

**Karakterisasi Dan Identifikasi Bakteri Metanogenik Yang Terlibat Dalam Biodegradasi Limbah Cair Tahu**

Ika Oksi Susilawati, Oedjijono, Sri Lestari
Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman
Purwokerto

ABSTRACT

Tofu industrial wastewaters contain organic materials that cause environment pollution. In alternative of handling and utility of the waste is as substrates of biogas production. The process of biogas production pass through four stages, are hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis carried out consortium of bacteria. Methanogenesis occurs under anaerobic condition. The objective of this research are to know genera of methanogenic bacteria in the biodegradation process of tofu wastewater and to know genera of methanogenic bacteria dominated biodegradation process of tofu wastewater in the biogas production in Kalisari village, Cilongok, Banyumas. The sludge was sampled from outlet pipe to trickling filter (A) and liquid waste was sampled from recycle pipe (B). Characters of methanogenic bacteria observed were colony morphology, cell morphology, biochemical, and physiological tests. Identification of the isolates referred to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Based on characterization and identification found 6 genera of methanogenic bacteria i.e. Methanothermus, Methanosphaera, Methanospirillum, Methanococcoides, Methanomicrobium, and Methanococcus. The genera dominated in biodegradation process of tofu wastewater were Methanococcus and Methanothermus.

Keywords: biodegradation, methanogenic bacteria, and tofu wastewater

PENDAHULUAN

Produksi tahu di Indonesia setiap tahun meningkat $\pm 22\%$ (Potter *et al.*, 1994), peningkatan tersebut juga terjadi pada industri tahu di Kabupaten Banyumas. Menurut Dewanto *et al.* (2009), jumlah industri tahu skala kecil-menengah di Kabupaten Banyumas mencapai 24 unit yang tersebar di 17 kecamatan. Produksi tahu di samping memberikan nilai ekonomi tinggi, tetapi menghasilkan dua macam limbah yang merugikan lingkungan, yaitu limbah cair dan limbah padat. Raliby *et al.* (2009) melaporkan bahwa limbah padat banyak dimanfaatkan sebagai pakan ternak dan tempe gembus, tetapi limbah cair belum dimanfaatkan sama sekali atau langsung dibuang begitu saja ke perairan. Hal ini mengakibatkan perairan menjadi tercemar, begitu pula dengan simpanan air tanah yang ditandai oleh kotornya air sumur dan timbulnya bau menyengat.

Pencemaran limbah cair tahu dapat diatasi melalui proses biodegradasi yang dapat menurunkan kadar BOD dan CODnya, sehingga limbah mempunyai nilai ekonomi dan tidak mencemari lingkungan. Darmono (2001) menyatakan bahwa limbah cair tahu merupakan salah satu jenis limbah organik. Alam *et al.* (2007) menyatakan limbah-limbah organik dengan kandungan BOD dan COD tinggi dapat difermentasi menghasilkan biogas. Hal ini berarti bahwa limbah cair tahu dapat difermentasi menjadi biogas, sehingga dapat dimanfaatkan secara langsung oleh produsen tahu untuk mengurangi biaya produksi.

Proses pembentukan biogas dapat melalui empat tahap, yaitu tahap hidrolisis, tahap asidogenesis (pengasaman), tahap asetogenesis, dan tahap metanogenesis (pembentukan gas metan). Setiap tahap pembentukan biogas melibatkan peran bakteri. Bakteri yang berperan dalam tahap hidrolisis limbah tahu adalah *Acid forming bacteria*, sedangkan bakteri yang berperan dalam tahap asidogenik dan asetogenik adalah *Acetogenic bacteria* (Sufyandi, 2001). Banyak bakteri yang berperan dalam pembentukan biogas, khususnya gas metan. Bakteri tersebut termasuk kelompok bakteri metanogenik yang sangat beragam jenisnya dan dapat diisolasi serta dikarakterisasi morfologi dan sifat-sifatnya. Identifikasi bakteri metanogenik dilakukan untuk mengetahui jenis-jenis yang mampu membentuk gas metan, dimana gas metan ini termasuk komponen penyusun biogas yang berfungsi sebagai energi terbarukan. Menurut Kristoferson dan Bokalders (1991), satu meter kubik biogas yang mengandung gas metan setara dengan 0,7 kg minyak tanah, dapat menjalankan satu motor tenaga kuda



selama dua jam, dapat menghidupkan bohlam 60-100 watt selama enam jam dan dapat menghasilkan 1,25 kwh listrik.

Berdasarkan permasalahan yang ada, telah dilakukan penelitian dengan tujuan:

1. Mengetahui genera bakteri metanogenik yang terdapat dalam proses biodegradasi limbah cair tahu menjadi biogas di instalasi biogas desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas.
2. Mengetahui genera bakteri metanogenik yang dominan dalam proses biodegradasi limbah cair tahu menjadi biogas di instalasi biogas desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas.

Bakteri metanogenik dapat diperoleh dari rawa, lumpur sungai, sumber air panas (*hot spring*), dan perut hewan herbivora seperti domba (Meynell, 1976). Bakteri metanogenik memiliki morfologi dan karakteristik yang berbeda-beda tergantung dari habitat hidupnya dan kondisi lingkungan. Genera bakteri metanogenik yang terdapat pada lumpur diantaranya *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanobacterium* strain M.o.H., dan *Methanobacterium formicicum* (Edwards dan McBride, 1975). Genera bakteri metanogenik yang banyak ditemukan pada digester anaerob adalah *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanotrix*, *Methanoculleus*, dan *Methanobrevibacter* (Holt et al., 1994). Malakahmad (2009) melaporkan bahwa genera bakteri metanogenik yang ditemukan pada sampah rumah tangga antara lain *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* dan *Methanotrix*. Wright et al. (2008) melaporkan bahwa genera bakteri metanogenik yang dominan terdapat pada rumen domba dan lembu di Venezuela adalah *Methanobrevibacter*.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

A. Materi, Lokasi dan Waktu Penelitian

A.1. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plastik; akuades; alkohol 70%; *aluminium foil*; *wrapper*; kasa; kapas; karet; KH_2PO_4 ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; NH_4Cl ; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; asam nitrilotriacetic; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 ; CaCl_2 ; H_3BO_3 ; sodium molybdate; sodium format; vitamin B; asam asetat; asam format; sistein; *yeast extract*; metanol; cairan rumen; larutan resazurin 0,2%; agar; akuades; reagen anaerogen; *Sulphide Indole Motility Agar* (SIMA), NaCl 0,1 M; 0,3 M; 0,6 M; dan MnSO_4 .

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, *beaker glass* 250 ml dan 1000 ml (IWAKI Pyrex[®], Japan), gelas ukur (IWAKI Pyrex[®], Japan), jarum inokulasi, mikroskop binokuler (CH20 Olympus, Japan), labu Erlenmeyer ukuran 50 ml, 250 ml (Schott Duran, Germany), dan 500 ml (IWAKI Pyrex[®], Japan), *filler*, *drugalsky*, batang pengaduk, pipet seukuran volume 1 ml dan 10 ml (IWAKI Pyrex[®], Japan), *anaerobic jar*, *hot plate* (IKA Laboratory), *stirrer bar*, gelas ukur, tabung reaksi (IWAKI Pyrex[®], Japan), *rubber bulb*, cawan petri (IWAKI Pyrex[®], Japan), rak tabung reaksi, timbangan analitik tipe EO 2140 (Ohaus Co., USA) dengan ketelitian 0,0001, *autoclave* model HL36AE (Hirayama Manufacturing Corporation, Japan), pembakar spiritus, inkubator (Jeio-Tech IB-600 M), oven, pH meter digital (ketelitian 0,1), *colony counter*, kulkas standar (National[®] model B22AF), kompor gas (Rinnai), dan kamera digital.

A.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto dan instalasi biogas di Desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas selama 11 bulan dari Bulan Mei 2010 hingga Bulan April 2011.



Metode Penelitian

B.1. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode survey. Isolasi bakteri metanogenik dilakukan dari substrat proses biodegradasi limbah cair tahu yang berada di bagian dasar digester. Karakterisasi yang diamati mencakup pengamatan morfologi, uji biokimiawi, dan uji fisiologi.

B.2. Cara Kerja

1. Sterilisasi Alat (Hadioetomo, 1994)

Alat yang digunakan pada isolasi bakteri disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. Pembuatan Media Basal untuk pertumbuhan Bakteri Metanogenik (Zeikus, 1977)

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri metan merupakan media selektif dengan komposisi NH_4Cl 0,9 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,45 g; KH_2PO_4 0,75 g; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; asam nitritotriacetic 4,5 g; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,17 g; ZnCl_2 0,1 g; CaCl_2 0,02 g; H_3BO_3 0,019 g; sodium molybdate 0,01 g; sodium format 2,5 g; vitamin B 5 ml; larutan resazurin 0,2% 1 ml; agar 15 g; dan akuades 1000 ml. Bahan-bahan tersebut selain agar dilarutkan ke dalam 500 ml akuades kemudian dipanaskan dan dihomogenkan. Agar dilarutkan ke dalam akuades sisanya sebanyak 500 ml, kemudian dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *hot plate* dan *stirrer*. Kedua larutan dicampur dan dihomogenkan. Media diukur pH sebesar $7,4 \pm 0,1$ dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

3. Isolasi dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri Metanogenik (Lay, 1994)

Isolasi bakteri metanogenik diambil dari dua saluran yang berbeda yaitu saluran *outlet* menuju *trickling filter* dan pipa *recycle* dari hasil biodegradasi limbah cair tahu menjadi gas metan. Masing-masing sampel diambil sebanyak 1 ml dan dibuat pengenceran berseri tiga kali (10^{-3}) dengan akuades steril. Dari dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml dan *diplating* duplo secara *spread plate* pada media *Ros Bengal* (Kapahang et al., 2007), diinkubasi pada suhu 37°C selama 5x24 jam di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen. Bakteri yang tumbuh selanjutnya dipindahkan pada media basal anaerob dengan metode *streak* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5x24 jam di dalam *anaerobic jar* dengan reagen anaerogen. Koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

4. Pemurnian Bakteri Metanogenik dengan Metode Streak Kuadran (Zeikus, 1977)

Pemurnian bakteri metanogenik dilakukan dengan cara membagi media basal anaerob menjadi empat zona. Satu koloni yang tampak sebagai satu tipe sel dan tumbuh pada permukaan media diambil dengan menggunakan jarum ose. Bakteri yang telah menempel pada jarum ose digoreskan ke zona pertama pada permukaan media basal anaerob. Goresan ini dianggap sebagai goresan primer pada permukaan media. Bagian ujung hasil goresan pada zona pertama diambil dengan jarum ose yang telah dibakar, kemudian digoreskan melewati goresan primer dan dilanjutkan goresan sekunder pada zona kedua tanpa kembali ke goresan primer. Proses tersebut dilakukan sampai pada zona keempat. Cawan diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37°C selama 5 x 24 jam.

5. Pengamatan Morfologi Koloni (Hadioetomo, 1994)

Pengamatan morfologi dilakukan pada koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian dengan cara mengamati bentuk, ukuran, permukaan, tepi, warna, dan elevasi koloni.

a. Pembuatan stokkultur Bakteri Metanogenik

Koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian dengan metode streak kuadran ditanam pada media basal anaerob tabung miring kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37°C selama 5 x 24 jam.



b. Pengamatan Morfologi Sel (Lay, 1994)

Pengamatan morfologi sel dilakukan menggunakan pewarnaan Gram. Satu koloni bakteri stok diulaskan pada *object glass* kemudian difiksasi. Preparat ulasan ditetesi larutan Gram A (*crystal violet*), didiamkan selama 60 detik, dicuci dan dikeringanginkan. Preparat ulasan kemudian ditetesi dengan larutan Gram B (*Iugol's iodine*) didiamkan selama 60 detik, dicuci dan dikeringanginkan. Preparat ulasan dicuci dengan larutan Gram C (ethanol 96%) Preparat ulasan ditetesi larutan Gram D (safranin), didiamkan selama 45 detik, kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Sel yang telah terwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop, sel bakteri Gram positif akan terwarnai ungu, sedangkan sel bakteri Gram negatif akan terwarnai merah.

c. Pewarnaan Endospora (Lay, 1994)

Satu jarum ose isolat bakteri dari stok dioleskan pada *object glass* dan diratakan. Ulasan tersebut ditutup dengan kertas merang berukuran 2x2 cm dan ditetesi pewarna *malachite green*, selanjutnya sediaan dipanaskan pada penangas air yang telah mendidih selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan akuades mengalir hingga warna hijau hilang. Sediaan dikeringanginkan dan ditetesi dengan pewarna safranin selama 1 menit. Sediaan dicuci dengan akuades mengalir hingga warna merah hilang. Sediaan dikeringanginkan dan diamati di bawah mikroskop. Endospora yang terbentuk berwarna hijau dan sel terwarnai merah.

d. Uji Motilitas (Lay, 1994)

Satu jarum ose isolat bakteri stok diambil dan ditanam padamedia SIMA (*Sulphide Indole Motility Agar*) tegak dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Bakteri motil ditandai dengan adanya pertumbuhan seperti serabut menyebar dari daerah tusukan pada bagian bawah media, sedangkan bakteri yang tidak motil pertumbuhannya hanya pada bagian yang ditusuk saja.

e. Uji Toleransi Suhu (Holt et al., 1994)

Satu jarum ose isolat bakteri stok ditanam pada media basal anaerob cair di lima tabung reaksi, kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37°C, 45 °C, 50 °C, 80 °C, 85 °C, dan 90 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

f. Uji Toleransi pH (Holt et al., 1994)

Satu jarum ose isolat stok bakteri ditanam pada media basal anaerob cair dengan pH 6,5; 7,5 dan 8,5 dan diinkubasi di dalam *anaerobic jar* pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

6. Uji Blokomiawi dan Fisiologi

a. Uji Ketahanan terhadap NaCl (Holt et al., 1994)

Isolat bakteri stok diambil satu jarum ose dan ditanam pada media basal anaerob cair yang ditambah NaCl dengan konsentrasi 0,1 M; 0,3M; dan 0,6 M, kemudiandiinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

b. Uji Penggunaan Asam Format (Edwards and McBride, 1975)

Isolat bakteri stok diambil satu jarum ose dan ditanam pada media basal anaerob cair yang ditambah asam format sebanyak 10% dari media, kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.



c. Uji Penggunaan Metanol (Edwards and McBride, 1975)

Isolat bakteri stok diambil satu jarum ose dan ditanam pada media basal anaerob cair yang ditambah metanol sebanyak 10% dari media kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

d. Uji Penggunaan Mineral sebagai Faktor Pertumbuhan (Godsy, 1980)

Isolat bakteri stok diambil satu jarum ose dan ditanam pada media basal anaerob cair yang ditambahkan dengan asam asetat, vitamin B, sistein, *yeast extract*, dan cairan rumen yang masing-masing sebanyak 10% dari media, kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* yang diberi reagen anaerogen pada suhu 37 °C selama 5x24 jam. Pertumbuhan bakteri pada media tersebut ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

7. Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Medium (Hadioetomo, 1994)

Derajat keasaman (pH) medium diukur dengan pH meter digital (Hanna Instruments). Derajat keasaman (pH) dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4 dan 7. Lalu elektroda pH meter dicelupkan ke dalam medium selama 10 menit atau sampai pH meter menunjukkan angka yang konstan, nilai pH yang tercantum pada pH meter merupakan nilai pH medium yang diukur.

B. Metode Analisis

Penentuan genera bakteri metanogenik didasarkan pada hasil pengamatan morfologi, uji biokimiawi, dan uji fisiologi. Identifikasi mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel lumpur diambil dari pipa outlet menuju *trickling filter* (A) dan sampel cair diambil dari pipa *recycle* (B) hasil degradasi limbah cair tahu menjadi gas metan pada digester biogas di Desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas. Berdasarkan hasil isolasi, diperoleh 9 isolat bakteri yang diduga sebagai bakteri metanogenik, yang 4 isolat berasal dari pipa outlet menuju *trickling filter* (A) yaitu: AM1, AM2, AM3, AM4 dan 5 isolat berasal dari pipa *recycle* (B): BM1, BM2, BM3, BM4, dan BM5. Hasil karakterisasi dan identifikasi yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* terhadap isolat tersebut diperoleh 6 genera, yaitu: *Methanothermus* (AM1 dan BM1), *Methanosphaera* (AM2 dan BM2), *Methanospirillum* (AM3 dan BM3), *Methanococcoides* (AM4), *Methanomicrobium* (BM4), dan *Methanococcus* (BM5).

Tabel 3.1. Kepadatan koloni bakteri metanogenik

Nama Genera	Kepadatan koloni (CFU's/ml)
<i>Methanothermus</i> sp. AM1	10×10^2
<i>Methanosphaera</i> sp. AM2	10×10^2
<i>Methanospirillum</i> sp. AM3	10×10^2
<i>Methanococcoides</i> sp. AM4	7×10^2
<i>Methanothermus</i> sp. BM1	50×10^2
<i>Methanosphaera</i> sp. BM2	15×10^2
<i>Methanospirillum</i> sp. BM3	15×10^2
<i>Methanomicrobium</i> sp. BM4	10×10^2
<i>Methanococcus</i> sp. BM5	55×10^2

Tabel 3.1. menunjukkan bahwa genera bakteri metanogenik yang mendominasi dalam proses biodegradasi limbah cair tahu menjadi gas metan adalah *Methanococcus* dan *Methanothermus*. Sebaliknya, kepadatan bakteri metanogenik lainnya sangat sedikit. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kedua genera tersebut diduga paling berperan dalam proses biodegradasi limbah cair tahu menjadi gas metan dibandingkan dengan genera bakteri lainnya. Galand (2002) menyatakan bahwa bakteri



metanogenik merupakan salah satu bakteri yang sulit untuk dikembangkan, karena sebagian besar tidak dapat dikultur (*uncultured*) sehingga memerlukan penanganan khusus.

Bakteri metanogenik secara filogenetik termasuk dalam archaea yang bersifat anaerob obligat (Kim dan Gadd, 2008). Energi metabolismenya berasal dari CO_2 dan H_2 , asam format, metanol, methylamine dan atau asam asetat (Thauer *et al.*, 2008). Ketersediaan bahan-bahan ataupun asam-asam organik sangat menentukan pembentukan gas metan. Prekursor pembentukan gas metan adalah asam format, asam asetat, dan $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, dimana bahan-bahan tersebut dapat secara langsung dikatabolisme oleh bakteri metanogenik. Selama proses metabolisme gula dan asam-asam amino, produksi asam asetat lebih menguntungkan untuk pertumbuhan bakteri metanogenik pada proses metanogenesis. Hal ini dikarenakan banyak dihasilkan energi ATP dari acetyl-CoA yang berasal dari oksidasi asam piruvat. Pembentukan asam asetat akan menuntut sel untuk melakukan mekanisme alternatif dalam melakukan reoksidasi NADH selama fermentasi. Kebanyakan bakteri fermentasi termasuk bakteri metanogenik memiliki enzim NADH hidrogenase dan piruvat dehidrogenase. Enzim-enzim tersebut dapat bekerja pada konsentrasi H_2 dan asam format yang tinggi untuk melakukan oksidasi NADH (Whitman *et al.*, 2006).

Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa bakteri *Methanococcus* mampu tumbuh pada rentang suhu $35^\circ\text{C} - 91^\circ\text{C}$ dan pH 6 - 9. Hal ini sesuai dengan pH yang ada di dalam digester yaitu 7, sehingga dapat mendukung proses pertumbuhan bakteri tersebut. Kim dan Gadd (2008) menambahkan bahwa ketersediaan $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ dan asam format dapat digunakan sebagai donor elektron bagi genus *Methanococcus*.

Genus *Methanococcus* yang ditemukan pada penelitian merupakan bakteri motil yang ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri ke samping seperti adanya serabut pada media SIMA. Hasil pengujian juga menunjukkan adanya warna hitam pada media SIMA. Warna hitam tersebut merupakan hasil samping dari metabolisme bakteri yang berupa gas hydrogen sulfida (H_2S). Gerardi (2003) menyatakan bahwa gas tersebut merupakan hasil reaksi antara asam asetat dengan sulfat (SO_4^{2-}) yang terkandung di dalam media SIMA. Bakteri akan mereduksi sulfat menjadi H_2S . Whitman *et al.* (2006) menyatakan bahwa genera *Methanococcus* mampu menggunakan H_2S dan sulfur sebagai sumber sulfur untuk pertumbuhannya. Warna hitam di seluruh media tersebut juga mengindikasikan motilitas atau pergerakan bakteri pada media.

Prescott *et al.* (2002) menyatakan bahwa bakteri yang motil akan lebih dominan pada suatu habitat atau sistem dibanding bakteri yang non motil, karena motilitas menunjukkan adanya kemampuan bakteri dalam bergerak dan berpindah tempat. Hal tersebut berarti bahwa bakteri motil lebih aktif bergerak dalam mendekati sumber nutrisi. Menurut Bitton (2005), motilitas merupakan kemampuan bakteri dalam merespon adanya oksigen dalam suatu media atau sistem. Bakteri anaerob akan menjauhi keberadaan oksigen, karena oksigen bersifat toksik bagi bakteri anaerob obligat.

Methanococcus hanya didapatkan dari sampel saluran outlet menuju *trickling filter*, pipa tersebut merupakan saluran pengeluaran lumpur hasil degradasi limbah cair tahu yang terletak pada bagian bawah digester. Hal ini berarti bahwa kondisi di bagian bawah digester adalah anaerob. Gerardi (2003) menyatakan bahwa biodegradasi limbah cair tahu akan menghasilkan lumpur sebagai hasil samping. Lumpur tersebut berada pada bagian bawah digester, karena memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan cairan hasil biodegradasi. Lumpur juga mengandung bahan-bahan organik seperti karbohidrat, lemak, dan protein yang dipecah menjadi monomer-monomernya pada proses hidrolisis, kemudian dipecah menjadi asam-asam organik pada proses asidogenik dan asetonik. Asam-asam organik tersebut akan digunakan oleh bakteri metanogenik sebagai substrat pembentukan gas metan. Oleh karena itu, ketersediaan nutrisi untuk pertumbuhannya tercukupi.

Leigh *et al.* (2009) menyatakan bahwa *Methanococcus* memiliki koenzim F_{420} dan M. Koenzim F_{420} dapat dihasilkan dari oksidasi asam format pada proses metanogenesis. Whitman *et al.* (2006) menyatakan bahwa koenzim-koenzim tersebut berfungsi sebagai *biomarker* pada proses biosintesis gas metan. Koenzim F_{420} berperan dalam reaksi transfer elektron pada tahap metanogenesis. Koenzim tersebut berpasangan dengan enzim hidrogenase, piruvat dehidrogenase, karbon monoksida dehidrogenase, NADP^+ reduktase, piruvat sintase, dan α -ketoglutarat sintase. Koenzim M berfungsi sebagai pembawa karbon ujung dari senyawa asam 2-mercaptoethanesulfonic pada proses metanogenesis, dimana metil koenzim M akan direduksi menjadi gas metan.

Genus *Methanothermus* yang ditemukan termasuk bakteri Gram positif dengan sel berbentuk batang (*basil*), motil, tidak memiliki endospora, mampu tumbuh pada media yang diperkaya dengan



sistein, metanol, asam format, dan cairan rumen. Bakteri tersebut juga mampu tumbuh pada pH 6,5 dan 7,5 serta suhu 80 °C, 85 °C, dan 90 °C. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa *Methanothermus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang agak melengkung dengan lebar sel antara 0,3 – 0,4 µm dan panjangnya 1-3 µm, kadang membentuk rantai. Dinding sel bakteri tersebut mengandung pseudomurein, dan memiliki flagella sebagai alat geraknya. Suhu optimum untuk pertumbuhannya berkisar antara 83 °C – 88 °C dan pH 6,5.

Kim dan Gadd (2008) menyatakan bahwa genus *Methanothermus* mampu menggunakan asam asetat sebagai sumber karbon dalam pertumbuhannya dan menggunakan H₂ + CO₂ sebagai donor elektron pada proses metabolisme. Energi metabolismenya diperoleh dari konversi H₂ + CO₂ menjadi gas metan. Ammonia dapat digunakan sebagai sumber nitrogen dan sulfat sebagai sumber sulfur untuk pertumbuhannya.

Genera bakteri *Methanosphaera* yang berhasil ditemukan pada penelitian termasuk bakteri Gram positif berbentuk bulat, non motil, mampu tumbuh pada suhu 37 °C dan 45 °C, pH 6,5 dan 7,5. Berdasarkan uji biokimia, bakteri tersebut dapat tumbuh pada media yang diperkaya dengan yeast extract, metanol, vitamin B, dan NaCl 0,1 M; 0,3 M; dan 0,6 M. Akan tetapi, bakteri tersebut tidak dapat tumbuh pada media yang diperkaya dengan asam format, sistein, asam asetat dan cairan rumen. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa asam asetat, CO₂, isoleusin, dan thiamin merupakan bahan organik yang dimanfaatkan sebagai faktor pertumbuhannya. Ammonia dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nitrogen dan sulfid sebagai sumber sulfur.

Menurut Kim dan Gadd (2008), *Methanosphaera* memanfaatkan metanol sebagai substrat pertumbuhannya dengan asektor elektronnya berupa CO₂. Energi metabolismenya diperoleh dari reduksi metanol menjadi gas metan dengan H₂ sebagai donor elektron. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genera *Methanosphaera* mampu tumbuh pada media basal anaerob yang diperkaya dengan metanol.

Karakteristik *Methanococcoides* yang ditemukan pada penelitian telah sesuai dengan pernyataan Holt *et al.* (1994) bahwa *Methanococcoides* termasuk bakteri Gram negatif dengan sel berbentuk bulat, non motil, dan tidak memiliki endospora. Endospora berfungsi sebagai alat perlindungan diri pada kondisi yang tidak memungkinkan untuk pertumbuhannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Methanococcoides* mampu tumbuh pada suhu 37 °C - 50 °C serta pH 7,5. Hal ini berbeda dengan pernyataan Holt *et al.* (1994) bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan *Methanococcoides* berkisar antara 30 – 35 °C dan pH 7 – 7,5.

Uji biokimia yang dilakukan menunjukkan bahwa *Methanococcoides* mampu tumbuh pada media basal anaerob yang diperkaya dengan sistein, yeast extract, cairan rumen, metanol, vitamin B, dan NaCl 0,1 M serta 0,3 M. Bakteri ini tidak mampu tumbuh pada media yang diperkaya dengan asam format dan asam asetat. Kim dan Gadd (2008) menyatakan bahwa genus *Methanococcoides* termasuk dalam ordo *Methanosarcinales* yang bersifat halofil dengan konsentrasi NaCl berkisar antara 0,2 – 0,6 M dan konsentrasi Mg²⁺ antara 25 – 200 mM. Konsentrasi NaCl yang melebihi konsentrasi optimum untuk pertumbuhannya dapat menyebabkan sel bakteri mengalami lisis. Metanol dan methylamine yang terdapat di dalam media digunakan sebagai donor elektron untuk pertumbuhannya. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa energi metabolisme bakteri *Methanococcoides* berasal dari dismutasi methylamine menjadi gas metan.

Genus *Methanomicrobium* bersifat Gram negatif, bentuk sel batang, motil, dan menghasilkan warna hitam pada media. Kim dan Gadd (2008) menyatakan bahwa Genus *Methanomicrobium* termasuk dalam ordo *Methanomicrobiales* dengan sel berbentuk batang agak melengkung, diameter 0,7 µm dan panjangnya 1,5 – 2 µm. Hasil uji biokimia dan fisiologi, bakteri tersebut mampu tumbuh pada media yang diperkaya dengan asam format, metanol, sistein, cairan rumen, suhu 37 °C, 45 °C, dan 50 °C, pH 6,5 dan 7,5; NaCl 0,1 M; 0,3 M; dan 0,6 M. Sebaliknya, bakteri tidak mampu tumbuh pada media yang diperkaya dengan yeast extract, vitamin B, dan asam asetat. Kim dan Gadd (2008) menyatakan bahwa genus *Methanobacterium* mampu memanfaatkan asam asetat sebagai sumber karbon serta asam format dan H₂ + CO₂ sebagai donor elektron pada proses metabolismenya.

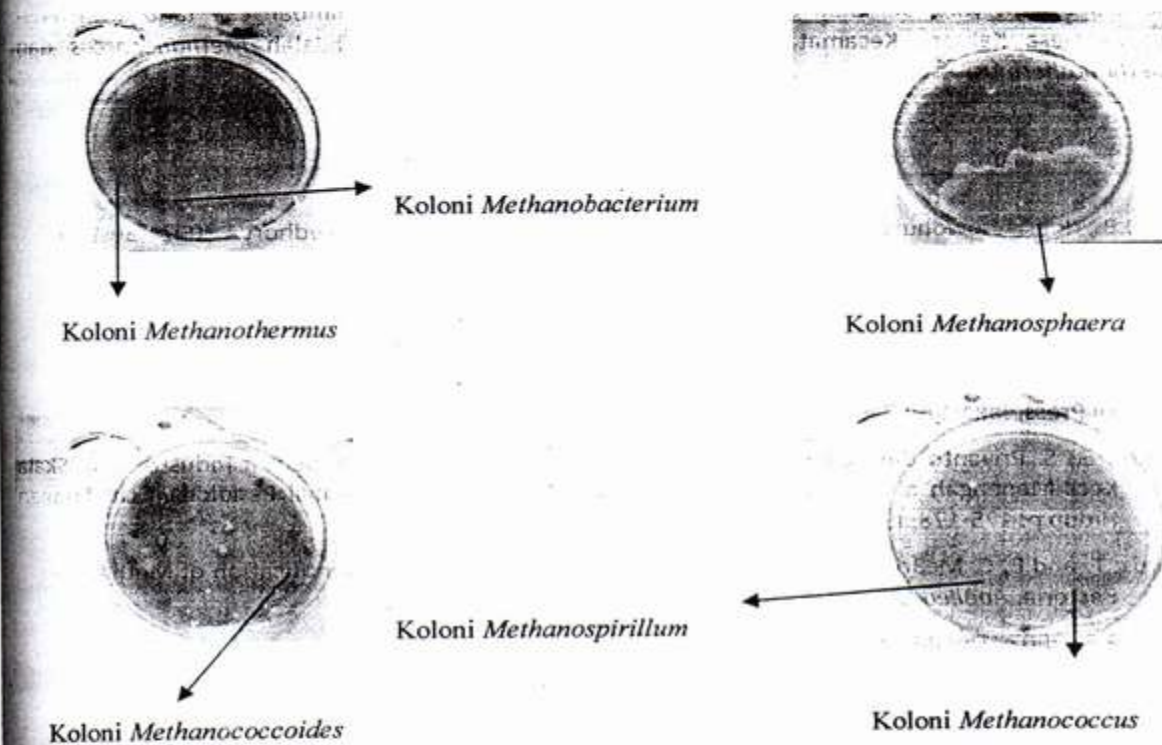
Berdasarkan hasil penelitian, *Methanospirillum* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki bentuk sel batang, motil, dan tidak memiliki endospora. Bakteri tersebut mampu tumbuh pada suhu 37 °C - 45 °C dan pada pH 6,5 - 7,5. Menurut Holt *et al.* (1994), genus *Methanospirillum* bersifat anaerob obligat, sel berbentuk batang dan kadang melengkung, motil dan memiliki filamen spiral. Bakteri tersebut mampu tumbuh pada kisaran suhu antara 35 - 40 °C dan pH 7-7,5. Perbedaan toleransi suhu



dari isolat yang didapat diperkirakan karena kondisi digester yang terbuat dari fiber memungkinkan suhu di dalamnya menjadi semakin panas. Whitman *et al.* (2006) menyatakan bahwa genera *Methanospirillum* memiliki toleransi suhu pertumbuhan hingga suhu 47 °C.

Hasil uji biokimia dan fisiologi menunjukkan bahwa *Methanospirillum* dapat tumbuh pada media basal anaerob yang diperkaya dengan asam format, *yeast extract*, dan vitamin. Zeikus dan Bowen (1975) menyatakan bahwa *Methanospirillum* merupakan salah satu jenis bakteri metanogenik yang unik dan banyak ditemukan pada digester anaerob dengan substrat utamanya adalah asam-asam organik seperti asam format yang akan didekomposisi menjadi gas metan. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa *Methanospirillum* dapat memanfaatkan asam format dan $H_2 + CO_2$ untuk melakukan katabolisme. Akan tetapi, bakteri hasil penelitian Holt *et al.* tidak dapat tumbuh pada media yang diperkaya dengan asam asetat dan cairan rumen.

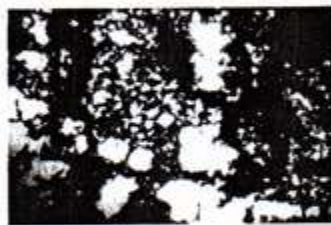
Schauer *et al.* (1982) menyatakan bahwa asam format merupakan salah satu prekursor pembentukan gas metan (CH_4) pada kondisi anaerob. Sebagian besar genera bakteri metanogenik pada kultur murni mampu menggunakan asam format sebagai donor elektron pada proses metanogenesis. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa energi yang didapatkan oleh bakteri tersebut berasal dari konversi $H_2 + CO_2$, asam format, atau beberapa alkohol sekunder yang ditambah CO_2 menjadi gas metan. Asam asetat, *yeast extract* dan vitamin merupakan bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai pemacu pertumbuhan bakteri *Methanospirillum*.



Gambar 1. Kenampakan koloni bakteri metanogenik pada media Ros Bengal



Methanothermus



Methanosphaera



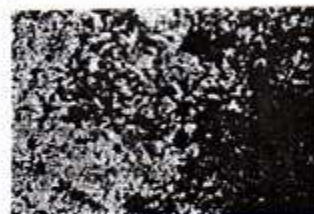
Methanospirillum



Methanococcoides



Methanobacterium



Methanococcus

Gambar 2. Kenampakan bentuk sel bakteri metanogenik

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil simpulan sebagai berikut:

1. Genera bakteri metanogenik yang berhasil ditemukan pada proses biodegradasi limbah cair tahu menjadi di instalasi biogas Desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas yaitu *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanococcoides*, *Methanosphaera*, dan *Methanospirillum*.
2. Genera bakteri yang dominan ditemukan pada proses biodegradasi limbah cair tahu di instalasi biogas Desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas adalah *Methanococcus* dan *Methanothermus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, J.B., R.K. Chowdhury, Z.U. Ahmed, A.S.M. Amin, A.K.M.H.B. Chowdhury. 2007. Sustainable Approach of Solid Waste Management of Small Urban Area : Case for Habibganj Municipality in Bangladesh. *Iran J. Environ. Health. Sci. Eng* 4 (3):181-190.
- Bitton, G. 2005. Wastewater Microbiology 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Darmono. 2001. Lingkungan Hidup dan Pencemaran: Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam. UI Press, Jakarta.
- Dewanto, E., S. Priyanto dan S. Lestari. 2009. Pola Pengelolaan Limbah di Sentra Industri Tahu Skala Kecil-Menengah di Kabupaten Banyumas. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Lingkungan Hidup* p: 175-178. ISBN: 978-609-95283-0-5.
- Edwards, T. and B. C. McBride. 1975. New Method for the Isolation and Identification of Methanogenic Bacteria. *Applied Microbiology* 29 (4): 540-545.
- Galand, P.E. 2002. Uncultured Methanogenic Archaeon Partial MCRA Gene for Methyl Coenzyme M Reductase Sub Unit A, clone FenB MCR. www.guery.fegi.cmd. Diakses pada tanggal 1 Maret 2011.
- Gerardi, M.H. 2003. The Microbiology of Anaerobic Digesters. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Godsy, E. M. 1980. Isolation of *Methanobacterium bryantii* from a Deep Aquifer by Using a Novel Broth-Antibiotic Disk Method. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (5): 1074-1075.
- Hadioetomo, R.S. 1994. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Laboratorium. PT. Gramedia, Jakarta.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Snealth, J.T. Stalev, and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. The Williams & Wilkins Company, USA.

- Shang, A. M. Bintang, M. Hawab, D.O. Sastraatmadja, dan D.D. Solichin. 2007. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Metanogenik Asal Limbah Air Kelapa (*Isolation, Characterization and Identification of Methanogenic Bacteria in the Sewage Coconut Water*). Forum Pascasarjana Vol. 30 No. 1 Januari 2007: 25-35.
- B.H. and G.M. Gadd. 2008. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo.
- roferson, L.A. dan V. Bokalders. 1991. Renewable Energy Technologies-Their Application in Developing Countries. ITDG Publishing.
- B. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Raja Grafindo Press, Jakarta.
- h, J.A., W.B. Whitman, and M. Hackett. 2009. Hydrogenases of *Methanococcus maripaludis*. University of Washington.
- akahmad, A., S.M. Zain, N.E.Ahmad Basri, S.R. Mohamed Kutty, and M.H. Isa. 2009. Identification of Anaerobic Microorganisms for Converting Kitchen Waste to Biogas. World Academy of Science, Engineering and Technology.
- ynell, P. J. 1976. Methane : Planning a Digester. Prism Press, Great Britain.
- ter, C., M. Soeparwadi, dan A. Gani. 1994. Limbah Cair Berbagai Industri di Indonesia (Sumber, Pengendalian dan Baku Mutu). EMDI (Environmental Management Development in Indonesia) – Badan Pengendalian dampak Lingkungan (BAPEDAL), KLH RI. Jakarta.
- scott, L.M., P.H. John, and A.K. Donald. 2002. Microbiology 5th Edition. McGraw-Hill Company, New York.
- iby, O., R. Rusdijati, dan I. Rosyidi. 2009. Pengolahan Limbah Cair Tahu menjadi Biogas sebagai Bahan Bakar Alternatif pada Industri Pengolahan Tahu. Laporan Penelitian. Universitas Sumatera Utara, Sumatera.
- auer, N.L., D.P. Brown, and J.G. Ferry. 1982. Kinetics of Formate Metabolism in *Methanobacterium formicum* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (3): 549-554.
- fyandi, A., 2001, Informasi Teknologi Tepat guna Untuk Pedesaan Biogas, Bandung. Tidak dipublikasikan.
- hauer, R. K., A.K Kaster, H. Seedorf, W. Buckel and R. Hedderich. 2008. Methanogenic Archaea: Ecologically Relevant Differences in Energy Conservation. *Nature Review, Microbiology*. Vol. 6, Macmillan Publishers Limited.
- Whitman, W.B., T.L. Bowen and D.R. Boone. 2006. The Methanogenic Bacteria. *Prokaryote* 3 (3): 165-207.
- Wright, A. D.G., X. Ma, and N.E. Obispo. 2008. *Methanobrevibacter* Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microbe Ecology* 56:390-394.
- Leikus, J.G. and V.G. Bowen. 1975. Fine Structure of *Methanospirillum hungatii*. *Journal Of Bacteriology* 121 (1): 373-380.
- Leikus, J.G. 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41 (2): 514-541.