



Pemanfaatan Bakteri Pereduksi Emisi Gas Metana Pada Limbah Cair Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Nisa Widya Amanda^{1*}, I Made Artika¹, Iman Rusmana²

¹Department of Biochemistry, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

²Department of Biology, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

Received: 2 February 2018 ; Accepted: 11 July 2019

Corresponding author : Nisa Widya Amanda, Departemen Biokimia IPB; e-mail: nswamanda@gmail.com

ABSTRACT

Palm trees are one of the largest oil-producing plants in Indonesia. Processing palm fruit into oil has a negative impact, such as the generation of methane gas. It is known that methane gas is one of the greenhouse gases known to cause global warming. Therefore a method to reduce the amount of methane gas emission is needed. The present study is aimed to use bacteria to reduce methane emission in palm oil mill effluent (POME). Bacteria were isolated from liquid palm oil mill effluent. The isolates were tested for activity soluble methane monooxygenase (sMMO) and particulate methane monooxygenase (pMMO). Based on methane monooxygenase activity, one isolate was selected for DNA sequencing and phylogenetic tree analysis. The bacterial isolation process resulted in 13 single colony isolates. The sMMO activity test showed that none of the isolates has sMMO activity. On the other hand, the pMMO activity tests showed that the isolates have different levels of pMMO activity ranging between 0.10 – 0.22 M/mL culture/ day. DNA sequence analysis showed that the chosen isolate was Klebsiella sp. Based on Gram test it was a Gram negative bacterium. Bacteria have the potential to be employed to reduce methane emission in the palm oil mill effluent.

Keywords: *Klebsiella sp, 16S rRNA, Methane, pMMO, sMMO.*

ABSTRAK

Kelapa sawit merupakan salah satu tumbuhan penghasil minyak terbesar di Indonesia. Proses pengolahan buah kelapa sawit menjadi minyak memiliki dampak negatif, yakni terciptanya gas metana. Gas metana merupakan salah satu gas penyumbang efek rumah kaca yang menyebabkan pemanasan global. Oleh karena itu, diperlukan cara untuk menurunkan emisi gas metana. Tujuan penelitian ini adalah penggunaan bakteri untuk menurunkan emisi gas metana pada limbah cair pemrosesan buah kelapa sawit. Bakteri diisolasi dari limbah cair kelapa sawit. Terhadap isolat tunggal yang diperoleh dilakukan uji aktivitas enzim soluble methane monooxygenase (sMMO) dan particulate methane monooxygenase (pMMO). Isolat dengan aktivitas methane

monoxygenase tertinggi dipilih untuk analisis sekuen DNA dan konstruksi pohon filogenetika. Tahap isolasi bakteri menghasilkan 13 isolat koloni tunggal. Uji aktivitas methane monoxygenase menunjukkan bahwa semua isolat tidak memiliki aktivitas sMMO. Sebaliknya, semua isolat memiliki aktivitas pMMO dengan tingkat berbeda yaitu dengan rentang nilai antara 0.10 – 0.22 M/mL kultur/hari. Analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa isolat terpilih adalah Klebsiella sp. Berdasarkan uji Gram diketahui bahwa bakteri ini termasuk bakteri Gram negatif. Bakteri berpotensi digunakan untuk menurunkan emisi gas metan pada limbah cair pemrosesan buah kelapa sawit.

Kata kunci: *Klebsiella sp, 16S rRNA, Metana, pMMO, sMMO.*

1. PENDAHULUAN

Minyak kelapa sawit berasal dari buah pohon kelapa sawit (*Elaeis guineensis Jacq*), suatu spesies tumbuhan tropis yang berasal dari Afrika Barat, namun kini tumbuh sebagai hibrida di banyak belahan dunia, termasuk di Asia Tenggara dan Amerika Tengah (Fricke 2009). Kelapa sawit merupakan tanaman perkebunan yang berperan penting dalam peningkatan devisa negara, penyerapan tenaga kerja dan peningkatan perekonomian di Indonesia. Akhir-akhir ini luas areal tanam kelapa sawit mengalami peningkatan. Namun, peningkatan ini dihadapkan dengan keterbatasan lahan subur karena lahan yang tersedia didominasi lahan marginal seperti Ultisol (Sembiring et al. 2013). Akibat semakin meningkatnya konsumsi dunia, ekspor *Crude Palm Oil* (CPO) dalam 5 tahun terakhir cenderung meningkat, rata-rata mengalami peningkatan sebesar 11%. Eksportir terbesar minyak kelapa sawit adalah negara Malaysia dan Indonesia karena kedua negara tersebut menguasai sebesar 91% pasar dunia minyak kelapa sawit. Hal ini menyebabkan Indonesia menjadi salah satu negara eksportir terbesar kelapa sawit (Masykur 2013).

Peningkatan jumlah perusahaan kelapa sawit memiliki hubungan yang sangat kuat dengan jumlah limbah yang dihasilkan. Limbah pengolahan minyak kelapa sawit terbagi menjadi dua, yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat yang dihasilkan antara lain berupa tandan janjang kosong, sisa pengolahan serta buah yang terlepas. Limbah cair yang dihasilkan berupa minyak CPO dan air. Limbah cair banyak mengandung zat organik (Widarti et al. 2015) dan unsur hara makro seperti N, P dan K. Apabila kandungan bahan organik dalam limbah tinggi, maka semakin banyak oksigen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk mendegradasi bahan organik tersebut, sehingga nilai *Biological Oxygen Demand* (BOD) dan *Chemical Oxygen Demand* (COD) limbah juga akan tinggi. Kebutuhan oksigen biokimia (*Biological Oxygen Demand/BOD*) merupakan jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme didalam lingkungan air untuk memecah atau mendegradasi ataupun mengoksidasi bahan organik yang ada di dalam limbah. Semakin tinggi kandungan bahan organik dalam limbah cair maka semakin banyak oksigen yang dibutuhkan oleh mikroba untuk menguraikan senyawa organik tersebut,

sehingga diperlukan perlakuan khusus sebelum dibuang ke lingkungan untuk menghindari pencemaran (Widarti *et al.* 2015).

Limbah cair industri minyak sawit banyak mengandung mikroorganisme yang mempunyai potensi melakukan hidrolisis terhadap lemak dan minyak (Swandi *et al.* 2015). Kandungan ini yang menimbulkan bau yang tidak sedap pada limbah kelapa sawit. Bau yang dihasilkan dari limbah ini harus dihilangkan agar ketika dibuang tidak meresahkan lingkungan di sekitar tempat pembuangan limbah kelapa sawit. Salah satu cara menghilangkan bau ini adalah dengan menurunkan emisi metana yang dihasilkan dari mikroorganisme tersebut. Metana (CH₄) dan karbondioksida (CO₂) merupakan gas rumah kaca yang berperan penting dalam pemanasan global. Sebagai gas rumah kaca, metana 84 kali lebih poten dibandingkan karbondioksida (Ross dan Rosenzweig 2017). Kadar CH₄ di permukaan bumi setiap tahunnya mengalami kenaikan sebesar 0.8%. Bila ini tidak ditangani secara cepat dan tepat dimasa mendatang efek rumah kaca akan semakin berbahaya. Kenaikan ini antara lain diakibatkan oleh kurang tepatnya penanganan dan pengelolaan gas metana (Lilik 2001). Metana merupakan senyawa karbon yang paling stabil yang ada di lingkungan anaerob dan merupakan senyawa antara dalam mineralisasi materi organik. Metana akan terlepas dari lingkungan anaerob menuju atmosfer jika tidak dioksidasi oleh mikroba metanotrof. Lepasnya metana ke atmosfer meningkatkan laju pemanasan global dan mengubah komposisi kimia atmosfer (Hanson dan Hanson 1996).

Bakteri metanotrof adalah bakteri yang mampu mengoksidasi metana menjadi methanol dan memiliki potensi aplikasi dalam bioremediasi dan penghilangan gas rumah kaca. Bakteri metanotrof sangat membutuhkan tembaga karena enzim utama dalam metabolismenya yaitu *particulate methane monooxygenase* (pMMO), aktivitasnya bergantung pada tembaga. Proporsi protein enzim pMMO adalah sekitar 20% dari protein sel bakteri metanotrof. Enzim ini mengkatalisis reaksi pertama dalam lintas metabolisme yaitu oksidasi metana menjadi methanol. Dalam keadaan keterbatasan tembaga, beberapa metanotrof memproduksi enzim alternative yaitu *soluble methane monooxygenase* (sMMO) yang memiliki diiron pada situs aktifnya. Pada strain bakteri metanotrof dengan sifat seperti ini, keberadaan tembaga bersifat menekan transkripsi gen sMMO dan sebaliknya meningkatkan ekspresi gen pMMO (Balasubramanian *et al.* 2011).

Pengolahan gas metana dari limbah cair kelapa sawit hasil samping industri kelapa sawit merupakan hal penting dalam penanganan lingkungan industri agar tidak terjadi pencemaran lingkungan selain bisa meningkatkan nilai tambah limbah tersebut (Purwanti *et al.* 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri yang terkandung dalam limbah cair kelapa sawit dan menentukan isolat bakteri terbaik yang dapat mereduksi emisi metana.

2. METODOLOGI

Pengambilan Sampel

Sampel limbah kelapa sawit berasal dari perusahaan PT. Fajar Agro Sejahtera yang berlokasi di Batulicin,

Kota Baru, Kalimantan Selatan. Pengolahan kelapa sawit menghasilkan limbah yang kemudian dibuang ke dalam 8 kolam. Kolam 1 dan 2 merupakan kolam *cooling pound*, kolam 3 dan 4 merupakan kolam *mixing pound*, kolam 5 dan 6 merupakan kolam yang mendapat perlakuan anaerob dan kolam 7 dan 8 merupakan kolam yang mendapat perlakuan aerob. Sampel yang digunakan berasal dari kolam 5 yang diambil dari 4 titik yang berbeda, yaitu pojok kanan atas, pojok kanan bawah, pojok kiri atas, dan pojok kiri bawah. Pengambilan sampel pada setiap titik dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Sampel limbah kelapa sawit kemudian ditempatkan dalam botol plastik.

Isolasi Bakteri (Rusmana dan Akhdiya 2009)

Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan teknik pengayaan pada media *Nitrate Mineral Salt* (NMS). Sebanyak 1 mL sampel limbah diinokulasikan ke dalam 50 mL media NMS dalam 100 mL botol yang ditutup dengan karet septum butil. Botol *headspace* akan diisi dengan 50% metana dan 50% udara. Inkubasi dilakukan selama 5 - 6 hari pada suhu kamar menggunakan *shaker*. Selanjutnya, isolat dimurnikan dengan menggunakan teknik pelat berseri pada medium NMS agar.

Seleksi Isolat Berdasarkan Aktivitas Soluble Methane Monooxygenase (sMMO) (Graham et al. 1992)

Seleksi pada tahap ini dilakukan dengan metode kolorimetri, yaitu masing-masing isolat ditumbuhkan pada media NMS + 1 μ M CuSO₄. Setelah diinkubasi

10-14 hari cawan diletakkan pada posisi terbalik lalu dibuka dengan cara mengangkat bagian cawan yang berisi koloni, lalu cawan penutup ditaburi kristal naftalena selanjutnya ditutup kembali tetap pada posisi terbalik dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah 15 menit permukaan koloni disemprot dengan larutan o-dianisidin (5 mg/ml) lalu ditutup dengan penutup cawan yang baru dan diinkubasi kembali selama 15 menit (cawan tidak dibalik). Selanjutnya diamati koloni yang warnanya berubah menjadi ungu menandakan positif terhadap aktivitas sMMO.

Seleksi Isolat Berdasarkan Aktivitas Particulate Methane Monooxygenase (pMMO) (Zhan et al. 2010)

Seleksi pada tahap ini dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media cair NMS di tabung reaksi. Tabung reaksi dibuat dalam kondisi *headspace* yang ditambahkan dengan gas metana sebanyak 12 mL dan ditutup dengan karet septum butil. Sampel diinkubasi selama 7 hari pada *shaker*. Selanjutnya, sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 481 nm. Pengukuran dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 0.1 mL ditambahkan reagen SNP sebanyak 0.6 mL dan ditambahkan akuades hingga total volume 1.5 mL. Selanjutnya, sampel di vortex pada kecepatan maksimum selama 10-20 detik dan didiamkan selama 15 menit.

Uji Pewarnaan Gram (Beveridge, 2001; Coico, 2005)

Satu tetes akuades diletakkan pada kaca objek yang ditambahkan satu ose

biakan sampel lalu difiksasi di atas api. Kristal violet ditambahkan dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian lugol diteteskan pada sampel selanjutnya dibiarkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Alkohol 95% diteteskan dan dibiarkan selama 10-20 detik cuci dengan air mengalir dan ditambahkan safranin selanjutnya dibiarkan selama 20-30 detik kemudian cuci dengan air mengalir. Tahap berikutnya, dikeringkan dengan menggunakan kertas serap dan minyak emersi ditambahkan dan sampel diamati di bawah mikroskop. Bila dari hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah Gram negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut bersifat Gram positif.

Isolasi, Amplifikasi, dan Visualisasi DNA (Agung *et al.* 2009)

DNA hasil isolasi digunakan untuk amplifikasi gen 16S- rRNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi gen 16S-rRNA dilakukan dengan memakai DNA templat yang diamplifikasi dengan kit *PrestoTM Mini gDNA Bacteria* dengan menggunakan primer go *Taq*. Kondisi PCR yang digunakan adalah Pra-PCR pada suhu 94 °C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 92 °C selama 45 detik, *Annealing* primer pada suhu 55 °C selama 45 detik, *elongation* atau perpanjangan primer pada suhu 72 °C selama 45 detik, dan Post PCR pada suhu 72 °C selama 10 menit, dengan jumlah siklus sebanyak 30 kali. Pemisahan DNA produk PCR dilakukan pada elektroforesis mini-gel dengan menggunakan gel agarosa 1% (b/v) pada

tegangan listrik 85 volt selama 45 menit. Visualisasi menggunakan etidium bromida dan dilihat di bawah UV Transluminator.

Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan penyedia jasa sekuen DNA. Hasil sekuen kemudian diujarkan dengan data GenBank menggunakan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotida*) dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mengetahui kemiripan, identitas, fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dari isolat yang diuji.

3. HASIL

Isolat Bakteri Hasil Pemurnian

Isolasi bakteri bertujuan untuk memperoleh bakteri dari limbah cair pengolahan buah kelapa sawit yang mampu menurunkan konsentrasi gas metana pada limbah cair pemrosesan buah kelapa sawit. Pemurnian bakteri dilakukan pada medium cair *Nitrate Mineral Salt* (NMS) anaerob yang mengandung gas metana kemudian diinkubasi selama kurang lebih satu minggu. Perubahan warna cairan yang menjadi lebih keruh menunjukkan bahwa bakteri tersebut telah tumbuh. Selanjutnya, bakteri ditumbuhkan kembali pada medium agar hingga didapatkan koloni tunggal. Berikut hasil pemurnian bakteri ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Morfologi Isolat dan Aktivitas sMMO

Enzim *Soluble Methane Monooxygenase* (sMMO) merupakan salah satu enzim yang dimiliki oleh

bakteri yang mampu menggunakan gas metana sebagai sumber karbon dan energinya. Ciri khas dari enzim ini adalah hanya larut dalam sitosol. Uji enzim sMMO dilakukan dengan menyemprotkan larutan CuSO₄ ke permukaan bakteri yang berada pada medium agar. Hasil seleksi isolat bakteri, karakterisasi morfologi dan uji aktivitas sMMO ditunjukkan pada Tabel 2. Pada semua isolat yang diuji tidak terdeteksi adanya aktivitas sMMO.

Aktivitas pMMO

Enzim lain yang diuji aktivitasnya pada bakteri hasil isolasi adalah

Particulate Methane Monooxygenase (pMMO). Enzim pMMO ini merupakan enzim partikulat yang dimiliki oleh semua bakteri yang memanfaatkan gas metana sebagai sumber energi dan karbon. Pengujian dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pMMO sampel dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 481 nm. Hasil pengukuran enzim pMMO ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan aktivitas tertinggi pMMO, selanjutnya dipilih isolat AMD13 untuk dikarakterisasi lebih lanjut melalui uji pewarnaan Gram dan analisis sekuen DNA.

Tabel 1 Hasil isolasi pada kolam anaerob pengolahan limbah kelapa sawit

No	Titik Sampel	Jumlah Sampel	Isolat yang diperoleh
1	Pojok Kanan Atas	1	4
2	Pojok Kanan Bawah	1	2
3	Pojok Kiri Atas	1	3
4	Pojok Kiri Bawah	1	4
Jumlah			13

Tabel 2 Karakterisasi isolat bakteri hasil isolasi dari limbah kelapa sawit

No	Kode Isolat	Morfologi Koloni	sMMO
1	AMD1	Bulat, Besar, Merah	-
2	AMD2	Bulat, Kecil, Putih	-
3	AMD3	Bulat, Kecil, Putih	-
4	AMD4	Bulat, Kecil, Merah	-
5	AMD5	Bulat, Kecil, Putih	-
6	AMD6	Bulat, Besar, Merah	-
7	AMD7	Bulat, Sangat Kecil, Putih	-
8	AMD8	Bulat, Sangat Kecil, Putih	-
9	AMD9	Bulat, Sangat Kecil, Putih	-
10	AMD10	Bulat, Sangat Kecil, Putih	-
11	AMD11	Bulat, Besar, Merah	-
12	AMD12	Bulat, Besar, Merah	-
13	AMD13	Bulat, Kecil, Putih	-

Keterangan + : terdeteksi aktivitas enzim sMMO
- : tidak terdeteksi aktivitas enzim sMMO

Tabel 3 Hasil pengukuran sampel uji pMMO

No	Kode Isolat	Rata-Rata	Konsentrasi (mM)	Aktivitas Oksidasi Metana per hari (mM)/0.1mL kultur
1	AMD1	0.263	1.08	0.15
2	AMD2	0.265	1.09	0.16
3	AMD3	0.226	0.78	0.11
4	AMD4	0.275	1.18	0.17
5	AMD5	0.320	1.54	0.22
6	AMD6	0.264	1.09	0.16
7	AMD7	0.299	1.37	0.20
8	AMD8	0.297	1.35	0.19
9	AMD9	0.275	1.18	0.17
10	AMD10	0.287	1.27	0.18
11	AMD11	0.213	0.67	0.10
12	AMD12	0.289	1.29	0.18
13	AMD13	0.301	1.39	0.20



Gambar 1 Hasil Uji Gram AMD13

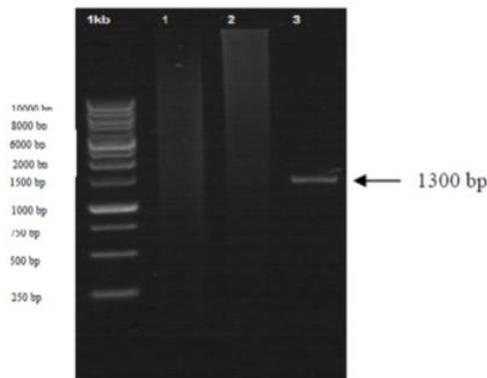
Hasil Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi isolat bakteri. Hal ini dilakukan untuk mengetahui isolat yang diperoleh termasuk bakteri Gram negatif atau positif. Pengujian Gram dilakukan dengan menggunakan larutan Kristal violet, lugol, safranin dan minyak emersi. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 100. Hasil pengamatan disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil pengamatan

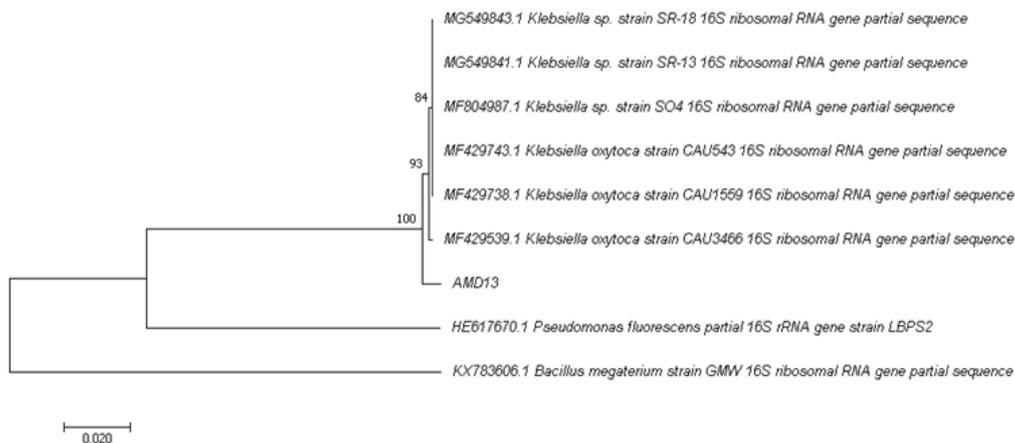
disimpulkan bahwa isolat AMD13 adalah bakteri Gram negatif.

Amplikon dan Sekuen Gen 16S rRNA Isolat AMD13

Berdasarkan hasil uji aktivitas pMMO, isolat AMD13 dipilih untuk analisis molekuler yaitu amplifikasi dan penentuan sekuen nukleotida gen penyandi 16S rRNA. Amplikon hasil PCR gen 16S rRNA disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Amplikon hasil PCR gen 16S rRNA isolat AMD13



Gambar 3. Pohon filogenetik isolat AMD13

Amplikon yang dihasilkan berukuran sekitar 1300 pasang basa. Fragmen ini selanjutnya ditentukan urutan nukleotidanya. Sekuen DNA gen penyandi 16S rRNA dianalisis menggunakan program BLAST-N dan NCBI guna mengidentifikasi spesies bakteri tersebut. Proses pencarian nama spesies yang dimiliki dilihat dari nilai *indent* dengan nama-nama spesies yang ditampilkan pada NCBI. Nilai *indent* yang semakin tinggi menandakan kekerabatan yang sangat dekat dengan spesies yang dianalisis. Selain mendapatkan nama spesies secara pasti, informasi dari hasil sekuensing ini memberikan informasi

taksonomi bakteri sampel bakteri yang dimiliki.

Pohon Filogenetik Isolat AMD13

Filogenetik merupakan suatu cara untuk memastikan kekerabatan yang dimiliki oleh isolat yang kemudian dibandingkan dengan sekuens DNA lain yang berada di data GenBank melalui pohon filogenetik. Hasil pohon filogenetik ini akan memperlihatkan seberapa besar kedekatan isolat yang dimiliki yang diperlihatkan dengan jarak kekerabatan. Semakin besar nilai kekerabatannya, maka semakin besar kemiripan isolat yang dimiliki dengan sekuens yang dimiliki pada data *GenBank*. Hasil analisis

filogenetik isolat AMD13 menggunakan aplikasi MEGA 5.0 disajikan pada Gambar 3.

4. PEMBAHASAN

Pemurnian bakteri ditujukan untuk mendapatkan isolat tunggal dari sampel yang diambil. Pengambilan sampel dilakukan pada 4 titik masing-masing di pojok kolam. Tahap pemurnian isolat dimulai dengan menambahkan gas metana pada medium cair yang dilanjutkan dengan inkubasi selama kurang lebih 7 hari menggunakan *shaker* pada suhu ruang. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan penggoresan bakteri pada medium padat *Nitrate Mineral Salt* (NMS). Penggoresan dilakukan hingga mendapatkan koloni tunggal dari masing-masing titik pengambilan sampel. Hasil proses pemurnian bakteri menunjukkan bahwa dari masing-masing titik didapatkan sejumlah isolat. Sampel yang diambil dari pojok kanan menghasilkan 4 isolat, pojok kanan bawah menghasilkan 2 isolat, pojok kiri atas menghasilkan 3 isolat dan pojok kiri bawah menghasilkan 4 isolat. Total isolat murni yang didapat berjumlah 13 isolat dengan karakteristik dan morfologi yang berbeda-beda seperti disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji aktivitas sMMO pada 13 isolat yang diteliti menunjukkan bahwa semua isolat tidak memiliki aktivitas enzim sMMO. Seperti disajikan pada Tabel 2, semua isolat menunjukkan hasil negatif. Menurut Hanson dan Hanson (1996), bakteri yang mengandung enzim sMMO pada membran sel akan mengalami perubahan menjadi ungu. Namun, hal ini tidak didapatkan di 13 isolat tersebut setelah penambahan

naftalena pada media pertumbuhan setelah penambahan *o*-dianisidin. Hal ini juga mengindikasikan bahwa 13 isolat tersebut tidak dapat memanfaatkan NADH^+ dan H^+ .

Oksidasi metana diinisiasi enzim metan monoksigenase (MMO) yaitu enzim yang secara spesifik memecah ikatan O-O dioksigen. Salah satu atom oksigen direduksi untuk membentuk H_2O dan atom lainnya digunakan untuk membentuk CH_3OH . Enzim MMO terbagi menjadi dua macam, salah satunya adalah *soluble methane monooxygenase* (sMMO) yang terdapat pada sitoplasma, dan memanfaatkan NADH^+ dan H^+ sebagai pendonor elektron. Karakteristik enzim sMMO adalah tidak ditemukannya kofaktor heme ataupun kofaktor lainnya pada membran bakteri (Hanson dan Hanson 1996). Enzim sMMO terdiri dari tiga komponen, yakni hidrosilase (MMOH) yang merupakan sisi aktifnya, reduktase (MMOR) yang bertugas untuk mengangkut elektron dari NADH ke bagian sisi aktif MMO dan protein regulator (MMOB) merupakan bagian yang penting untuk aktivitas enzim (Amanda dan Rosenzweig 2007).

Enzim sMMO dapat mengoksidasi berbagai macam hidrokarbon, seperti C1-C8 n-alkana, alkana dan substrat besar lainnya seperti benzana, naftalena, etilbenzena dan sikloheksana. Selain itu, sMMO mengoksidasi sejumlah halogen hidrokarbon, seperti polutan trikloroetilen (Sirajudin dan Rosenzweig 2015). Karakteristik lain enzim sMMO yaitu memiliki substrat yang sangat spesifik. Hal ini dapat diketahui pada beberapa bakteri yang tumbuh pada media yang ditambahkan sedikit tembaga dari

naftalena. Sel bakteri yang mengandung enzim sMMO secara cepat akan mengoksidasi naftalena dari 1- dan 2-naphtols, yang dapat ditemukan dengan penambahan tetrazoitized *o*-dianisidin. Reaksi enzim sMMO ini menunjukkan aktivitas dari enzim sMMO pada koloni bakteri yang ditumbuhkan pada medium agar dengan konsentrasi tembaga yang rendah. Hasil positif yang didapatkan jika bakteri tersebut mengandung enzim sMMO adalah terjadinya perubahan warna menjadi ungu (Hanson dan Hanson 1996).

Enzim lain yang diuji aktivitasnya adalah *particulate methane monoxygenase* (pMMO). Pengukuran aktivitas enzim pMMO menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi pMMO dari ke-13 isolat berkisar antara 0.010 M – 0.022 M. Kurva standar yang dibuat memiliki nilai regresi sebesar 0.99. Hal ini mengindikasikan bahwa variasi konsentrasi yang digunakan memiliki hubungan yang linear. Hasil pengukuran enzim pMMO pada bakteri dapat dilihat pada Tabel 3. Enzim pMMO terdiri dari 3 bagian yaitu subunit α , β dan γ (Amanda dan Rosenzweig 2007). Fungsi dari ketiga bagian tersebut adalah sebagai sisi aktif untuk mengkatalisis CH_4 (Mohammadi et al. 2017). Enzim pMMO ini diketahui hampir dapat ditemukan di setiap bakteri yang memanfaatkan gas metana sebagai sumber energi dan karbon. Enzim pMMO tidak dapat mengoksidasi naftalena menjadi naphtols seperti yang dilakukan oleh enzim sMMO. Aktivitas enzim pMMO dapat diketahui melalui pengujian *methane monoxygenase* (MMO) activity. Aktivitas pMMO diuji dengan mengetahui jumlah propilen epoksidasi melalui NADH sebagai reduktan aktivitas spesifik

pMMO dapat meningkatkan konsentrasi ion tembaga pada bakteri yang ditumbuhkan pada media. Enzim ini terdapat pada membran dalam sitoplasma. Ukuran substrat yang dimiliki enzim pMMO lebih kecil dibandingkan dengan enzim sMMO dan enzim monooksigenase lainnya. Enzim monooksigenase memiliki peran dalam mereduksi ikatan $\text{O}=\text{O}$ menjadi ikatan dioksigen (Lipscomb 1994).

Mekanisme kerja enzim pMMO melibatkan aktivasi molekul oksigen oleh Cu (I). Interaksi antara molekul oksigen dengan Cu (I) menghasilkan kompleks $(\mu-\eta^2:\eta^2\text{-peroxo})\text{Cu(II)}_2$ yang dapat diisomerasi menjadi $\text{bis}(\mu\text{-oxo})\text{Cu(III)}_2$. Hasil isomerasi tersebut merupakan senyawa yang mampu memecah ikatan C-H alkana (Silva et al. 2016). Proses selanjutnya adalah konversi metanol menjadi formaldehid, yang merupakan senyawa antara utama sebelum memasuki jalur metabolisme berikutnya. Enzim yang berperan dalam proses ini adalah metanol dehidrogenase (MDH) (Knief et al. 2003). Proses konversi oleh MDH merupakan proses kunci (Hanson dan Hanson 1996) dalam jalur metabolisme bakteri pengguna karbon tunggal (C1) seperti metilotrof. Formaldehid dapat memasuki dua jalur metabolisme yaitu jalur metabolisme ribulosa monofosfat (RuMP) dan jalur serin. Hasil asimilasi formaldehid berupa CO_2 dan senyawa multikarbon. Jalur RuMP digunakan oleh bakteri metanogen tipe I. Oksidasi formaldehida melalui jalur ini tidak membutuhkan kekuatan reduksi sehingga seluruh sumber karbonnya digunakan sebagai bahan untuk membuat materi sel. Dua enzim unik pada jalur ini adalah heksulose-6-fosfat sintase dan

heksulose fosfat isomerase (Hanson dan Hanson 1996). Jalur RuMP membutuhkan satu molekul ATP untuk setiap pembentukan satu molekul gliseraldehid-3-fosfat. Bakteri yang tergolong tipe I memiliki jumlah sel yang lebih banyak dibandingkan dengan tipe II karena perbedaan penggunaan energi (Balasubramanian et al. 2011). Menurut Hanson dan Hanson (1996), jalur serin membutuhkan dua molekul NADH dan ATP sebagai sumber energi untuk pembentukan satu molekul asetil KoA dan satu molekul CO₂. Asetil KoA kemudian digunakan untuk membentuk materi sel yang baru. Enzim spesifik yang teridentifikasi pada jalur serin adalah serin hidroksimetil transferase (STHM), hidroksipiruvat reduktase (HPR), dan malil koenzim A liase (MCI).

Uji Gram bertujuan untuk mengetahui isolat yang diperoleh termasuk kedalam bakteri Gram negatif atau positif. Berdasarkan hasil yang didapat dari pengujian Gram dan pengamatan dibawah mikroskop pada perbesaran 100 kali, diketahui bahwa isolat yang diperoleh merupakan kelompok bakteri Gram negatif. Hal ini berdasarkan hasil pengamatan dibawah mikroskop setelah penambahan larutan safranin dan dikeringkan, isolat menunjukkan warna merah. Uji Gram yang dikembangkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884 merupakan metode yang umum digunakan untuk membedakan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif menyerap zat pewarna primer (kristal violet) sehingga berwarna ungu atau biru. Sebaliknya, bakteri Gram negatif melepas zat warna (kristal violet) setelah dicuci dengan alkohol dan

kemudian menyerap zat warna terakhir yang diberikan yaitu safranin atau fuchsin sehingga berwarna merah. Perbedaan sifat dalam menyerap warna terkait dengan perbedaan struktur dan komponen dinding sel kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal tersusun oleh peptidoglikan dan polimer sekunder serta bersifat relatif impermeable sehingga tahan terhadap dekolorisasi dan mempertahankan zat pewarna primer. Sebaliknya, bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan tipis yang diselaputi oleh membran luar berupa lapisan ganda lipid-protein yang mengalami kerusakan pada tahap dekolorisasi (Beveridge, 2001; Coico, 2005). Morfologi yang ditunjukkan adalah berbentuk batang yang dapat dilihat pada Gambar 1. Berbeda halnya dengan pengamatan yang dilakukan oleh Drancourt *et.al* (2001), bakteri *Klebsiella sp.* menunjukkan bentuk yang tidak berkapsul, sel bakteri berbentuk Gram negatif, bersifat non-motil. Bakteri ini satu familia dengan bakteri Enterobakter.

Analisis molekuler untuk identifikasi isolat bakteri dimulai dengan isolasi DNA dari kultur bakteri baik dari medium padat maupun dari medium cair. Kemudian DNA yang diperoleh dijadikan cetakan dalam tahap amplifikasi dengan PCR. Saat menggunakan PCR primer yang digunakan adalah primer 16S rRNA yang bersifat universal yang diharapkan menghasilkan amplicon berukuran sekitar 1500 bp. Hasil amplifikasi gen penyandi 16S rRNA menunjukkan bahwa amplicon berukuran sekitar 1300 bp seperti disajikan pada Gambar 2. Primer yang digunakan dapat mengamplifikasi daerah

16S rRNA dari seluruh bakteri. Setelah produk PCR dimurnikan dengan kit komersial, selanjutnya produk PCR tersebut diurutkan nukleotidanya dengan metode sekuensing DNA. Primer yang digunakan saat PCR juga digunakan untuk sekuensing DNA tetapi yang digunakan hanya salah satu (*forward* atau *reverse*) untuk setiap reaksi sekuensing DNA. Pembacaan sekuens DNA berdasarkan produk hasil sekuensing dengan ukuran yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan pada saat sekuensing ditambahkan *dideoxyribonuclease triphosphate* (ddNTP) atau dNTP terminator yang dilabel dengan zat warna (Janda dan Abbott 2008). Dalam satu siklus terminator ini akan berikatan secara acak dan menghentikan proses pemanjangan. Tiap terminator memiliki zat warna fluoresen yang berbeda-beda dalam menyerap panjang gelombang. Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan *forward* dan *reverse* yang disebut sekuens konsensus. Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database (Rinanda 2011).

Isolat yang digunakan untuk analisis sekuens DNA adalah isolat AMD13. Pemilihan isolat ini berdasarkan aktivitas pMMO yang relatif tinggi. Hasil sekuensing ini memiliki nilai indent sebesar 98% dengan *Klebsiella sp.* strain SR-18, *Klebsiella sp.* strain SR-13, *Klebsiella sp.* strain SO4, *Klebsiella oxytoca* CAU543, *Klebsiella oxytoca* CAU1559, dan *Klebsiella oxytoca* CAU3466. Dengan nilai indent yang mendekati 100% diketahui bahwa isolat AMD13 merupakan *Klebsiella sp.* Sekuens DNA yang diperoleh kemudian

dianalisis menggunakan aplikasi MEGA untuk mengetahui kekerabatannya. Sekuens DNA disejajarkan dengan data sekuens yang berada pada data *GenBank*. Tujuan pensejajaran adalah mencocokkan karakter-karakter yang homolog. Hasil pensejajaran tersebut selanjutnya digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetika. Proses pensejajaran tersebut memperlihatkan beberapa gap. Gap ini menunjukkan adanya perubahan (mutasi) sekuens seperti insersi, delesi atau penyusunan ulang materi genetik. Beberapa metode mengabaikan keberadaan gap ini tetapi ada juga yang hanya memfokuskan kepada pensejajaran yang tidak memiliki gap sama sekali (Dharmayanti 2011).

Pohon filogenetik menampilkan jarak antara isolat yang diperoleh dengan sekuens yang diambil dari data *GenBank*. Jarak ini mencerminkan jumlah perubahan diantara masing-masing pasangan yang menentukan konstruksi pohon filogenetik. Pasangan sekuens yang memiliki perubahan yang kecil atau bisa juga disebut memiliki jarak yang kecil disebut dengan *neighbours*. Pohon filogenetika menggunakan satu titik atau posisi *common ancestor* dan dihubungkan dengan titik oleh sebuah cabang. Tujuan dari mengetahui jarak ini adalah untuk sebisa mungkin memberikan data yang akurat mengenai kekerabatan isolat yang dimiliki dengan sekuens yang didapat dari data *GenBank* (Dharmayanti 2011).

Berdasarkan analisis pohon filogenetik diketahui bahwa isolat AMD13 memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan spesies *Klebsiella sp.* Hal ini dapat dilihat bahwa jarak

kekerabatannya yang bernilai 100 berdasarkan pada Gambar 3. Isolat bakteri AMD13 tersebut disimpulkan merupakan bakteri *Klebsiella sp.* Sekuen gen 16S rRNA merupakan sekuen DNA yang paling sering digunakan untuk studi filogeni dan taksonomi bakteri. Alasannya antara lain: 1) sekuen ini ada pada hamper semua bakteri; 2) fungsi gen 16S rRNA tidak berubah selama rentang evolusi; 3) ukuran gen 16S rRNA (sekitar 1500 pb) memberikan informasi yang cukup untuk tujuan studi filogeni dan taksonomi (Janda dan Abbott 2007).

Bakteri *Klebsiella sp.* mampu menurunkan konsentrasi senyawa emisi gas rumah kaca, khususnya CH₄ (Zhao *et.al* 2009). Menurut Murrell dan Dalton (1992), *Klebsiella sp.* memiliki kesamaan dengan bakteri metanotrof dalam mereduksi gas metana, terutama dengan bakteri metanotrof tipe II. Namun, pemanfaatan gas metana oleh *Klebsiella sp.* belum diketahui secara mendalam. Bakteri metanotrof memanfaatkan gas metana dan merubahnya menjadi metanol. Bakteri metanotrof merupakan kelompok bakteri yang menggunakan metan sebagai sumber karbon dan energi. Bakteri ini dapat ditemukan di lingkungan yang cukup ekstrim dan pada lingkungan yang mengandung tanah (Amanda 2007). Keberadaan oksigen di lingkungan merupakan faktor penting dalam aktivitas pertumbuhan bakteri metanotrof begitu juga dengan *Klebsiella sp.* (Alshareedah dan Sallis 2016.). Organisme ini memiliki peran yang cukup penting dalam siklus karbon dan kemampuannya dalam membatasi gas metana yang menyebabkan pemanasan global (Amanda 2007).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA IPB atas dukungan fasilitas yang diberikan. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Ir Antonius Krisdawanto, SE, MBA atas dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Agung P, Suarsini E dan Amin M. 2009. Isolasi DNA genom bakteri potensial pengkelat logam berat kadmium dari limbah cair penapungan agar. Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek.
- Alshareedah A dan Sallis P. 2016. Methanotropic oxygen dependency and availability for sustained oxidation. *Int J Waste Resources*. 6(3): 1-11.
- Amanda H dan Rosenzweig C. 2007. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem*. 76: 223-241.
- Balasubramanian R, Enney G E, Rosenzweig A C. 2011. Dual pathways for copper uptake by methanotropic bacteria. *J Biol Chem*. 286 (43): 37313-37319.
- Beveridge TJ. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*. 76(3):111-8
- Coico R. 2005. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol*. Appendix 3C. doi:10.1002/9780471729259.mca03cs00.

- Dharmayanti N L P. 2011. Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*. 21(1): 1-10
- Drancourt M, Bollet C, Carta A dan Rousselier P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoutella* gen. nov., with description of *Raoutella ornithinolytica* comb. nov., *Raoutella terrigena* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51: 925-932.
- Fricke T. 2009. Studi Latar Belakang: Penggunaan Limbah dan Produk Sampingan Kelapa Sawit Secara Berkelanjutan. USAID-Indonesia.
- Graham DW, Korich DG, Leblanc RP, Sinclair NA, Arnold RG. 1992. Applications of a colorimetric plate assay for soluble methane monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol*. 58(7): 2231-2236.
- Hanson RS dan Hanson TE. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*. 60(2):439-471.
- Janda J M dan Abbott S L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9): 2781-2784.
- Knief C, A Lipski, PF Dunfield. 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol*. 69:6703-6714.
- Lilik S S. 2001. Pemanfaatan gas metana sebagai sumber energi. *Berita Dirgantara*. 2(1): 31-34.
- Lipscomb JD. 1994. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu Rev Microbiol*. 48:371-399.
- Masykur 2013. Pengembangan industri kelapa sawit sebagai penghasil energi bahan bakar alternatif dan mengurangi pemanasan global (studi di Riau sebagai penghasil kelapa sawit terbesar di Indonesia). *J Reform*. 3(2): 96-107.
- Mohammadi S, Pol A, Alen T van, Jetten M S M, Camp H J M den. 2017. Ammonia Oxidation and Nitrite Reduction in the Verrucomicrobial Methanotroph *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV. *Front. Microbiol*. 8: 1-11.
- Murrel J C, Dalton Howard. 1992. *Methane and Methanol Utilizers*. England (EN): Plenum Press.
- Purwanti, Elystia Shinta dan Sasmita A. 2014. Pengolahan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit dengan Metode Fitoremediasi Menggunakan *Typha latifolia*. *Jom Fteknik*. 1(2): 1-9.
- Rinanda T. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *J Ked Syiah Kuala*. 11(3): 172-177.
- Ross MO, Rosenzweig AC. 2017. A tale of two methane monooxygenases. *J Biol Inorg Chem* 22(2-3): 307-319. doi:10.1007/s00775-016-1419-y.

- Rusmana I, Akhdiya A. 2009. Isolation and characterization of methanotrophic bacteria from rice fields. *Biotropia*. 16(2): 71-78.
- Sembiring J V, Nelvia, Arnis E Y. 2015. Pertumbuhan kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) di pembibitan utama pada medium sub soil ultisol yang diberi asam humat dan kompos tandan kosong kelapa sawit. *J Agrotek*. 6(1): 25-32.
- Silva J C.S, Pennifold Rt C R, Harvey J dan Rocha W. 2016. A radical rebound mechanism for the methane oxidation reaction promoted by the docopper center of a pMMO enzyme: a computational perspective. *Dalton Trans*. 45: 2492-2504.
- Sirajuddin S dan Rosenzweig A C. 2015. Enzymatic oxidation of methane. *Biochem J*. 54 (14): 2283-2294.
- Swandi M K, Periadnadi, Nurmiati. 2015. Isolasi bakteri pendegradasi limbah cair industri minyak sawit. *J Bio Univ Andalas*. 4(1): 71-76.
- Widarti B N, Septian H D, Edhi S. 2015. Degradasi COD limbah cair dari pabrik kelapa sawit dalam proses pembentukan biogas. *JIPs*. 5(3): 138-141.
- Zhan Y-Y, Zhang Y, Li Q-M, Du X-Z. 2010. A novel visible spectrophotometric method for the determination of methanol using sodium nitroprusside as spectroscopic probe. *Biotechnol Bioeng*. 57 (2): 230-235.
- Zhao CG Zheng J, Li HP, Wen GM, Yang SP, Dong C, Choi MM. 2009. Characterization of a methane-utilizing strain and its application for monitoring methane. *J Appl Microbiol*. 106(6): 2024-2030.

