
SELEKSI BAKTERI METHANOTROF (PEREDUKSI EMISI GAS METAN DI LAHAN SAWAH) BERDASARKAN AKTIVITAS ENZIM METHAN MONOOKSIGENASE

Maimuna Nonci¹, Baharuddin², Burhanuddin Rasyid³, Pirman⁴

¹Ilmu Pertanian, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, email: maimunanonci@yahoo.com

²Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin

³Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin

⁴Teknik Kimia, Politeknik Ujung Pandang

ABSTRAK

Kehadiran bakteri metanotrof pada daerah rhizosfer padi sangat dibutuhkan untuk mereduksi metan yang dihasilkan oleh bakteri metanogen, sehingga tidak terjadi emisi gas metan ke atmosfer. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan koleksi dan seleksi bakteri methanotrof asal rhizosfer tanaman padi yang mampu menghasilkan enzim metan monooksigenase. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada tiga fase pertumbuhan tanaman padi yaitu fase vegetatif, reproduktif dan pematangan. Koleksi isolat dilakukan dengan metode isolasi dan pemurnian. Seleksi isolat dilakukan dengan pengujian reaksi gram, motil, indol, aerob/anaerob dan aktivitas enzim monooksigenase dianalisis dengan metode kolorimetrik. Hasil penelitian diperoleh 52 koleksi isolat bakteri. Berdasarkan reaksi gram terseleksi 22 isolat gram negatif, berdasarkan analisis kolorimetrik diperoleh 10 isolat menghasilkan enzim metan monooksigenase.

Kata Kunci: Emisi, metan, metan monooksigenase.

ABSTRACT

The presence of methanotrof bacteria on rice plan rhizosphere is urgently needed to reduce the methane produced by methanogenic bacteria, so there is no emissions of methane into the atmosphere. This study aims to make the collection and selection methanotrof bacteria from rhizosphere in paddy field that are capable to produce methane monooxygenase. Sediment sample were collected from rhizosphere of rice on three times rice of growth. There were made in the vegetative fase, the reproductive fase and the maturation fase. Isolates collection was done by isolation and purification methode. Selection was done by gram reaction, motile, indole, aerobic / anaerobic test and methan monooxygenase activity was analyzed by colorimetric method. The results were collected 52 isolates bacteria. Based on gram reaction were collected 22 isolates gram-negative group and based on colorimetric analysis were ten isolates produce methane monooxygenase.

Keyword: Emission, methan, methan monooxygenase.

1. PENDAHULUAN

Rizosfer merupakan bagian tanah yang menyelimuti permukaan akar tanaman dan memiliki aktivitas metabolisme tertinggi, bagian tersebut merupakan habitat yang sangat baik bagi pertumbuhan mikroba oleh karena akar tanaman menyediakan berbagai bahan organik yang umumnya menstimulir pertumbuhan mikroba. Akar tanaman dan mikroba berinteraksi dan saling

menstimulasi yang disebabkan oleh eksudat akar (Schröder and Hartmann, 2003). Sedangkan eksudat akar mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme di rhizosfer dan sekitarnya (Schöttelndreier and Falkengren, 1999).

Gas metan (CH₄) adalah salah satu gas rumah kaca (GRK) yang konsentrasinya di atmosfer semakin meningkat setiap tahun, peningkatan

konsentrasi tersebut menyebabkan peningkatan suhu secara global. Gas tersebut terbentuk pada kondisi anaerob di lahan basah termasuk lahan sawah dan ditentukan oleh aktivitas dua bakteri yang berbeda yang hidup di rhizosfer tanaman padi, yaitu bakteri *metanogen* sebagai organisme yang berperan dalam pembentukan metan dan bakteri *metanotrof* yang menggunakan metan sebagai sumber karbonnya.

Kehadiran bakteri *metanotrof* pada daerah rhizosfer tanaman padi sangat dibutuhkan untuk mereduksi metan yang dihasilkan oleh bakteri *metanogen* sebelum lepas ke atmosfer. Penelitian mengenai bakteri *methanotrof* telah banyak dilakukan dan salah satu kharakteistiknya ditemukan bahwa bakteri tersebut memiliki sistem enzim yang spesifik yaitu metan monooksigenase (MMO). Berdasarkan fakta tersebut maka dibutuhkan penelitian untuk memperoleh bakteri tersebut, karena aplikasi bakteri *methanotrof* sebagai agen pereduksi gas metan dapat menjadi salah satu solusi untuk mengurangi emisi gas metan di lahan sawah. Oleh sebab itu maka penelitian ini dilakukan untuk memperoleh isolat bakteri *methanotrof* yang memiliki sistem enzim monooksigenase yang selanjutnya dapat dijadikan sebagai agen hayati dalam mendukung upaya penurunan emisi gas metan melalui teknologi mitigasi di lahan sawah.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Pengambilan Sampel

Sampel sedimen untuk analisis bakteri diperoleh secara acak dari tiga titik pada sawah irigasi di Kecamatan Bajeng Kabupaen Gowa, setiap titik diambil tiga ulangan. Pengambilan sampel dilakukan tiga kali pada periode satu kali musim tanam yaitu pada fase vegetatif (satu minggu setelah pemupukan pertama), fase generatif (45 hari setelah tanam), dan fase reproduktif (menjelang panen). Sampel diambil dengan cara menancapkan spoit 10 ml di zona perakaran tanaman padi (kedalaman ± 3 cm) pada sawah yang tergenang. Setelah

spoit terisi penuh dengan sedimen (lumpur sawah) maka segera ditutup dan dimasukkan ke kantong plastik untuk dibawa ke laboratorium. Analisis bakteri dilakukan di Laboratorium Pusat Kegiatan Penelitian UNHAS.

2.2. Isolasi dan Pemurnian

Isolasi bakteri *methanotrof* diawali dengan membuat seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} setiap sampel dengan dua ulangan. Selanjutnya setiap sampel ditumbuhkan pada media selektif NMS (Hanson and Hanson.1996) yang telah dibuat dan disterilisasi sebelumnya, dengan komposisi : 1,0 g Mg $SO_4 \cdot 7H_2O$; 1,0 g KNO_3 ; 0,717 g $Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 0,272 g KH_2PO_4 ; 0,2 $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 4,0 g NH_4Cl ; 0,5 ml *trace Element Solution* dengan komposisi (per 1 liter aquades): 0,5 gr Na_2EDTA ; 0,2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,03 g H_3BO_3 ; 0,02 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,01 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,0 mg $Mn Cl_2 \cdot 4H_2O$; 3,0 mg $Na_2 MoO_4$; 2,0 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,0 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Selanjutnya diinkubasi selama 10 - 14 hari. Setiap koloni yang tumbuh digores kembali pada media yang sama, hal ini dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh koloni tunggal.

2.3. Seleksi Isolat berdasarkan reaksi gram

Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan pengujian reaksi gram dengan tujuan untuk membedakan bakteri tergolong gram positif atau negatif, dengan cara yaitu koloni bakteri dari biakan murni diambil dengan jarum ose dan dioleskan pada gelas objek yang telah diberi dua tetes larutan KOH 3%, lalu diaduk melingkar selama ± 5 detik, koloni yang nampak berlendir menunjukkan reaksi positif (gram negatif) sebaliknya yang tidak berlendir atau terlepas menunjukkan reaksi negatif (gram positif).

2.4. Seleksi Isolat Berdasarkan Pengujian Aerob/anaerob

Isolat yang tergolong reaksi gram negatif selanjutnya diuji aerob/anaerob dengan menggunakan media OF (Oksidatif Fermentatif) yang sudah disterilisasi, dengan komposisi bahan; 2 g Pepton, 3 gr NaCl, 0,3 g $KH_2 PO_4$, 3 g agar,

0,5 ml larutan glukosa (10%) dan 3 ml (1 %) Bromitol Blue. Selanjutnya inokulasi bakteri dilakukan pada dua tabung reaksi yaitu tabung tertutup dan tabung terbuka dan dinkubasi pada suhu kamar. Perubahan warna yang terjadi pada media OF akan menentukan kategori bakteri tersebut. Apabila terjadi perubahan warna biru menjadi kuning pada tabung tertutup mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob (berarti terjadi fermentasi) begitu sebaliknya.

2.5. Seleksi Isolat berdasarkan pengujian Motil dan Indol

Seleksi pada tahap ini dilakukan dengan menguji setiap isolate dengan cara inokulasi tegak lurus pada media SIM (Sulfida Indol Motility) agar tegak sampai dasar tabung. Komposisi media: 10 g Yeast Ekstract, 10 g Casein Pepton, 6 g Meat Pepton, 0,2 g Ferric Ammonium Sulfate, 0,2 g Sodium Thiosulfate dan 3,7 g Agar, pada PH 7,3. Selanjutnya dilakukan inokulasi dan inkubasi pada suhu 25° C selama 24 jam. Adanya pertumbuhan menyebar disekitar daerah tusukan menandakan bahwa bakteri tersebut bersifat motil. Untuk pengujian indol dilakukan pada media yang sama yang diinkubasi selama 1-2 x 24 jam, selanjutnya inokulan ditetesi reagen Kovac's, jika terbentuk cincin berwarna merah menandakan bakteri tersebut positif terhadap uji indol.

2.6. Seleksi Isolat Berdasarkan Aktivitas MMO

Seleksi pada tahap ini dilakukan dengan metode kolorimetri, yaitu masing-masing isolate ditumbuhkan pada media NMS (Nitrat Mineral Salt) + 1µM CuSO₄. Setelah inkubasi 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 tebalik dan inkubasi selama 15 menit. Kemudian 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 MMO.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan pemurnian sampel sedimen yang diperoleh dari rhizosfer tanaman padi pada tiga fase pertumbuhan berhasil dikoleksi 52 isolat bakteri. Berdasarkan uji gram terseleksi 22 isolat gram negatif (Tabel 1). Bergey dan Holt (1994) dalam *Burgy's Manual of Determinative Bacteriology* menggolongkan bakteri *methanotrof* ke dalam golongan bakteri gram negatif. Selanjutnya Auman dkk. (2001) melaporkan bahwa bakteri *methanotrof* adalah bakteri gram negatif, bersifat aerob dan menggunakan metan sebagai sumber karbon dan energi.

Tabel 1. Hasil pengamatan uji reaksi gram, motil dan indol

No.	Kode Isolat	Reaksi gram	Motil	Indol
1.	GMV 1	-	+	-
2.	GMV 2	-	+	-
3.	GMV 3	-	+	-
4.	GMV 4	-	+	-
5.	GMV 5	-	+	-
6.	GMV 6	-	+	-
7.	GMV 7	-	+	-
8.	GMV 8	-	+	-
9.	GMV 9	-	+	-
10.	GMR 1	-	+	-
11.	GMR 2	-	+	-
12.	GMR 3	-	+	-
13.	GMR 4	-	+	-
14.	GMR 5	-	+	-
15.	GMR 6	-	+	-
16.	GMR 7	-	+	-
17.	GMR 8	-	+	-
18.	GMP 1	-	+	-
19.	GMP 2	-	+	-
20.	GMP 3	-	+	-
21.	GMP 4	-	+	-
22.	GMP 5	-	+	-

Hasil pengamatan uji motil menunjukkan positif terhadap semua isolat, artinya semua isolat mampu hidup dan bergerak, hal tersebut ditandai dengan adanya pertumbuhan yang menyebar pada media, baik pada zona tusukan maupun sekitarnya. Sebaliknya uji indol diperoleh negative terhadap semua isolat, hal tersebut berarti bahwa

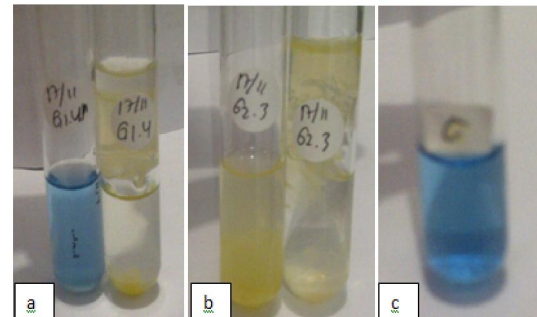
semua isolat tidak mampu memanfaatkan senyawa triptofan yang terdapat dalam media, hal ini ditandai dengan tidak adanya terbentuk cincin merah pada permukaan media. Rusmana (2009) melaporkan bahwa *methilobacterium* yang termasuk dalam bakteri methanotrof tipe II bersifat motil dan negative terhadap indol. Indol akan terbentuk jika bakteri mampu memanfaatkan senyawa triptofan, senyawa ini menurut Lay (1994) termasuk asam amino yang lazim terdapat pada protein. Tidak semua bakteri memiliki kemampuan menghidrolisis triptofan menjadi indol, oleh sebab itu dapat dijadikan ciri fisiologis (Pelczar, 2005).

Hasil pengamatan uji pada media OF diperoleh 4 isolat positif terhadap pertumbuhan aerob, yang dapat disimpulkan sebagai aerob obligat (table 2) yaitu ; GMV 9, GMR 2, GMR 3 dan GMR 6, hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan warna media biru menjadi kuning pada tabung terbuka dan tidak terjadi perubahan warna pada tabung tertutup, artinya bakteri tersebut tidak mampu beraktivitas pada kondisi anaerob sebaliknya sangat membutuhkan oksigen dalam aktivitasnya. Pada uji anaerob diperoleh 7 isolat positif yaitu GMV 1, GMV 4, GMV 5, GMV 6, GMV 7, GMR 1 dan GMR 5, hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan warna media biru menjadi kuning pada tabung tertutup dan sebaliknya pada tabung terbuka (Gambar 1a), artinya bakteri tersebut mampu melakukan aktivitas pada kondisi anaerob, sebaliknya tidak dapat beraktivitas pada kondisi aerob. Selain itu diperoleh 1 isolat yang positif terhadap kedua pengujian yaitu : GMV 2, GMV 3, GMV 8, GMR 4, GMR 7, GMR 8, GMP 1, GMP 2, GMP 3, GMP 4, dan GMP 5, hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada kedua tabung baik pada tabung tertutup maupun terbuka (Gambar 1b), artinya bakteri tersebut dapat melakukan aktivitas baik tanpa oksigen maupun dengan adanya oksigen, sehingga tergolong aerob fakultatif. Bakteri aerob fakultatif tidak memerlukan oksigen tetapi dapat

tumbuh baik bila oksigen tersedia (Tortora, 2012).

Tabel 2. Hasil Pengamatan pada media OF dan metode Kolorimetri

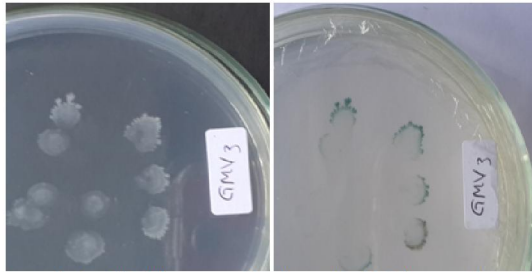
No	Kode Isolat	Aerob	Anaerob	MMO
1.	GMV 1	-	+	+
2.	GMV 2	+	+	-
3.	GMV 3	+	+	+
4.	GMV 4	-	+	+
5.	GMV 5	-	+	-
6.	GMV 6	-	+	-
7.	GMV 7	-	+	-
8.	GMV 8	+	+	-
9.	GMV 9	+	-	+
10.	GMR 1	-	+	+
11.	GMR 2	+	-	-
12.	GMR 3	+	-	-
13.	GMR 4	+	+	+
14.	GMR 5	-	+	-
15.	GMR 6	+	-	-
16.	GMR 7	+	+	-
17.	GMR 8	+	+	+
18.	GMP 1	+	+	-
19.	GMP 2	+	+	+
20.	GMP 3	+	+	-
21.	GMP 4	+	+	+
22.	GMP 5	+	+	+



Gambar 1. Perubahan warna yang terjadi pada media OF
(a) anaerob
(b) aerob fakultatif
(c) kontrol

Hasil pengamatan pada uji kolorimetrik (Tabel 2) diperoleh 10 isolat positif terhadap aktivitas enzim MMO yaitu GMV 1, GMV 3, GMV 4, GMV 9, GMR 1, GMR 4, GMR 8, GMP 2, GMP 4 dan GMP 5, hal ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna koloni isolat putih menjadi ungu setelah diuji (Gambar 2), artinya bahwa bakteri tersebut memiliki enzim MMO yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen pendegradasi senyawa hidrokarbon. Menurut Hanson dan Hanson (1996) semua bakteri *methanotrof* dapat mengekspresikan MMO. Lebih lanjut, Lontoh dan Semrau (1996) menjelaskan bahwa kemampuan *methanotrof* dalam mengekspresikan

pMMO sangat tergantung pada ketersediaan tembaga. Enzim tersebut digunakan pada proses oksidasi metan menjadi methanol. Enzim monooksigenase terdiri atas dua jenis yaitu: enzim metan monooksigenase terlarut (sMMO) dan enzim metan monooksigenase terikat membrane (pMMO). Proses oksidasi metan lebih dominan dikatalis oleh enzim pMMO (Lieberman dan Rosenzweig, 2004). Selanjutnya menurut Mancinelli (1995) hampir semua methanotrof memiliki pMMO kecuali *Methilocella*, dan hanya sebagian methanotrof tipe II dan tipe X yang memiliki sMMO. Sedangkan Zahn dan DiSpirito (1996) melaporkan bahwa enzim pMMO telah ditemukan pada semua bakteri *methanotrof*.



Gambar 2. Perubahan warna pada media pengujian (a) sebelum pengujian (b) setelah pengujian

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian berhasil mengoleksi 52 isolat bakteri yang diisolasi dari rhizosfer tanaman padi. Berdasarkan uji gram berhasil dikoleksi 22 isolat gram negatif yang terdiri atas 4 isolat aerobic obligat, 7 isolat anaerobic, 11 isolat aerobic fakultatif dan 10 isolat positif memiliki enzim metan monooksigenase.

5. SARAN

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk menentukan spesies, genus ataupun golongan terhadap semua isolat.

DAFTAR PUSTAKA

- Auman, A.J, C. C. Speake, and M. E. Lidstrom (2001) "nifH sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 9, pp. 4009–4016.
- Bergey, D.H and J. G. Holt (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hanson. R.S and T. E. Hanson (1996) "Methanotrophic bacteria," *Microbiol. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 439–471.
- Lay, BW (1994) "Uji TSIA," *Analisis Mikroba di Laboratorium*.
- Lieberman R.L, and A. C. Rosenzweig (2004) "Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 147–164.
- Lontoh. S, and J. D. Semrau (1998) "Methane and Trichloroethylene Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Particulate Methane Monooxygenase," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 1106–1114.
- Mancinelli R.L (1995) "The regulation of methane oxidation in soil," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 49, pp. 581–605.
- Rusmana A.I (2009) "Isolation and characterization of methanotrophic bacteria from rice fields.," *Biotropia*, vol. 16, pp. 71–78.
- Pelczar M.J (2005) and M. J. Pelczar, "Dasar-dasar mikrobiologi / Michael J. Pelczar, Jr., E.C.S. Chan; penerjemah Ratna Siri Hadioetomo ... [et al.], Dasar-dasar mikrobiologi / Michael J. Pelczar, Jr., E.C.S. Chan; penerjemah Ratna Siri Hadioetomo ... [et al.]," *1 Mikrobiol.-Dasar Mikrobiol. Michael J Pelczar Jr ECS Chan Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo Al Dasar-Dasar Mikrobiol. Michael J Pelczar Jr ECS Chan Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo Al*, vol. 2005, no. 2005, pp. 1–99.
- Schröder P and A. Hartmann (2003) "New developments in rhizosphere

- research," *J. Soils Sediments*, vol. 3, no. 4, pp. 227–227.
- Schöttelndreier M and U. Falkengren-Grerup (1999), "Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity," *Plant Soil*, vol. 209, no. 2, pp. 297–309.
- Tortora Gerard J (2012) *Microbiology: An Introduction, Books a la Carte Edition*, 11 edition. Benjamin Cummings.
- Zahn J.A. dan A.A. DiSpirito (1996) "Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)," *J. Bacteriol.* Vol. 178, no. 4, pp. 1018-1029.