

## ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI METANOGENIK ASAL LIMBAH AIR KELAPA<sup>1)</sup>

*(Isolation, Characterization and Identification of Methanogenic Bacteria  
in the Sewage Coconut Water)*

Ardi Kapahang, Maria Bintang<sup>2)</sup>, Mansjur Hawab<sup>2)</sup>,  
D.D. Sastraatmadja<sup>2)</sup>, dan Dedy Duryadi Solichin<sup>2)</sup>

### ABSTRACT

*Bacteria are microbes which have an ability to live wherever there is a life. Some of the bacteria are saprophyte and some are parasitic. But most of the bacteria have not been identified or cultured; therefore the benefits are still unknown. Methanogenic bacteria are one of the saprophyte bacteria. These bacteria produces methane, a biogas as an alternative fuel in the future. Most of methanogenic bacteria are uncultured, however a few of them are found in the sewage of coconut water. The objectives of this research are to isolate, characterize and identify the methanogenic bacteria that lived in coconut water. The method of this research was fermentation, analysis characterization, and identification of methanogenic bacteria. First, methanogenic bacteria were isolated from coconut water by fermentation. The samples were from four places in Minahasa, which are Rasi (I), Koka (II), Amurang (III), and Lola (IV) and one place in Bogor (V). Secondly, the methane produced from fermentation was analysed by gas chromatography and the bacteria can be characterized by Bergey's method. The next step is the identification which was conducted by isolating the DNA, amplifying the DNA by PCR, then sequencing the DNA with BioEdit Sequence Alignment. As the result, high and stable methane was produced in Rasi (I) and Amurang (III). The characteristic of the bacteria are red colony (M) and white colony (P). The shape of the colonies is circles, gram positive, basil shape, mesophile, positive of catalase and citrate, positive of sugar fermentation, gelatin, casein and starch hydrolysis also lived in Nutrient Broth with pH 5.7-6.8. The sequencing of isolate P resulting in nucleotide composition of G 31.25%, C 20.58%, A 27.11% and T 21.04% while isolate M are G 31.34%, C 20.31%, A 27.02% and T 21.32%. The identification of isolate M is equal with Clostridium tyrobutyricum (100 %) and isolate P is very close with Clostridium tyrobutyricum (99 %).*

*Key words: bacteria, methane, coconut water*

### PENDAHULUAN

Bakteri adalah salah satu mikroba yang dapat hidup di semua tempat kehidupan di dunia ini. Ada yang menguntungkan, merugikan bahkan sebagian besar belum diidentifikasi sehingga tidak diketahui manfaatnya.

---

<sup>1)</sup> Bagian dari disertasi penulis pertama, Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana IPB

<sup>2)</sup> Berturut-turut Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing

Bakteri sering dikenal atau diberi nama berdasarkan produk dominan yang dihasilkannya. Demikian pula dengan bakteri metanogenik, diberi nama demikian karena menghasilkan gas metan ( $\text{CH}_4$ ). Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa sudah sangat jelas bakteri metanogenik diferensiasinya berbeda dengan organisme lain, ciri khasnya adalah semua produk katabolik utamanya menghasilkan gas metan. Berdasarkan perbedaan urutan basa RNA ribosom dalam batang filogenik, bakteri metanogenik digolongkan dalam Archaeobacteria (White, 2000). Bakteri metanogenik secara alami hidup di rawa-rawa, tanah becek, kolam, dan dalam alat pencernaan hewan besar (EREC, 2002).

Berbagai mikroba telah lama digunakan sebagai bahan dan alat (mesin biologi) untuk memproduksi obat-obatan, pengendalian hama dan penyakit, pangan dan pakan, juga detoksifikasi dan biokonversi limbah serta digunakan dalam bioteknologi seperti rekayasa genetika. Akhir-akhir ini di berbagai negara sedang giat-giatnya dilakukan penelitian yang menggunakan mikroba untuk mencari pengganti bahan bakar minyak bumi yang semakin mahal dan langka, seperti etanol yang diproduksi oleh Amerika dan Brasil (Mimura, 2000).

Bakteri metanogenik memegang peranan penting dalam produksi biogas (*natural gas*) karena sebagian besar gas yang terkandung di dalamnya adalah metan (60-80%). Gas ini berbau spesifik, tidak berwarna dan mudah terbakar (EREC, 2002). Biogas terjadi dari hasil perombakan/fermentasi bahan organik dalam keadaan anaerob. Semua bahan organik dapat digunakan sebagai bahan penghasil biogas, seperti sisa-sisa buangan (sampah) organik, sisa hasil pertanian, peternakan, tumbuhan air seperti eceng gondok, dan kotoran dari hewan dan manusia. Produksi gas metan dapat menjadi salah satu alternatif andalan pengganti bahan bakar *non-renewable* sekarang dan di masa yang akan datang (Warsito, 2000). Akan tetapi, untuk mengembangkannya muncul masalah karena kebanyakan bakteri metanogenik tidak dapat dikultur (*uncultured*) sehingga memerlukan penanganan khusus (Galand, 2002).

Di Indonesia luas areal tanaman kelapa tahun 2005 sebesar 3 898 418 ha, merupakan sepertiga dari luas areal tanaman kelapa dunia; di Provinsi Sulawesi Utara luas tanaman kelapa tahun 2001 sebesar 317.186 ha dengan jumlah batang yang menghasilkan 29 176 400 batang. Apabila tiap tahun rata-rata tiap batang berproduksi 30 butir, tiap tahun kelapa di Sulawesi Utara menghasilkan hampir 100 juta butir (BPS, 2001). Selanjutnya tiap 1000 butir menghasilkan 140 liter air kelapa (Rumokoy, 1990), tiap tahun dihasilkan 140 juta liter air kelapa. Dari jumlah yang sebesar ini baru sebagian kecil yang dimanfaatkan, sedangkan sebagian besar dibuang sebagai limbah yang menyebabkan tanah tempat pembuangannya basah dan becek serta bau busuk.

Hasil-hasil analisis air kelapa ternyata mengandung bahan-bahan senyawa organik seperti sukrosa, sorbitol, asam-asam amino, asam-asam organik, vitamin, fitohormon, dan unsur-unsur inorganik seperti kalium, natrium, kalsium, magnesium, besi, tembaga, fosfor, sulfat, dan klor. Kandungan nutrisi air kelapa seperti di atas memungkinkan menjadi media tumbuh atau substrat bagi berbagai kelompok mikroba terutama dari golongan bakteri.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengarakterisasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil gas metan dalam limbah air kelapa, serta memanfaatkannya sebagai biostarter produksi gas metan.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2004 sampai dengan Agustus 2006 di Laboratorium Mikrobiologi LIPI, Kebun Raya, Bogor, Laboratorium Biokimia IPB, Gunung Gede, Bogor, dan Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Studi Ilmu Hayati, Pusat Antar Universitas (PSIH-PAU IPB), Darmaga, Bogor.

### Sampel Air Kelapa

Sampel adalah limbah air kelapa yang diambil dari empat tempat pembuatan kopra di Minahasa Sulawesi Utara dan satu di pasar Bogor, yaitu Sampel I (Rasi), II (Koka), III (Amurang), IV (Lola), V (Bogor), dan kontrol (air kelapa murni). Penelitian terdiri atas tiga tahap, yaitu isolasi, karakterisasi, dan identifikasi.

### Isolasi Bakteri Metanogenik

Sampel ditimbang 100 g kemudian dilarutkan dengan aquades steril sampai volume 1 liter. Tiap sampel diambil 300 ml dan dimasukkan dalam fermentor dan ditambahkan air kelapa murni sampai volume 3 liter, difermentasi sampai terbentuk gas. Volume gas diukur tiap hari.

Adanya kandungan metan dalam gas yang terbentuk diuji dengan mengambilnya sebagian dan dibakar. Apabila terjadi nyala api, kemungkinan besar di dalamnya hidup bakteri metanogenik. Selanjutnya, sebagian gas yang terbentuk diambil dan diukur kuantitasnya menggunakan kromatografi gas (KG).

Sampel yang menghasilkan volume gas terbanyak direfermentasi, yaitu dengan mengambil sebanyak 300 ml dan dimasukkan kembali dalam fermentor dan ditambahkan air kelapa murni sampai volume 3 liter. Volume gas yang terbentuk diukur dan sebagian dibakar untuk menguji adanya metan dan sebagian lagi diukur komposisi metannya dengan KG.

Sumber isolat diambil dari media yang sudah menghasilkan gas metan terbanyak. Sejumlah 10 ml media sumber isolat diencerkan dengan konsentrasi  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  dan ditanam dalam media Ros Bengal, selanjutnya diinkubasi dalam wadah anaerob (*anaerobic jar*) pada suhu  $37-40^{\circ}\text{C}$  sampai terbentuk koloni. Konsentrasi isolat yang menghasilkan koloni bakteri yang terpisah baik selanjutnya dimurnikan.

Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan ditanam kembali dengan konsentrasi  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  dalam media Ros Bengal dan diinkubasi dalam wadah anaerobik jar pada suhu  $37-40^{\circ}\text{C}$ .

Isolat yang terpisah baik, diisolasi, dimurnikan, dan ditanam kembali dalam media Ros Bengal dengan cara digores dan dituang. Selanjutnya, diinkubasi dalam wadah an-aerobik jar pada suhu  $37-40^{\circ}\text{C}$ . Koloni yang tumbuh dan terpisah baik selanjutnya dipakai untuk analisis karakterisasi bakteri metanogenik.

Untuk menguji apakah koloni yang terbentuk benar-benar bakteri metanogenik, ditanam ulang dalam media air kelapa yang sudah disterilkan. Setiap koloni yang diisolasi berbeda masing-masing diencerkan dengan 10 ml

aquades steril dan dimasukkan dalam fermentor yang di dalamnya sudah berisi 3 liter air kelapa steril, demikian juga, sebagian isolat diencerkan dengan 10 ml aquades steril dan dimasukkan dalam fermentor yang di dalamnya sudah berisi 3 liter air kelapa steril. Gas yang terbentuk diukur. Sebagian dibakar untuk menguji apakah sudah terbentuk metan dan sebagian diukur kuantitasnya dengan KG.

Untuk memperjelas koloni mana yang bakteri metanogenik dan pada hari ke berapa mulai terbentuk gas metan, setiap isolat difermentasi/ditanam silang. Setiap hari sebelum ditanam silang, media disterilkan. Gas yang terbentuk diukur. Sebagian dibakar untuk menguji apakah sudah terbentuk metan dan sebagian diukur kuantitasnya dengan KG.

### **Karakterisasi Isolat Bakteri Metanogenik**

Karakterisasi morfologi dan taksonomi isolat dianalisis sesuai metode Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). Parameter uji adalah pewarnaan gram, pertumbuhan pada 37<sup>0</sup>C, 42<sup>0</sup>C, dan 50<sup>0</sup>C, pertumbuhan pada media NaCl 5% dan 10%; katalase; citrat; MR test; VP test pH <6, pH >7; indole; gas dalam glukosa; nitrat; pertumbuhan pada NA/Broth pH 6.8 dan pH 5.7; fermentasi gula: glukosa, arabinosa, manitol, xylose; hydrolysis terhadap gelatin, kasein, dan pati; serta uji reduksi nitrat.

### **Identifikasi Bakteri Metanogenik**

#### **Isolasi DNA total**

Sebanyak 200 ml media yang mengandung bakteri metanogenik diekstraksi dan dipurifikasi DNA kromosomnya menggunakan larutan lisozim, sodium dodesil sulfat (SDS), campuran kloroform/isoamilalkohol 24:1, Na-asetat, etanol, dan buffer TEN.

#### **Amplifikasi PCR**

DNA kromosom total hasil ekstraksi dan purifikasi digunakan sebagai DNA *template*/cetakan. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesifik prokariot gen 16 S-rRNA, yaitu 63F (5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC-3') dan 1387R (5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3') yang akan mengamplifikasi 1300 pasangan basa (pb) (Luton *et al.*, 2002). Amplifikasi PCR fragmen 16 S-rRNA menggunakan mesin Gene Amp<sup>R</sup> PCR system 2400 (Perkin Elmer) dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 4 menit pada suhu 94<sup>0</sup>C, denaturasi 30 detik pada suhu 94<sup>0</sup>C, penempelan (*annealing*) selama 30 detik pada suhu 56<sup>0</sup>C, pemanjangan (*elongasi*) selama 30 detik pada suhu 70<sup>0</sup>C; sebanyak 35 siklus, kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 10 menit pada suhu 72<sup>0</sup>C. Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1.2%.

#### **Sequencing nukleotida**

*Sequencing* gen 16 S-rRNA dilakukan di Laboratorium R&D Centre, PT Charoen Pokphan Indonesia, Tbk; dianalisis menggunakan BioEdit Sequence Alignment 7.0 c 1997-2004 Tom Hall Isis Pharmaceuticals Inc. Analisis filogeni

dengan program MEGA versi 3.1 (Kumar *et al.*, 2001) dengan metode *bootstrapped neighbor-joining* 1000 kali pengulangan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri Metanogenik

Fermentasi dilakukan tanggal 12/10/2004 dan gas mulai terjadi pada hari kedua. Nyala api terjadi hari kedelapan pada Sampel I, II, dan III; Sampel IV pada hari ketiga belas; Sample V pada hari kesepuluh. Sampel I nyala apinya stabil, dan volume gasnya mencapai puncak pada hari keenam belas selanjutnya menurun; Sampel II volume dan nyala apinya tidak stabil, paling banyak dicapai pada hari kedua puluh. Sampel III di semua hari pengukuran menimbulkan nyala api dan volume gasnya mencapai puncak pada hari ketujuh belas, selanjutnya menurun. Sampel IV nyala apinya tidak stabil dan volume gas mencapai puncak pada hari keenam belas. Sampel V nyala api dan volume gas tidak stabil, tertinggi pada hari kedua puluh. Hasil dari Hansen (2001) mengenai dekomposisi bahan organik yang berasal dari kotoran ternak mulai menghasilkan biogas setelah fermentasi berlangsung selama sepuluh hari dan sering terjadi lebih lambat lagi sampai hari kelima belas. Dari lima sampel yang dipakai pada penelitian ini, dua sumber isolat menimbulkan nyala api yang konsisten, yaitu dari Rasi (I) dan Amurang (III), sekaligus memperlihatkan pola yang hampir sama, sedangkan dari Koka (II), Lola (IV), dan Bogor (V) kurang produktif dan turun naik atau tidak stabil, seperti pada Tabel 1.

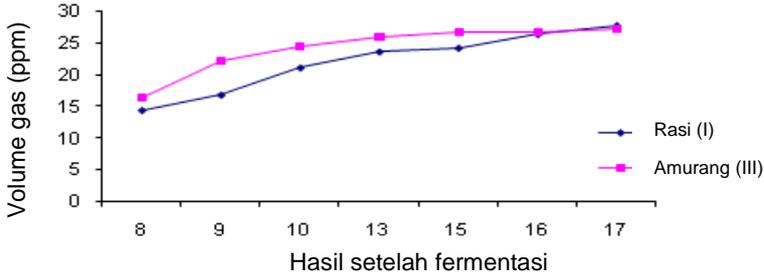
Tabel 1. Hasil fermentasi pertama berdasarkan tinggi gas dalam tabung  $\phi$  6 cm

| Asal Limbah   | Hari setelah fermentasi dengan hasil berupa tinggi gas (cm) |         |         |         |         |         |         |        |         |
|---------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|
|               | 8   | 9       | 10      | 13      | 15      | 16      | 17      | 18     | 21      |
| Rasi (I)      | 3 (+)   | 4.5 (+) | 6 (+)   | 5.5 (+) | 5.5 (+) | 12.5(+) | 14 (+)  | 4 (+)  | 4 (+)   |
| Koka (II)     | 3.5 (+)   | 1 (-)   | 0.5 (-) | 2. (+)  | 3.5 (+) | 0.5 (-) | 3 (+)   | 3 (+)  | 6 (+)   |
| Amurang (III) | 5 (+)   | 5.5 (+) | 5 (+)   | 2.5 (+) | 6.5 (+) | 8 (+)   | 7.5 (+) | 10 (+) | 5.5 (+) |
| Lola (IV)     | 0.5 (-)   | 1.5 (-) | 0.5 (-) | 6.5 (+) | 7 (+)   | 7 (+)   | 12 (+)  | 2 (-)  | 3 (+)   |
| Bogor (V)     | 2 (-)   | 0.5 (-) | 3 (+)   | 2 (+)   | 2 (+)   | 0.5 (-) | 1 (-)   | 1 (-)  | 6 (+)   |
| Kontrol (K)   | 0   | 0       | 0       | 2 (-)   | 2 (-)   | 2 (-)   | 0       | 0      | 0       |

Keterangan: (-) tidak menimbulkan nyala api; (+) menimbulkan nyala api

Dari sampel yang menghasilkan gas dan menimbulkan nyala api yang stabil, yaitu I dan III, kemudian direfermentasi dan diisolasi lebih lanjut. Hasil analisis gas metan dengan kromatografi gas pada Sampel I dan III memperlihatkan volume gas yang meningkat, yaitu untuk Sampel I dari 14.38 sampai 27.77 ppm dan Sampel III dari 16.37 sampai 27.18 ppm dengan pola peningkatan yang hampir sama, seperti terlihat dalam Gambar 1.

Volume gas metan (ppm) pada Sampel I dan III pada tiap hari pengukuran dibandingkan dengan volume gas keseluruhan yang dikonversi ke dalam ml, juga memperlihatkan pola yang sama pada kedua sampel.



Gambar 1. Hasil analisis gas metan dengan kromotograf gram fermentasi pertama

Hasil refermentasi untuk menguji konsistensi pertumbuhan bakteri diperlihatkan dalam Tabel 2. Fermentasi dimulai tanggal 6/11/2004 sore, gas terbentuk pada hari kedua, tetapi nyala apinya mulai terjadi pada hari kedelapan sesudah adanya gas.

Tabel 2. Hasil refermentasi Media I dan III berdasarkan tinggi gas dalam paralon  $\phi$  6 cm

| Asal Media    | Hari setelah fermentasi dengan hasil berupa tinggi gas (cm) |         |       |       |          |        |
|---------------|---|---------|-------|-------|----------|--------|
|               | 2   | 3       | 4     | 9     | 11       | 13     |
| Rasi (I)      | 14 (-)  | 4.5 (-) | 2 (-) | 2 (+) | 12 (+)   | 12 (+) |
| Amurang (III) | 14 (-)  | 0.5 (-) | 2 (-) | 3 (+) | 12.5 (+) | 9 (+)  |

Keterangan: (-) belum menimbulkan nyala api; (+) menimbulkan nyala api

Hasil fermentasi ini dibandingkan dengan fermentasi pertama memperlihatkan proses yang sama, yaitu hari terjadinya gas yang dapat menyala pada hari ke 8-9 (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil analisis gas metan dengan kromatogram gas refermentasi

| Asal Media    | Hari setelah fermentasi dengan hasil berupa volume gas (ppm) |       |       |
|---------------|--|-------|-------|
|               | 9  | 11    | 13    |
| Rasi (I)      | 30.05  | 36.07 | 38.01 |
| Amurang (III) | 30.02  | 33.09 | 37.09 |

Hasil pengukuran volume gas metan dengan KG pada Media I dan III memperlihatkan peningkatan. Hal ini menandakan bahwa di dalam media sedang berlangsung proses metabolisme yang meningkat pula.

Isolasi bakteri metanogenik pada Media I dan III dilakukan pada saat produksi gas yang mengandung metan meningkat, selanjutnya ditanam dalam media Ros Bengal dan diinkubasi dalam suasana anaerob. Sampel hasil inkubasi dan karakterisasi bakteri metanogenik dalam media Ros Bengal ditunjukkan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil isolasi bakteri metan dari Media I

| Konsentrasi | Jumlah koloni                   | Bentuk koloni | Warna koloni             | Jenis koloni |
|-------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|--------------|
| $10^{-1}$   | > 50                            | Bulat         | Abu-abu, putih dan merah | 3 (X)        |
| $10^{-2}$   | > 50                            | Bulat         | Putih, merah             | 2            |
| $10^{-3}$   | 11 merah<br>12 putih            | Bulat         | Putih, merah             | 2            |
| $10^{-4}$   | 4 merah<br>10 putih             | Bulat         | Putih, merah             | 2            |
| $10^{-5}$   | 3 merah<br>6 putih<br>3 abu-abu | Bulat         | Putih, merah dan abu-abu | 3 (X)        |

Keterangan: (X) terkontaminasi

Hasil inkubasi memperlihatkan koloni warna merah tumbuh di bagian bawah berbentuk bulat; koloni putih di tengah agak ke permukaan berbentuk bulat; koloni abu-abu di permukaan media; koloni yang tidak berbentuk diduga kapang sebagai kontaminan. Secara umum aktivitas bakteri metanogenik berlangsung di bagian bawah wadah penampung bahan organik dari fermentor (Buren, 1979). Demikian juga yang terjadi di alam seperti di tanah sawah memperlihatkan pola yang sama (Neue dan Roger, 1993).

Isolat murni berasal dari Media I diencerkan menjadi  $10^{-3}$ , sedangkan pada Media III diencerkan menjadi  $10^{-4}$  konsentrasinya. Sampel hasil inkubasi Media I memperlihatkan bahwa baik sumber isolat warna putih (P) maupun merah (M) tetap menghasilkan tiga jenis koloni merah, putih, dan abu-abu seperti disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil isolasi/pemurnian bakteri putih (P) dari Media I konsentrasi  $10^{-4}$

| Perlakuan anaerob | Jumlah koloni | Bentuk koloni | Warna koloni             | Jenis koloni | Keterangan     |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------------|--------------|----------------|
| Digores           | 26            | Bulat         | Putih, abu-abu           | 2            | Terkontaminasi |
|                   | 25            | Bulat         | Putih                    | 1            | Murni          |
| Dituang           | 6             | Bulat         | Putih, merah             | 2            | Murni          |
|                   | 35            | Bulat         | Abu-abu, putih dan merah | 3            | Terkontaminasi |

Hasil pemurnian dalam Tabel 5 memperlihatkan bahwa baik perlakuan digores maupun dituang menghasilkan pemisahan koloni yang baik, demikian juga keberadaan koloni dalam media khususnya perlakuan dituang. Warna merah berada di bagian bawah, putih di bagian tengah, dan abu-abu di permukaan media yang diduga sebagai kapang kontaminan. Hasil pemurnian dengan pemisahan telah mendapatkan dua koloni murni, yaitu koloni merah (M) dan putih (P).

### Karakterisasi Isolat Bakteri Metanogenik

Karakterisasi bakteri merah (M) dan putih (P) mempunyai ciri-ciri morfologis berbentuk batang, dapat tumbuh pada suhu sedang (mesofil). Berdasarkan uji reaksi fisiologis, bakteri ini dapat memproduksi enzim katalase, dapat mereduksi nitrat, berperan dalam fermentasi gula, dan dapat menghidrolisis gelatin, casein, dan pati serta mampu hidup pada pH antara 5.7 sampai 8.8.

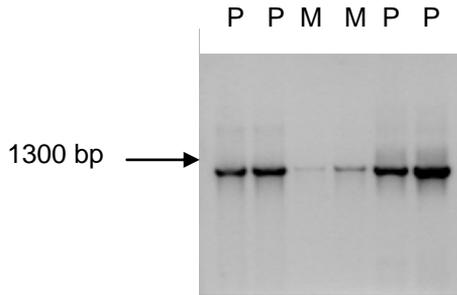
Berdasarkan ciri-ciri di atas, bakteri ini termasuk dalam grup yang mempunyai endospora, gram positif, berbentuk batang dan bulat. Termasuk dalam grup ini, antara lain, genus *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Sulfobacillus*, dan *Syntrophospora* (Holt *et al.*, 1989). Bakteri metanogenik yang mempunyai kesamaan ciri-ciri seperti di atas, digambarkan dalam Tabel 6, yaitu gram positif, suhu pertumbuhan optimum antara 35-45<sup>0</sup>C, pH 5-7, mempunyai endospora dan dapat tumbuh baik dalam asetat, adalah bakteri dari genus *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, dan *Methanospaera* (Holt *et al.*, 1989). Jika kedua grup ciri-ciri di atas digabungkan, kemungkinan besar isolat P dan M masuk genus *Bacillus*.

Tabel 6. Karakterisasi isolat bakteri metanogenik

| No  | Parameter uji                           | Koloni merah   | Koloni putih   |
|-----|---|----------------|----------------|
| 1.  | <i>Gram stain</i>                       | G+ Batang      | G+ Batang      |
| 2.  | Pertumbuhan pada suhu 37 <sup>0</sup> C | +              | +              |
| 3.  | Pertumbuhan pada suhu 42 <sup>0</sup> C | +              | +              |
| 4.  | Pertumbuhan pada suhu 50 <sup>0</sup> C | -              | -              |
| 5.  | Pertumbuhan pada media NaCl 5%          | Dubius (+ / -) | Dubius (+ / -) |
| 6.  | Pertumbuhan pada media NaCl 10%         | -              | -              |
| 7.  | Pertumbuhan pada Mac Conkey             | -              | -              |
| 8.  | Produksi katalase                       | +              | +              |
| 9.  | Pemanfaatan sitrat                      | +              | +              |
| 10. | <i>MR Test</i>                          | -              | -              |
| 11. | <i>VP Test</i> pH lebih kecil 6         | +              | +              |
|     | <i>VP Test</i> pH lebih besar 7         | -              | -              |
| 12. | Produksi indole                         | -              | -              |
| 13. | Reduksi nitrat                          | Dubius (+ / -) | Dubius (+ / -) |
| 14. | Fermentasi gula: Glukosa                | +              | +              |
| 15. | Arabinosa                               | +              | +              |
| 16. | Mannitol                                | (+)            | D+             |
| 17. | Xylosa                                  | (+)            | D+             |
| 18. | Hidrolisis gelatin                      | Dubius (+ / -) | Dubius (+ / -) |
| 19. | Hidrolisis casein                       | Dubius (+ / -) | Dubius (+ / -) |
| 20. | Hidrolisis pati                         | +              | +              |
| 21. | Nutrien Broth pH 6.8                    | +              | +              |
| 22. | Nutrien Broth pH 5.7                    | +              | +              |

### Identifikasi Isolat Bakteri Metanogenik

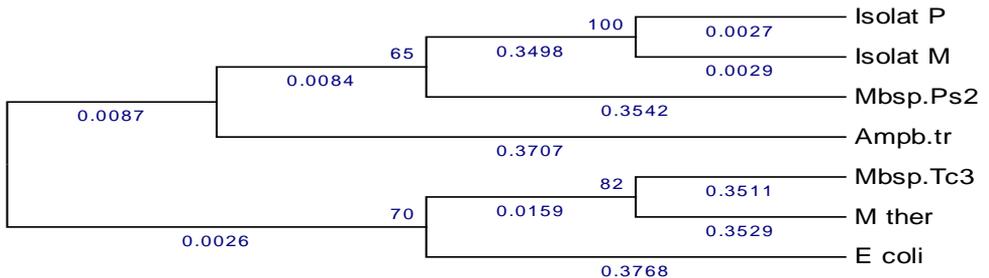
Hasil isolasi DNA dari isolat P dengan konsentrasi 61 ng/ul dapat diamplifikasi menggunakan primer spesifik untuk gen 16S rRNA dan menghasilkan fragmen 1300 bp. Setelah *di-sequencing*, diperoleh basa-basa yang dapat dibaca dengan jelas, yaitu sebesar 1088 bp. Dari jumlah tersebut diperoleh nukleotida G 31.25%, C 20.58%, A 27.11%, dan T 21.32%. Hasil isolasi isolat M dengan konsentrasi 51 ng/ul dapat diamplifikasi menggunakan primer spesifik untuk gen 16S rRNA menghasilkan fragmen 1300 bp. Setelah *di-sequencing*, didapat basa-basa yang dapat dibaca dengan jelas sebesar 1088 bp. Dari jumlah tersebut diperoleh nukleotida G 31.34%, C 20.31%, A 27.02%, dan T 21.32%. Gambar 2 menyajikan hasil elektroforesis tersebut.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA isolat P dan M

Hasil analisis *sequencing* 16S rRNA isolat P mempunyai kemiripan yang sangat dekat (99%) dari nukleotida yang *overlapped* dengan gen 16S rRNA *Clostridium tyrobutyricum*; demikian pula dengan isolat M gen 16S rRNA mempunyai kesamaan 100% dengan gen 16S rRNA *Clostridium tyrobutyricum*.

Selama ini *Clostridium tyrobutyricum* bukan bakteri metanogenik, tetapi hasil penelitian memperlihatkan adanya evolusi karena dari fermentasi dalam air kelapa dapat menghasilkan gas metan. Hasil pensejajaran sequen basa-basa nukleotida (1088 bp) pada gen 16S rRNA digambarkan dalam filogram di bawah ini (Gambar 3).



Keterangan: Mbsp.Ps2 = *Methanobacterium sp. Ps21.*: Acc. AB181817 (Deevong *et al.*, 2004),  
 Ampb.tr = *Amphibacillus tropicus*. Acc.: AF418602 (Zhilina *et al.* 2001),  
 Mbsp.Tc3 = *Methanobacterium sp.Tc3*. Acc.: AB181819 (Deevong *et al.*, 2004),  
 M ther = *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Acc.: X68717 (Nolling *et al.* 1993),  
 E coli = *Escherichia coli*. Acc.: AM157425 (Martin *et al.*, 2005)

Gambar 3. Filogram berdasarkan metode *neibor-joining* dengan nilai *bootstrap* 1000x dan jarak genetiknya berdasarkan “*p distance*”

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa isolat P dan M lebih dekat kepada *Methanobacterium sp.Ps2* yang merupakan bakteri metanogenik yang berasal dari saluran pencernaan rayap, tetapi berbeda cukup jauh dengan *Methanobacterium sp.Tc3* yang juga diisolasi dari pencernaan rayap (*termite*). Isolat P dan M masih dalam satu kelompok dengan *Amphibacillus tropicus* yang merupakan bakteri genus *Bacillus*, tetapi bukan metanogenik, sedangkan dengan

*Methanothermobacter thermoautotrophicus* cukup jauh yang merupakan bakteri metanogenik termofilik, demikian juga dengan *E.coli* yang berasal dari kultivasi air susu ibu.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

- (1) Isolat yang menghasilkan gas metan terbanyak berasal dari dua sumber, yaitu dari Rasi dan Amurang dan didapat dua jenis bakteri metanogenik berwarna koloni putih (P) dan merah (M).
- (2) Karakterisasi dengan metode Bergey's menunjukkan bahwa kedua isolat P dan M termasuk genus *Baccillus*.
- (3) Berdasarkan identifikasi dengan 16S rRNA, isolat P hampir sama (99%) dengan *Clostridium tyrobutyricum*, sedangkan isolat M sama (100%) dengan *Clostridium tyrobutyricum*.
- (4) Isolat yang dihasilkan, terutama isolat putih, berpotensi untuk memproduksi gas metan, terutama dari limbah air kelapa atau bahan lain.

### Saran

- (1) Perlu penelitian lanjutan isolat yang diperoleh apakah DNA kromosomnya mengandung gen penyandi gas metan seperti enzim mcrA.
- (2) Perlu penelitian lanjutan apakah isolat yang diperoleh mempunyai plasmid dan plasmidnya mengandung gen mcrA.

## DAFTAR PUSTAKA

- BPS. 2001. *Sulawesi Utara dalam Angka*. Badan Pusat Statistik Sulawesi Utara.
- Buren, v.A. 1979 (ed). *A Chinese Biogas Manual. Popularising Technology in the countryside*. Sichuan Province, Peoples' Republic of China.
- Deevong, P., Hattori, S., Yamada, A., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., Noparatnaraporn, N., and Kudo, T. Isolation and detection of Methanogens from the gut of higher termites.
- EREC Briefs. 2002. Methane (Biogas) from Anaerobic Digesters. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. US Department of Energy. [www.eren.doe.gov/consumerinfo/refbriefs/ab5.html](http://www.eren.doe.gov/consumerinfo/refbriefs/ab5.html) (8/26/2002).
- Galand, P.E. 2002. Uncultured methanogenic archaeon partial mcrA gene for methyl coenzyme M reductase sub unit A, clone FenB-MCR. [www.query.fegi.cmd](http://www.query.fegi.cmd) (10/29/2002).
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins A Wolters Company.

- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. 2001. Molecular evolutionary genetics analysis version 3.1. Pennsylvania State Univ.: Inst of Molecular Evolutionary Genetics.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen population. *Landfill Microbiology* 148: 3521 – 3530.
- Martin, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jimenez, E., Fernandez, L., Smidt, H., and Rodrigues, J. 2005. Cultivation-independent assessment of bacterial diversity of breast milk of healthy women. [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) (12/7/2005).
- Mimura, A. 2000. Recent advances on the microbial degrading biomass for useful compound production. Yamanashi University. Dept. of Applied Chemistry and Biotechnology.
- Neue, H.U. and Roger, P.A. Rice agriculture: factors controlling emission. pp 254-298. In MAK Khalil (ed). Atmospheric Metanae: Sources, Sink and Role in Global Change. NATO ASI Series I. Global Enviromental Change Vol. 13. Berlin: Springer-Verlag.
- Nolling, J., Hahd, D., Ludwig, W., and de Vos, M.M. 1993. Phylogenetic analysis of thermophilic *Methanobacterium* spec.: evidence for a formate-utilizing ancestor. [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) (9/26/2005).
- Rumokoy, M.M.M. 1990. Pembuatan protein sel tunggal dari air kelapa. *Buletin Balitka* No. 11.
- Warsito. 2000. Mencari sumber energi alternatif masa depan. Dari petani menjadi raja minyak. [www.berita.iptek.com](http://www.berita.iptek.com) /messages/artikel (11/20/2002).
- White, D. 2000. *The Physiology and Biochemistry of Procaryotes*. Second Ed. Oxford: Oxford University Press.
- Zhilina, T.N., Gernova, E.S., Tourova, T.P., Kostrikina, N.A., and Zavarzin, G.A. 2001. *Amphibacillus tropicus* sp. New acaliphilic and facultatively anaerobic saccharolytic Bacilli from the lake Magadi. [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) (12/8/2005).