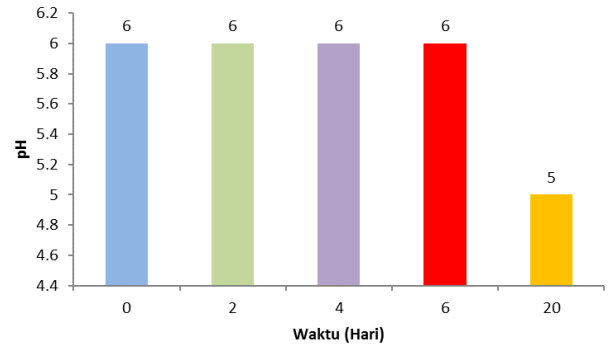
**Gambar 4.5 Hasil Media Cair yang Dimasukkan ke Dalam Eppendorf**

**Analisa Kandungan Sulfur dengan Sulfur Analyzer**  
**Estimasi nilai kandungan S**

1. Kandungan 0,25 gr NaHS dalam 50 ml  
 $Ar\ S = 32, H = 1, Na = 23.$   
 Maka Mr dari NaHS = 56  
 $NaHS\ 0,25\ gr = 0,00025\ mg/50\ ml$   
 $= 0,005000\ mg/liter$   
 $= 5.000\ ppm$   
 $Kandungan\ S = (32/56) \times 5.000\ ppm = 2.857\ pm$
2. Kandungan 0,5 gr NaHS dalam 50 ml  
 $NaHS\ 0,5\ gr = 0,0005\ mg/50\ ml$   
 $= 0,0010000\ mg/liter$   
 $= 10.000\ ppm$   
 $Kandungan\ S = (32/56) \times 10.000\ ppm = 5.714\ ppm$

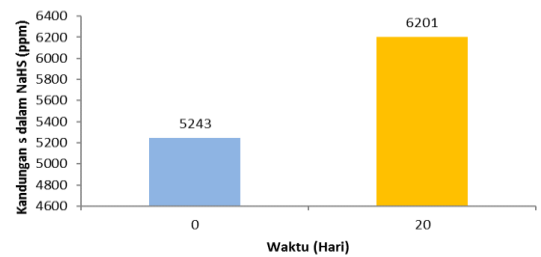


**Grafik 4.1 Kandungan Sulfur Dalam NaHS Kosentrasi 0,25 gr**

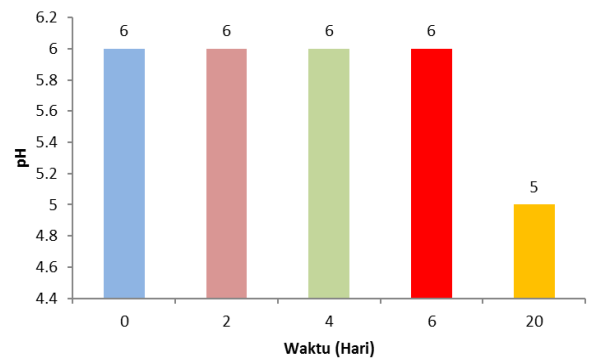


**Grafik 4.2 pH Pada NaHS Kosentrasi 0,25 gr**

1. Selama proses fermentasi dalam NaHS dirubah oleh mikroba menjadi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sehingga menurunkan pH.
2. Garam dalam bentuk NaHS mungkin ikut tersaring dalam kertas saring.
3. Oleh karena itu, kandungan sulfur meningkat karena sulfur dalam bentuk H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tidak ikut tersaring.
4. Perbedaan konsentrasi S diawal dan estimasi perhitungan menunjukkan akuratan alat Sulfur Analyzer dan pengecekan pH menggunakan pH Indikator.



**Grafik 4.3 Kandungan Sulfur Dalam NaHS Kosentrasi 0,5 gr**



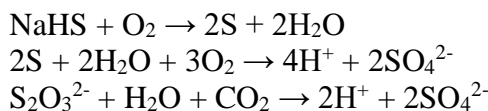
**Grafik 4.4 pH Pada NaHS Kosentrasi 0,5 gr**

1. Ini menunjukkan gejala yang sama dengan percobaan sebelumnya.



2. Mikroba mampu menguraikan S dalam NaHS menjadi  $H_2SO_4$  yang terlarut dan tidak tersaring sehingga pH turun dari 6 menjadi 5 dan kandungan sulfur naik dari 5,243 ppm menjadi 6,201 ppm.

Reaksi oksidasi NaHS menghasilkan asam sulfat melalui reaksi sebagai berikut:



Salah satu bakteri yang dapat mengoksidasi senyawa sulfur adalah *Thiobacillus denitrificans*. Mikroorganisme ini mengoksidasi NaHS dan membentuk sulfur elemen yang disimpan dalam selnya. *Thiobacillus denitrificans* mengoksidasi bahan anorganik seperti NaHS dan mengubahnya menjadi  $H_2SO_4$  (Edmons, 1978).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: Proses isolasi dan *screening* pada mikroba asli Indonesia (*indigeneous*) menggunakan metode isolasi secara konvensional yaitu isolasi yang menggunakan proses secara bertingkat dengan tahap isolasi. Tahap pertama adalah pengambilan sampel dari alam, tahap kedua pengenceran sampel dalam air steril, tahap ketiga penyimpanan media agar pembiakan, tahap keempat pencampuran agar pada sampel cawan petri, tahap kelima inkubasi dan tahap terakhir yaitu pemeriksaan hasil inkubasi. Sedangkan untuk pemisahan mikroba menggunakan metode penggoresan agar. Kemudian proses *screening* dan isolasi mikroba asli Indonesia (*indigenous*) yangtelah didapat mampu mengikat  $H_2S$  dan dapat digunakan untuk pemurniaan biogas.

### Saran

Berdasarkan dari proses penelitian, terdapat beberapa saran antara lain diharapkan penelitian yang akan datang menggunakan metode metode isolasi yang lainnya dan juga berbagai macam variabel.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1]Dunger, W, Fielder HJ. 1989. Methoden der bodenbiologie. 2nd ed. New York : Gustav Fischer Verlag.
- [2]Dwidjoseputro .1990. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Djambatan.
- [3]Elizabeth Mary. 2010. *Biogas Purification : H<sub>2</sub>S Removal using Biofiltration*. A thesis presented to the University of Waterloo : Canada.
- [4]Merck, E. 1980, *Reagents diagnostic chemicals*.Darmstadt : Germany.
- [5]Peyruze Ozmen, Solmaz Aslanzadeh. 2009. *Biogas Production from municipal waste mixed with different proportion of orange peel*. University of Boras : Sweden.
- [6]Wahyono, E.H. dan Sudarno, N. 2012, *Biogas Energi Ramah Lingkungan*, Diktat ITTO, Bogor, 2012.
- [7]Waluyo, Lud. 2005. *Mikrobiologi Umu*. Malang : UMM Press.