

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI METANOGEN PADA SUBSTRAT LUMPUR MUARA SUNGAI TUADALE KECAMATAN KUPANG BARAT

Djeffry Amalo, Maria T.L. Ruma, Amor T. Karyawati, Rony S. Mauboy, Refli, Nofyta S. Serang

Program Studi Biologi FST Undana

ABSTRAK

Bakteri metanogen adalah mikroorganisme yang dapat menghasilkan metana (CH_4) dalam keadaan tanpa oksigen (anaerob), bakteri ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi alternatif untuk pembuatan biogas. Penelitian ini bertujuan mengetahui isolat bakteri metanogen yang terdapat pada substrat lumpur muara Sungai Tuadale dan mengetahui karakteristik isolat metanogen yang terdapat pada substrat lumpur muara Sungai Tuadale. Pengambilan sampel berasal dari muara sungai Tuadale Kecamatan Kupang Barat. Penelitian menggunakan metode teknik isolasi anaerobik menggunakan media Tryptic Soy Agar (TSA), pengamatan morfologi, pewarnaan gram, uji motil, uji indol dan uji MR-VP. Hasil yang diperoleh pada substrat lumpur A tidak terdapat bakteri metanogen dan pada substrat lumpur B terdapat bakteri metanogen.

Kata kunci: Metanogen, Isolasi, Lumpur, Tuadale

Biogas merupakan hasil campuran gas-gas yang sebagian besar berupa CH₄ (metana) dan CO₂ (karbondioksida) atau melalui hasil fermentasi dari bahan organik dalam kondisi tanpa oksigen (anaerob) oleh bakteri metanogen. Komposisi gas yang paling utama dalam biogas adalah CH₄ (metana). Gas metana adalah gas yang tidak berwarna, tidak berbau dan mudah terbakar sehingga dapat dijadikan sumber energi pengganti bahan bakar, mengurangi polusi bau yang tak sedap, sebagai pupuk. Metana dihasilkan ketika jenis-jenis mikroorganisme anaerob yaitu menguraikan bahan-bahan organik pada kondisi anaerob (tanpa oksigen) oleh archae metanogenik (Pramono, *dkk.*, 2018; Aji, *dkk.*, 2019; Riyawan, *dkk.*, 2019).

Bakteri metanogen adalah bakteri penghasil gas metana (CH₄) dalam proses metabolismenya. Gas ini juga dihasilkan secara alami pada saat pembusukan biomasa di rawa-rawa sehingga disebut gas rawa. Metanogen secara alami dapat hidup di rawa-rawa, lumpur, kolam, dan juga pada saluran pencernaan hewan. Emisi metan yang berasal dari lahan basah dan sawah sebesar 43% dari jumlah tersebut, masing-masing 20% berasal dari sawah dan rawa (Syauqi, 2017; Pratama, *dkk.*, 2019; Nahdhliya, *dkk.*, 2020).

Muara sungai Tuadale merupakan salah satu muara yang berada di Desa Lifuleo, Kecamatan Kupang Barat dimana air muara tersebut dimanfaatkan sebagai tempat pemeliharaan ikan bandeng. Sebagian besar muara sungai didominasi oleh substrat berlumpur. Lumpur mempunyai kemampuan untuk menyimpan bahan organik lebih besar

karena pada substrat lumpur memiliki pori-pori yang lebih rapat sehingga bahan organik lebih mudah mengendap (Laumalay, 2013; Taqwa, *dkk.*, 2014).

Di muara sungai Tuadale terdapat tempat pemeliharaan ikan bandeng, hal ini dapat menyebabkan pencemaran limbah organik dari air limbah tambak ikan yang dialirkan langsung ke muara sungai karena diperkirakan dapat menyumbang fosfat kedalam air. Selain itu pencemaran organik juga berasal dari limbah sampah karena pada lokasi pengambilan sampel merupakan objek pariwisata, hal ini akan berdampak pada mikroorganisme yang berada di muara sungai dan juga dapat mengganggu kesehatan. Bakteri metanogen yang terdapat pada substrat lumpur memiliki manfaat bagi manusia maupun lingkungan, keberadaan metanogen memiliki peran sebagai pengurai limbah bahan-bahan organik dalam kondisi anaerob. Kondisi anaerob akan menunjang mikroorganisme anaerob untuk mengkonversi bahan organik menjadi asam organik, kemudian diubah lagi menjadi metana dengan produk samping karbondioksida (CO₂) (Laumalay, 2013; Herawan & Rengganis., 2016).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri metanogen dapat menghasilkan gas metana (CH₄) untuk dimanfaatkan sebagai sumber energi alternatif. Penelitian yang dilakukan oleh Nahdhliya, *dkk.* (2020) memperoleh bakteri metanogenik dengan ciri morfologi koloni coccus berwarna putih susu dan putih bening. Morfologi sel koloni putih bening memiliki bentuk sel basil (batang halus) dan untuk koloni putih bening memiliki bentuk sel basil (batang bergerigi).

Keduanya termasuk kategori gram negatif dan dalam proses metabolisme bakteri metanogenik terbentuk secara asam.

Eksplorasi tentang bakteri metanogen yang dapat menghasilkan gas CH₄ (metan) sebagai komponen utama biogas untuk pengganti bahan bakar terus dilakukan termasuk bakteri metanogen yang terdapat di sedimen. Namun pengetahuan mengenai bakteri metanogen yang terdapat di substrat lumpur terkhususnya di muara sungai Danau Tuadale Kecamatan Kupang Barat belum di kaji.

MATERI DAN METODE

Penelitian terkait isolasi dan karakterisasi bakteri metanogen dari sampel lumpur, diambil dengan teknik purposive sampling kemudian dilakukan penelitian. Tempat penelitian dilakukan di UPTD Laboratorium Kesehatan Provinsi NTT. Isolat bakteri metanogen yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan diidentifikasi sesuai dengan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 1994). Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk gambar, tabel atau grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Metanogen pada substrat lumpur

Hasil isolasi terhadap bakteri yang ditemukan pada sampel substrat lumpur muara sungai Tuadale diperoleh 6 isolat bakteri, yang dilihat dari koloni bakteri yang tumbuh pada medium. Ada dua sampel substrat lumpur yang dilakukan pengujian, yakni substrat lumpur A dan substrat lumpur B.

Susbrat lumpur yang diperoleh dilakukan isolasi bakteri metanogen dan diinkubasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Isolat dengan media TSA

Dari gambar 1 terlihat isolat bakteri telah tumbuh pada media TSA. Hal ini dapat dilihat secara makroskopis isolat mempunyai ciri-ciri; koloni tumbuh seperti bintik-bintik oval, adapula yang melebar dan menyebar disekeliling medium, tepinya rata dan tidak rata, ada koloni yang rata dengan permukaan medium adapula yang timbul diatas permukaan medium, warna koloni bakteri putih dan kekuningan.

Karakterisasi bakteri metanogen

1. Pengamatan Morfologi Koloni



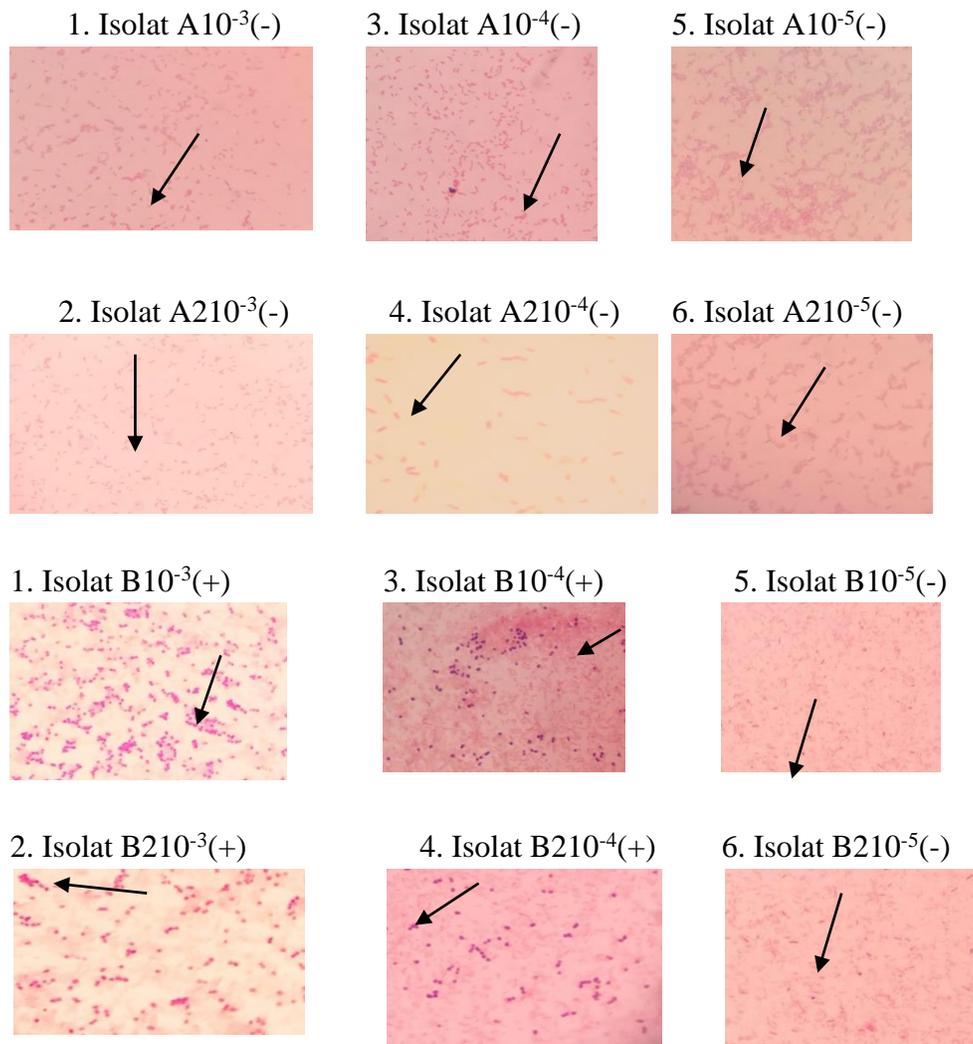
Gambar 2. Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri

Pada hasil pengamatan morfologi koloni pada gambar 4 substrat lumpur A dan substrat lumpur B ditemukan isolat bakteri yang mempunyai karakteristik bentuk tak beraturan, menyebar dan bulat. Tepi koloni ada yang beraturan, bergerigi, berombak dan berlekuk. Memiliki elevasi datar dan timbul. Pigmentasinya bermacam-macam ada yang berwarna putih bening, putih susu dan kuning.

2. Pewarnaan Gram

Pengamatan selanjutnya, yaitu pengamatan morfologi sel dari isolat yang telah ditemukan. Isolat bakteri A10⁻³, A120⁻³, A10⁻⁴, A210⁻⁴, A10⁻⁵, A210⁻⁵, B10⁻³, B210⁻³, B10⁻⁴, B210⁻⁴, B10⁻⁵, B210⁻⁵ yang ditemukan kemudian diwarnai dengan pewarnaan gram untuk mengetahui gram dari bakteri tersebut.

Pewarnaan gram isolat bakteri diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Pewarnaan gram isolat bakteri diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Hasil pengamatan morfologi sel pada isolat bakteri substrat lumpur A dan B dapat dilihat pada gambar 3 adalah sebagai berikut.



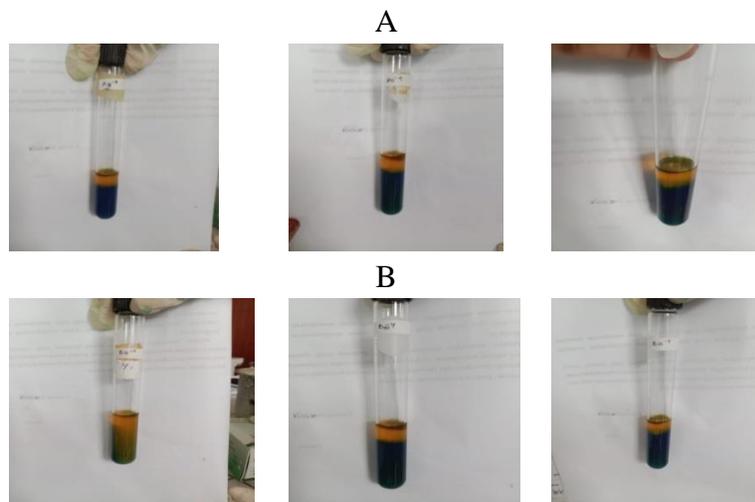
Gambar 3. Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Metanogen Perbesaran 1000x Gram Positif (+) Dan Gram Negative (-)

Berdasarkan hasil pewarnaan gram substrat lumpur A dan B pada gambar 5 isolat bakteri yang diisolasi dari kedua substrat lumpur digolongkan kedalam bakteri gram negatif dan gram positif. Hasil pewarnaan didukung oleh Nahdhliya *dkk.*, (2020) yang menyatakan bahwa bakteri gram negatif akan menghasilkan wana merah, sedangkan bakteri gram positif akan terlihat warna ungu.

3. Uji Indol dan Uji Motil

Hasil uji indol menunjukkan bahwa semua isolat bakteri dari substrat lumpur A dan B negatif terhadap uji indol. Pada media tidak terbentuk cincin berwarna merah tetapi terbentuk cincin berwarna hijau (negatif).

Hal ini berarti bahwa semua isolat bakteri tidak mempunyai enzim triptofanase sehingga tidak terjadi katabolisme triptofan. Menurut Nonci *dkk.*, (2015) menyatakan bakteri yang memiliki enzim triptofanase akan menghidrolisis asam amino triptofan yang memiliki gugus samping indol, sehingga indol akan bereaksi dengan reagen kovacs dan akan menghasilkan senyawa para aminobenzaldehid yang tidak larut dalam air dan membentuk warna merah pada permukaan medium. Sedangkan jika hasil negatif menandakan bahwa bakteri tidak dapat membentuk indol dari asam amino triptofan sebagai sumber energi seperti gambar 4 dibawah ini.



Gambar 4. Uji motil dan uji indol

Pengujian motilitas bertujuan untuk mengetahui pergerakan bakteri uji di sekitar tusukan. Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan diperoleh 6 isolat dari substrat lumpur A. Diperoleh 2 isolat yang positif terhadap uji motilitas yakni, A10⁻⁵, A210⁻⁵ ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang meluas pada daerah tusukan. Sedangkan 4 isolat yakni A10⁻³, A210⁻³, A10⁻⁴, A210⁻⁴ negatif terhadap uji motilitas..

Untuk 6 isolat bakteri dari substrat lumpur B dengan kode isolat B10⁻³, B210⁻³, B10⁻⁵, B210⁻⁵ negatif terhadap uji motilitas dan isolat B10⁻⁴, B210⁻⁴ positif terhadap uji motilitas. Hasil penelitian ini sesuai dengan Nonci *dkk.*, (2015) menyatakan bahwa adanya pertumbuhan menyebar disekitar daerah tusukan menandakan bahwa bakteri tersebut bersifat motil, sedangkan jika pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis dan tidak bergerak menandakan bahwa negatif (non motil).

4. Uji Methil Red-Voges Preskauer (MR-VP)

Pengujian menggunakan media methil red-voges preskauer (MR-VP) bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri metanogen mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam sebagai produk akhir.

Hasil uji MR-VP dapat dilihat pada gambar 5 dan gambar 6. Berdasarkan hasil uji metil red-voges preskauer (MR-VP) pada gambar 5 setelah ditambahkan metil merah pada media MR-VP diperoleh media berwarna kuning hal ini menunjukkan bahwa isolat dari substrat lumpur A tidak dapat mengoksidasi glukosa yang berarti menunjukkan hasil negatif. Hal ini berarti bahwa isolat bakteri pada substrat lumpur A bersifat autotrof (mampu membuat makanannya sendiri).

Berdasarkan hasil uji metil red-voges preskauer (MR-VP) pada gambar 5 setelah ditambahkan metil merah pada media MR-VP diperoleh media berwarna kuning hal ini menunjukkan bahwa isolat dari substrat lumpur A tidak dapat mengoksidasi glukosa yang berarti menunjukkan hasil negatif. Hal ini berarti bahwa isolat bakteri pada substrat lumpur A bersifat autotrof (mampu membuat makanannya sendiri).

A



Gambar 5. Hasil Uji MR-VP (-) pada substrat lumpur A

B



Gambar 6. Hasil Uji MR-VP (+) pada substrat lumpur B

Hasil pengamatan dari uji methyl red-voges preskauer (MR-VP) terhadap substrat lumpur B setelah ditambahkan methyl merah pada media MR-VP diperoleh hasil positif. Penambahan methyl merah pada akhir pengamatan bertujuan untuk menghasilkan asam organik. Hal ini terjadi karena beberapa bakteri dapat memfermentasikan glukosa sehingga akan menurunkan pH media pertumbuhannya menjadi 5,0 atau lebih rendah. Perubahan glukosa diikuti dengan terjadinya perubahan warna merah pada media MR-VP. Berdasarkan hasil uji MR-VP Isolat bakteri pada substrat lumpur B bersifat heterotrof (tidak dapat membuat makanan sendiri). Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Nahdhliya *dkk.*, (2020) menyatakan bahwa methyl merah adalah indikator yang berubah menjadi merah dalam larutan asam, bila warna

merah tidak hilang, maka hal ini menunjukkan adanya proses fisiologi secara asam oleh bakteri.

Berdasarkan hasil uji MR-VP menunjukkan bahwa isolat bakteri metanogen tidak terdapat pada substrat lumpur A, tetapi terdapat di substrat lumpur B. Hal ini dikarenakan pada substrat lumpur A ciri-ciri lumpur memiliki tekstur lengket menyatu dengan butiran pasir yang kasar dan tidak terdapat bahan organik. Sedangkan pada substrat lumpur B terdapat isolat bakteri metanogen karena substrat lumpur tersebut terdapat bahan organik sehingga mendukung adanya isolat bakteri metanogen.

Identifikasi Bakteri

Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi, pewarnaan gram, uji motil dan uji indol serta uji MR-VP, isolat yang berpotensi sebagai bakteri metanogen

berasal dari substrat lumpur B. Pada hasil penelitian ini diperoleh 6 isolat bakteri kemudian diidentifikasi menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* tahun 1994. Berikut isolat bakteri yang ditemukan di substrat lumpur muara sungai Tuadale adalah:

1. Genus *Methanosarcina*, Isolat B10⁻³ dan isolat B210⁻³ mempunyai kemiripan dengan genus *Methanosarcina* dimana B10⁻³ memiliki ciri-ciri morfologi yaitu bentuk koloni tak beraturan, menyebar, tepian koloni tak beraturan, elevasi datar, warna koloni putih susu dan kuning. Isolat B210⁻³ bentuk koloni tak beraturan, bulat, tepian koloni tak beraturan, bulat, elevasi datar, timbul, warna koloni putih susu dan kuning. Morfologi sel bulat (*coccus*) gram positif. Uji motil negatif, uji indol negatif, uji MR-VP positif.
 2. Genus *Methanococcus*, Isolat B10⁻⁴ dan isolat B210⁻⁴ mempunyai kemiripan dengan genus *Methanococcus*. Isolat B10⁻⁴ memiliki ciri-ciri morfologi dengan bentuk tidak beraturan, bulat, tepian koloni tak beraturan, elevasi datar, warna koloni putih susu dan kuning. Sedangkan Isolat B210⁻⁴ bentuk koloni tak beraturan, bulat, tepian koloni tak beraturan, bulat, elevasi datar, timbul, warna putih bening dan kuning. Morfologi sel bulat (*coccus*) tidak beraturan, gram positif. Hasil uji motil positif, uji indol negatif dan uji MR-VP positif.
- Genus *Methanobacterium*, Isolat B10⁻⁵ dan isolat B210⁻⁵ mempunyai kemiripan dengan genus *Methanobacterium* dimana isolat B10⁻⁵ memiliki ciri-ciri morfologi dengan bentuk tak beraturan, menyebar, tepi koloni tak beraturan,

elevasi datar, timbul, warna koloni putih bening, kuning. Morfologi sel batang (*basil*), gram negatif. Untuk isolat B210⁻⁵ ciri-ciri morfologi bentuk tak beraturan, menyebar, tepi koloni tak beraturan, elevasi datar, warna putih susu dan kuning. Morfologi sel batang (*basil*), gram negatif. Hasil uji motil negatif, uji indol negatif dan uji MR-VP positif.

PENUTUP

Simpulan

1. Diperoleh 6 isolat bakteri metanogen pada substrat lumpur B yakni isolat bakteri B10⁻³, B210⁻³, B10⁻⁴, B210⁻⁴, B10⁻⁵ dan B210⁻⁵ sedangkan pada substrat lumpur A tidak diperoleh isolat bakteri metanogen.
2. Karakteristik isolat bakteri metanogen yang terdapat pada substrat lumpur muara sungai Tuadale memiliki ciri-ciri morfologi (a) B10⁻³, B210⁻³ bentuk *coccus* (bulat), warna koloni putih susu dan kuning, gram positif, bersifat non motil, uji indol negatif, uji MR-VP positif, (b) B10⁻⁴, B210⁻⁴ bentuk *coccus* (bulat) tidak beraturan, warna koloni putih bening dan kuning, bersifat motil, uji indol negatif, uji MR-VP positif dan (c) B10⁻⁵ dan B210⁻⁵ bentuk *basil* (batang), warna koloni putih susu dan kuning, bersifat non motil, uji indol negatif, uji MR-VP positif

Saran

1. Mengkaji karakteristik lumpur yang sesuai sebagai syarat hidup bakteri metanogen
2. Menggunakan media yang berbeda untuk isolasi bakteri metanogen

DAFTAR PUSTAKA

- Aji, K. P., Bambang, A. Z. 2019. Konversi Energi Biogas Menjadi Energi Listrik Sebagai Alternatif Energi Terbarukan Dan Ramah Lingkungan Di DesLangse, kecamatan Margorejo Kabupaten Pati. *Seminar Nasional Teknologi Industri, Lingkungan Dan Infrastruktur*. 2:2622-2744
- Herawan, W., & Rengganis, H. 2016. Sebaran C-Organik Sebagai Sumber Emisi Metana Di Waduk Wonogiri. *Jurnal Teknik Hidraulik*. 7(1); 1-16
- Laumalay, H.M. 2013. Perilaku Menghisap dara an. Barbirostris Di Lokasi Tambak Ikan Bandeng Dan Kampung Salupu Desa Tuadale Kabupaten Kupang Tahun 2010. *Jurnal Ekologi Kesehatan Indonesia*. Vol 12. No.1
- Nahdhliya, B.L. , Syauqi. A., Zayadi. H. 2020 . Isolasi, Keanekaragaman Koloni dan Karakterisasi Bakteri Metanogenik pada Sedimen Kolam Ikan Lele (*Clarias* sp.). *Jurnal Ilmiah Biologi*. 6 (1); 1-9
- Nonci, M., Baharuddin., Rasyid, B., Pirman. 2015. Seleksi Bakteri Methanotrof (Perduksi Emisi Gas Metan Di Lahan Sawah) Berdasarkan Aktifitas Enzim Methan Monooksigenase. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 3 (2); 86-91
- Riyawan, A., Pudyastuti, P.S. 2019. Pemanfaatan Biogas Dari Limbah Mck Umum Di Pasar Prabumulih. *Tesis*. Program Studi Teknik Sipil Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Taqwa, N.R., Muskananfolo, M.R. Ruswahyuni. 2014. Studi Hubungan Substrat Dasar Dan Kandungan Bahan Organik Dalam Sedimen Dengan Kelimpahan Hewan Makrobentos Di Muara Sungai Sayung Kabupaten Demak. *Jurnal Manajemen Sumber Daya Perairan*. Vol. 3. No. 1