

EKSPLORASI MIKROB PENGGUNA METANOL DARI TANAH DAN KOTORAN TERNAK, SEBAGAI SUMBER PROTEIN SEL TUNGGAL

Exploration of Methanol Utilizing Microbes From Soil and Dung, as Source of Single Cell Protein

Fahrizal Hazra

Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

ABSTRACT

The objectives of this research were to explore methanol utilizing microbes by isolation, selection and collection of methanol utilizing microbes from soil and dung, further it will be produced as single cell protein.

The experiment covers two steps, i.e. 1) Sampling of soil and dung from Bogor, Cianjur and Karawang. 2) Laboratory activity, consisted of : isolation, selection, identification and collection. The microbes were isolated by using the medium of Tani, et al (1982) and its modification, whereas the methanol utilizing microbes were identified by using standard method of Bergeys Manual of Determinative Bacteriology edition 9th (1994) and Balow et al. (1991). The microbes were then proliferated by using Medium of Mimura et al. (1978) and its modification. Furthermore the cell were harvested and measured its nitrogen content. The collection of methanol utilizing microbes was conducted with the standard procedure of soil microbiology.

*This research indicated that from 72 samples of soil and dung were obtained 56 isolates of methanol utilizing microbes that diverse in number and types. Most of methanol utilizing microbes were isolated from soil and dung by methanol medium 1% and 1.5 % in pH 5 and 7. From 56 isolates were chosen 12 isolates to be identified and made as a data base, and then kept as culture collection at Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology (ICBB), Laboratory of Microbiology and Environmental Biotechnology PPLH, and Laboratory of Soil Biology, IPB. From the 12 isolates, 2 isolates were classified into methylotrophic group and they have big potency to be exploited in producing single cell protein, i.e. *Methylococcus capsulatus* and *Acidomonas methanolica*. Between 2 isolates, *Methylococcus capsulatus* (T2M1P1 Cianjur) have a big potency to be used as a source of single cell protein, due to their high content of protein, i.e. 6.4%. Both of the microbes were not pathogenic for human and animal.*

Keywords: Methanol, Microbe, Methylotrophic group, Single Cell Protein (SCP)

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Sumber daya alam Indonesia memiliki potensi yang besar untuk dieksplorasi mikrobnnya. Lahan-lahan pertanian maupun non pertanian serta berbagai sumber lainnya seperti limbah (kotoran hewan), belum banyak diketahui dan dimanfaatkan mikrobnnya. Metanol merupakan bahan baku yang banyak digunakan dalam industri fermentasi. Hal ini dikarenakan metanol memiliki harga yang relatif murah, selain itu menurut Snedecor dan Cooney (1974) metanol juga memiliki kemurnian yang tinggi, dapat bereaksi dengan air, dan dapat digunakan oleh mikrob tertentu sebagai sumber karbon. Oleh karena itu metanol dapat dijadikan sebagai bahan isolasi mikrob dari berbagai sumber.

Mekanisme penggunaan (asimilasi dan disimilasi) metanol oleh mikrob sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut. Pada umumnya mikrob dapat menggunakan metanol untuk memproduksi selnya. Sel mikrob pengguna metanol dapat diproduksi secara massal sebagai protein sel tunggal, yaitu sel mikrob yang tidak patogen dapat dimanfaatkan sebagai sumber protein seperti pakan ternak.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi mikrob pengguna metanol dengan cara isolasi, seleksi, identifikasi dan koleksi mikrob tersebut dari tanah dan kotoran ternak, kemudian diproduksi sebagai protein sel tunggal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel berupa tanah dan kotoran ternak dari Bogor, Cianjur, dan Karawang. Mikrob yang dapat menggunakan metanol diisolasi dari semua sampel dengan metode "plate count" dengan teknik "enrichment culture", kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dengan seri pengencerannya. Medium A dan B dengan modifikasinya (Tabel 1) digunakan untuk mengisolasi mikrob (Tani *et al.*, 1982). Dengan demikian mikrob diisolasi dalam 4 medium yang berbeda, yaitu : Medium A1 (metanol 1% dengan pH 5), A2 (metanol 1.5% dengan pH 5), B1 (metanol 1% dengan pH 7), dan Medium B2 (metanol 1.5% dengan pH 7).

Sampel sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam 90 ml medium A dan B pada erlenmeyer 500 ml dan diinkubasi dengan cara dikocok selama 4-7 hari. Kemudian dengan teknik "enrichment culture" akan terisolasi mikrob yang dapat menggunakan metanol sebagai sumber karbon satu-satunya. Penghitungan jumlah mikrob dengan metode hitungan cawan ("plate count") dengan masa inkubasi 7 hari. Kultur murni diperoleh dari seri pengenceran dan dicawakan berulang pada medium A dan B dengan penambahan 2% agar.

Seluruh hasil isolasi diidentifikasi berdasarkan jenisnya. Mikrob diidentifikasi dengan menggunakan "Bergeys Manual of Determinative Bacteriology" (1994) edisi ke-9 dari sifat morfologi dan fisiologi yang penting untuk mikrob pengguna metanol dan tambahan acuan lainnya dari Balows *et al.* (1991).

Mikrob ditumbuhkan pada medium yang baik untuk pertumbuhannya yang dikembangkan oleh Mimura *et al.* (1978). Komposisi per literanya adalah : (NH₄)₂HPO₄ 3.0 g, Urea 10 g, KH₂PO₄ 2.0 g, K₂HPO₄ 7.0 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g, FeSO₄.7H₂O 0.03 mg, MnCl₂.4H₂O 0.04 mg, NaCl 0.1 g, Yeast extract 1 g, Metanol 16 ml, dan pH dibuat menjadi 7.0. "Crude protein" selnya dianalisis dengan metode Kjeldahl dengan mengukur total nitrogennya.

Bakteri yang dapat menggunakan metanol sebagai sumber karbon satu-satunya disimpan (koleksi) dengan metode standar penyimpanan bakteri. Koleksi bakteri disimpan pada "culture collection" di ICBB, PPLH-IPB dan Laboratorium Bioteknologi Tanah, Fakultas Pertanian IPB, Bogor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi

Isolat yang dihasilkan pada inkubasi tahap awal beragam dan terdiri dari beberapa mikrob yang belum

diketahui jenisnya. Sebanyak 56 isolat berhasil diisolasi dari 72 sampel yang berasal dari tanah dan kotoran ternak. Masing-masing sampel berasal dari lokasi yang berbeda. Sembilan belas isolat berasal dari Bogor, 16 isolat dari Cianjur, dan 21 isolat berasal dari Karawang.

Data jumlah mikrob yang dihasilkan beranekaragam, tergantung dari komposisi medium dan asal sampel yang digunakan. Medium isolasi yang digunakan, yaitu medium A dan B yang dimodifikasi (Tani *et al.*, 1982). Pada medium tersebut metanol dengan komposisi yang berbeda-beda digunakan oleh mikrob sebagai sumber karbon satu-satunya.

Sel memperoleh energi dari nutrien melalui serangkaian reaksi kimiawi, beberapa diantaranya adalah proses oksidasi. Metanol dioksidasi dengan bantuan enzim metanol dehidrogenase menjadi formaldehida, kemudian dikonversi menjadi asam format dan sebagai hasil akhir terbentuk CO₂ (Gambar 1).

Selama oksidasi, energi dilepaskan dan dapat terbentuk ikatan-ikatan kimiawi kaya energi (ATP) untuk menyimpan energi yang dilepaskan itu. Data jumlah mikrob yang dihasilkan dapat digunakan sebagai "data base" untuk penelitian selanjutnya. Bila digambarkan dalam bentuk grafik, jumlah mikrob dari masing-masing lokasi dapat dilihat pada Gambar 2, 3, dan 4.

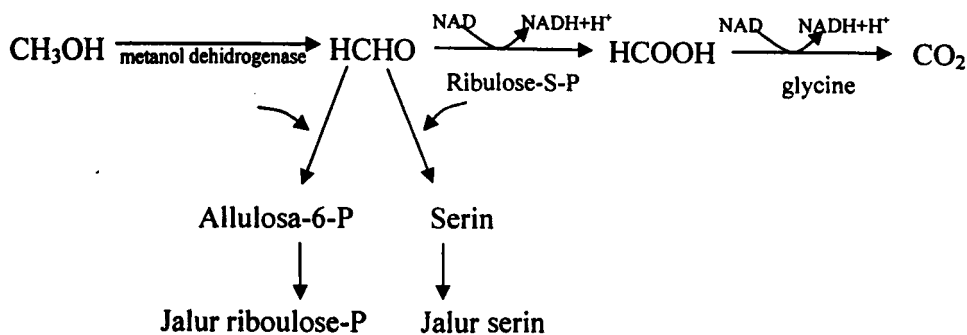
Berdasarkan jenis sampel yang digunakan, jumlah mikrob terbesar untuk lokasi Bogor terdapat pada kotoran kuda (di dalam medium M2P2), yaitu sebesar 2.40 x 10⁶ sel/ml, sedangkan untuk jumlah mikrob terkecil terdapat pada kotoran kambing (di dalam medium M1P2), yaitu sebesar 2.6 x 10⁴ sel/ml. (Gambar 2).

Pada Gambar 3 dapat terlihat bahwa medium yang ditambahkan kotoran kambing ke dalamnya, yaitu medium M2P2 memiliki jumlah mikrob terbesar (1.20x10⁶ sel/ml) dibandingkan jenis sampel lainnya. Sebaliknya, kotoran sapi dalam medium M1P1 memiliki jumlah mikrob terkecil (8.1 x 10⁴ sel/ml).

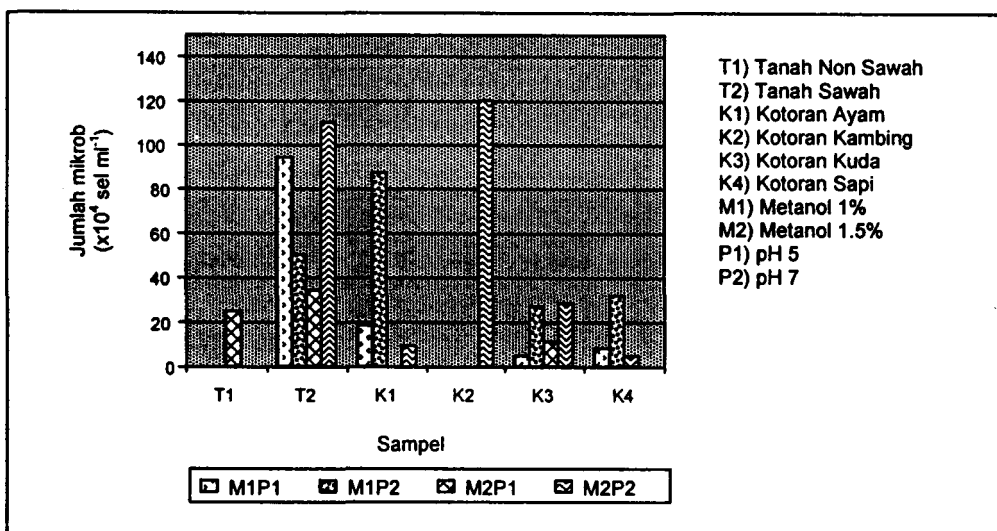
Tabel 1. Komposisi Medium A dan Medium B (Tani *et al.*, 1982)

| Medium A | | Medium B | |
|--|---------------|--|---------------|
| Jenis Bahan | Jumlah | Jenis Bahan | Jumlah |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 3.0 g | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 3.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4.0 g | KH ₂ PO ₄ | 4.0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 20 mg | CaCl ₂ .2H ₂ O | 20 mg |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 20 mg | FeSO ₄ .7H ₂ O | 20 mg |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 5.0 mg | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 5.0 mg |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 2.0 mg | MnCl ₂ .4H ₂ O | 2.0 mg |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.5 mg | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.5 mg |
| Larutan vitamin | 0.1 ml | Larutan vitamin | 0.1 ml |
| Metanol | 10 ml & 15 ml | Metanol | 10 ml & 15 ml |
| Aquadest | 1.000 ml | Aquadest | 1.000 ml |
| pH dibuat menjadi 7.0 | | pH dibuat menjadi 5.0 | |

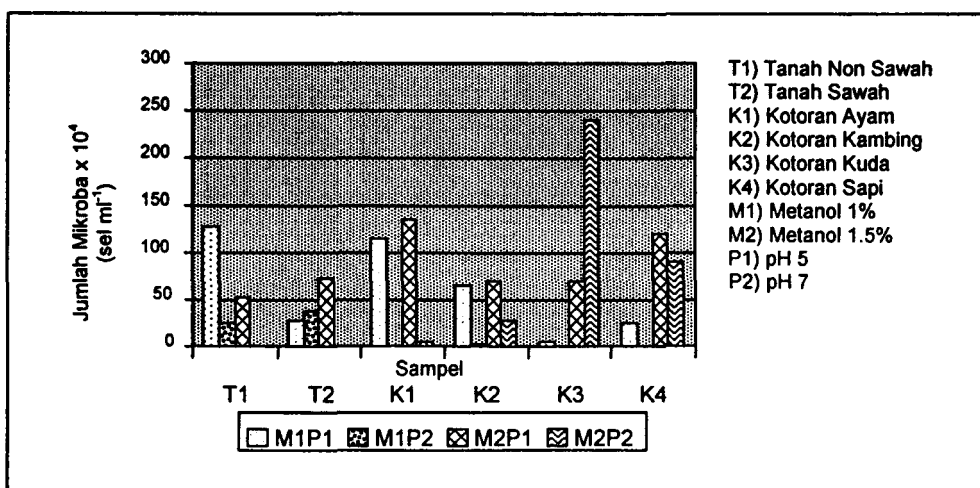
Komposisi dari larutan vitamin : Biotin, 2 mg; Kalsium pantotenat, 400mg; Piridoksin-HCL, 400 mg;³ Tiamin-HCL, 400 mg; P-aminobenzoic acid, 200 mg; Folic acid, 2 mg; Inositol, 2 g; Nicotinic acid, 400 mg; Riboflavin, 200 mg; Aquadest 1.000 ml.



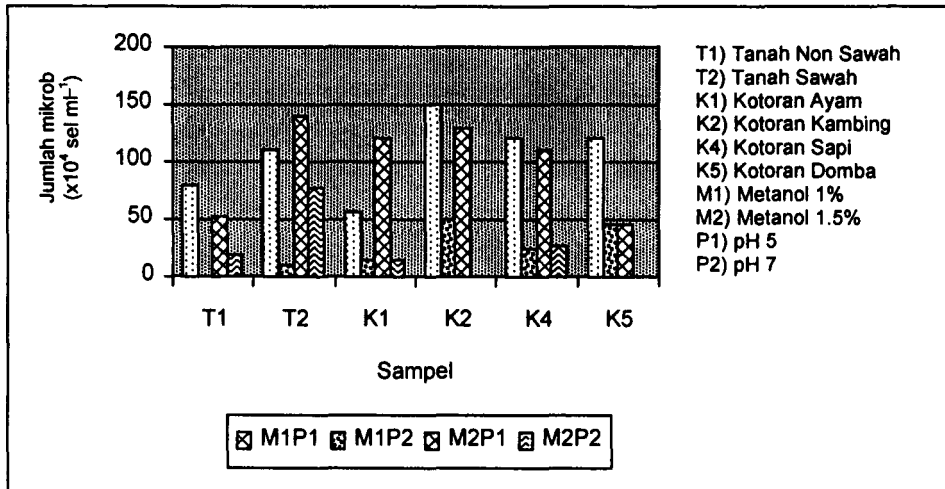
Gambar 1. Skema Katabolisme Metanol oleh Bakteri Metilotrof (Doelle, 1981).



Gambar 2. Jumlah Rata-rata Mikroba Pengguna Metanol dari Bogor.



Gambar 3. Jumlah Rata-rata Mikroba Pengguna Metanol dari Cianjur.



Gambar 4. Jumlah Rata-rata Mikrob Pengguna Metanol dari Karawang.

Pengujian Mikrob Sebagai Bahan Protein Sel Tunggal

Hasil pengukuran kadar N dan protein menunjukkan bahwa masing-masing mikrob memiliki kadar N dan protein yang berbeda (Tabel 3).

Diantara keduabelas spesies tersebut, *Methylococcus capsulatus* dan *Acidomonas methanolica* memiliki potensi yang terbesar untuk diproduksi sebagai protein sel tunggal karena dilaporkan tidak bersifat pathogen (Anthony, 1982 dan Urakami *et al.*, 1989), sedangkan mikrob lainnya seperti *Klebsiella pneumonia* mungkin bersifat patogen. Kedua mikrob tersebut termasuk kelompok bakteri metilotrofik. Dari kedua isolat tersebut yang paling besar produksi protein sel tunggalnya adalah *Methylococcus capsulatus* (T2M1P1 Cianjur) yaitu 6.4%. *Methylococcus capsulatus* melakukan proses asimilasi karbonnya melalui lintasan/jalur RuMP. Menurut Anthony (1982), bakteri yang demikian merupakan bakteri yang terbaik untuk memproduksi PST. Penggunaan Protein Sel Tunggal (PST) memiliki arti penting dalam meningkatkan ketersediaan protein bagi manusia dan ternak.

KESIMPULAN

1. Sebagian besar mikrob pengguna metanol dapat terisolasi dari tanah dan kotoran ternak dengan medium metanol 1% dan 1.5% pada pH 5 dan pH 7.
2. Dari keragamannya diperoleh "data base" eksplorasi mikrob pengguna metanol dari berbagai sumber, terutama dari keragaman jumlahnya.
3. Terdapat 12 (dua belas) isolat yang teridentifikasi dan yang terpenting adalah *Acidomonas methanolica* dan *Methylococcus s capsulatus*.
4. Diantara ke dua isolat tersebut yang paling besar produksi protein sel tunggalnya adalah *Methylococcus capsulatus* (T2M1P1 Cianjur) yaitu 6.4%.
5. Semua isolat pengguna metanol sebagai sumber karbon satu-satunya disimpan pada "culture collection" dengan menggunakan medium gliserol sehingga tahan lama dan sewaktu-waktu dapat dimanfaatkan untuk penelitian lanjutan.

Tabel 2. Karakterisasi Morfologi, Pewarnaan, dan Fisiologi Mikrob yang Dapat Menggunakan Metanol dengan Sampel dari Bogor, Cianjur, dan Karawang

| Lokasi | Bogor | | | | | Cianjur | | | Karawang | | | |
|--------------------------------|------------|---------|---------|---------|------------|---------|---------|------------------|---------------|-------------|-----------|---------|
| | No. Isolat | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Kode Sumber Isolat | T2M1P2 | K1M1P1 | K2M1P1 | K3M2P2 | K4M2P2 | T2M1P1 | K3M1P1 | K4M1P1' | T2M2P2 | K1M1P2 | K2M2P1 | K3M1P2 |
| Morfologi Koloni : | | | | | | | | | | | | |
| Warna | KE | PG | PG | PG | PG | PS | PG | PG | PGK | PG | PG | PG |
| Elevasi | Timbul | Cembung | Cembung | Cembung | Cembung | Cembung | Cembung | Cembung | Timbul | Cembung | Cembung | Cembung |
| Tepian | Licin | Licin | Licin | Licin | Licin | Licin | Licin | Licin | Tdk Beraturan | Licin | Licin | Licin |
| Bentuk | Bundar | Bundar | Bundar | Bundar | Konsentris | Bundar | Bundar | Bundar | Tdk Beraturan | Bundar | Bundar | Bundar |
| Konsisten | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Tidak | Konsisten | Tidak |
| Pewarnaan : | | | | | | | | | | | | |
| Gram | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - |
| Spora | - | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Tahan Asam | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bentuk Sel | Basil | Basil | Basil | Basil | Basil | Kokus | Basil | Diplobasil Besar | Basil Besar | Basil Kecil | Kokus | Kokus |
| Pengaruh O ₂ | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob | Aerob |
| Motilitas | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Fisiologi Koloni : | | | | | | | | | | | | |
| Lysin | - | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + |
| Ornithine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Mannitol | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | + |
| Xylose | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| ONPG* | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + |
| Indole | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| Urease | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| V.P.** | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | + |
| Citrate | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| TDA*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelatine | + | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Malonate | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | - |
| Inositol | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - |
| Sorbitol | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| Rhamnose | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - |
| Sucrose | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Lactose | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Arabinose | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| Adonitol | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - |
| Raffinose | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| Salicin | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - |
| Arginine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Respirasi Karbohidrat : | | | | | | | | | | | | |
| Oksidase | + | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| Katalase | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Nitrat | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| KOH | - | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + |

Keterangan : (KE) Kuning Emas, (PG) Putih Gading, (PS) Putih Susu, (PGK) Putih Gading Kering, (1) *Aeromonas salmonicida*, (2) *Enterobacter liquefaciens*, (3) *Klebsiella pneumonia*, (4) *Enterobacter agglomerans*, (5) *Bacillus mycoides*, (6) *Methylokokus capsulatus*, (7) *Moraxella (Moraxella) bovis*, (8) *Ancyllobacter aquaticus*, (9) *Bacillus pumilus*, (10) *Acidomonas methanolica*, (11) *Methylokokus capsulatus*, (12) *Moraxella (Branhamella) ovis*, (*ONPG) o - nitrophenyl β - D - galactopyranoside Hydrolysis, (** V.P.) Voges Proskauer, (***) TDA) Tryptophan Diaminase.

Tabel 3. Kadar N dan Kadar protein dari Mikrob yang Dapat Menggunakan Metanol Sebagai Sumber Protein Sel Tunggal

| No. Isolat | Lokasi | Kode Sumber Isolat | Spesies | Kadar protein (%) | Kadar N (%) |
|------------|----------|--------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| 1 | Bogor | T2M1P2 | <i>Aeromonas salmonicida</i> | 2.5 | 0.40 |
| 2 | Bogor | K1M1P1 | <i>Enterobacter liquefaciens</i> | 6.26 | 1.00 |
| 3 | Bogor | K2M1P1 | <i>Klebsiella pneumonia</i> | 8.66 | 1.39 |
| 4 | Bogor | K3M2P2 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 1.75 | 0.28 |
| 5 | Bogor | K4M2P2 | <i>Bacillus mycoides</i> | 5.41 | 0.87 |
| 6 | Cianjur | T2M1P1 | <i>Methylokokus capsulatus</i> | 6.4 | 1.02 |
| 7 | Cianjur | K3M1P1 | <i>Moraxella (Moraxella) bovis</i> | 7.63 | 1.22 |
| 8 | Cianjur | K4M1P1 | <i>Ancyllobacter aquaticus</i> | 4.45 | 0.71 |
| 9 | Karawang | T2M2P2 | <i>Bacillus pumilus</i> | 3.39 | 0.54 |
| 10 | Karawang | K1M1P2 | <i>Acidomonas methanolica</i> | 3.18 | 0.51 |
| 11 | Karawang | K2M2P1 | <i>Methylokokus capsulatus</i> | 2.19 | 0.35 |
| 12 | Karawang | K5M1P2 | <i>Moraxella (Branhamella) ovis</i> | 4.41 | 0.71 |

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh QUE Project Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian IPB, sehingga kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Manajemen QUE Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony, C. 1982. The Biochemistry of Methylotrophs. Academic Press Inc. Ltd. London.
- Balows, A., G. T. Hans, D. Martin, H. Wim, T. N. O. Karl, and S. Heinz. 1991. The Prokaryotes. 2nd ed. A Handbook on Biology of Bacteria. Springer-Verlag.
- Doelle, H.W. 1981. Basic Metabolic Processes. In Rehm, H.J. and Reed, G. (eds): Biotechnology, Vol. 1, Microbial Fundamentals. Verlag Chemie, Weinheim.
- Holt J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual Determinative of Bacteriology. 9th ed. William and Wilkins. Baltimore.
- Mimura, A., M. Wada and H. Sakashita. 1978. Isolation and characterization of a gram positive methanol assimilating bacterium. *J. Ferment. Technol.*, 56 (4):243-252.
- Snedecor, B., and C. L. Cooney. 1974. Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth. *Appl. Microbiol.*, 27:1112-1117.
- Kato, N., T. Higuchi, C. Sakazawa, T. Nishizawa, Y. Tani, and H. Yamada. 1982. Purification and properties of a transketolase responsible for formaldehyde fixation in a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera sp.*) No. 2201. *Biochem. Biophys. Acta.*, 715:143-150.
- Tani, Y., T. Urakami, I. Terao, and I. Nagai. 1982. Isolation and cultivation of methanol-utilizing bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 60(4):287-295.
- Urakami, T., H. Tamaoka, J. Suzuki, and K. Komagata. 1989. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39:50-55.