

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asetogenik dari Rumen Rusa dan Potensinya sebagai Inhibitor Metanaogenesis

AMLIUS THALIB

(Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002)

(Diterima dewan redaksi 2 Mei 2008)

ABSTRACT

THALIB, A. 2008. Isolation and identification of acetogenic bacteria obtained from deer rumen and their potential for methanogenesis inhibitor. *JITV* 13(3): 197-206.

Methanogenesis can be inhibited by various chemicals through different mechanism reaction. The use of acetogenic bacteria as H₂ sink is assumed to be a promising approach. Isolation and identification of acetogenic bacteria obtained from deer rumen had been conducted. Two types of media used for isolation were hydrogen-carbondioxide utilizing acetogens and carbonmonoxide utilizing acetogens. Identification of species of acetogens isolates was based on descriptions of morphology, Gram type, motility, bioreaction results, and oxygen requirement. The compositions of methane and volatile fatty acids (VFA) were determined on minimal media or added with sheep rumen liquid inoculated with pure isolates. The identification results showed that the isolate cultured on media of hydrogen-carbondioxide utilizing acetogens was *Acetoanaerobium noterae* and the ones cultured on media of carbonmonoxide utilizing acetogens was *Acetobacterium woodii*. Inoculum of *A. noterae* and *A. woodii* could decreased the composition of methane resulted from substrate fermented by fresh rumen liquid of sheep (CRDF), that is culture of *A. noterae* added FPM and defaunator decreased methane production by 28.8% (P<0.01), while culture of *A. woodii* added microbe growth factors (FPM) and defaunator decreased methane production by 20.6% (P<0.05). Composition of VFA resulted from fibrous substrate fermented by inoculum of CRDF with and without combined with cultures of *A. noterae* dan *A. woodii* were not significantly different except for culture of *A. noterae* combined with FPM and defaunator additives was higher than CRDF (P<0.05) (ie. 122.9 vs. 97.9 mM for total VFA and 73.43 vs. 68.37% for composition of acetic acid). It is assumed that isolates of *A. noterae* and *A. woodii* could be functioning as methanogenesis inhibitor based on the reduction of CO₂ with H₂ producing CH₄ can be inhibited or decreased. Their function as methanogenesis inhibitor would be more significant when they are combined with microbial growth factors and defaunator.

Kata Kunci: Asetogenic Bacteria, *Acetoanaerobium Noterae*, *Acetobacterium Woodii*, Deer, Methane

ABSTRAK

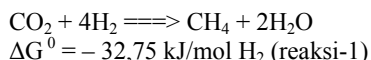
THALIB, A. 2008. Isolasi dan identifikasi bakteri asetogenik dari rumen rusa dan potensinya sebagai inhibitor metanogenesis. *JITV* 13(3): 197-206.

Pada prinsipnya metanogenesis dapat diinhibisi dengan berbagai macam zat kimia melalui mekanisme yang berbeda-beda, dan penggunaan bakteri asetogenik disarankan sebagai cara yang lebih baik ditinjau dari beberapa aspek. Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri asetogenik yang bersumber dari rumen rusa. Dua tipe media telah digunakan untuk mengisolasi bakteri asetogenik yaitu tipe pengguna hidrogen-karbon dioksida dan pengguna karbonmonoksida. Identifikasi spesies bakteri hasil isolasi didasarkan pada pengamatan morfologi dan tipe Gram, motilitas, produk biokimia, dan kebutuhan oksigen. Komposisi metana dan asam lemak volatil (VFA) ditentukan pada media minimal atau cairan rumen domba yang diinokulasi dengan isolat murni (bakteri asetogenik). Hasil identifikasi isolat murni dengan media asetogenik pengguna hidrogen-karbon dioksida menunjukkan spesies *Acetoanaerobium noterae* dan dengan media asetogenik pengguna karbonmonoksida menunjukkan spesies *Acetobacterium woodii*. Inokulum kultur murni *A. noterae* dan *A. woodii* dapat menurunkan komposisi produksi gas metan hasil fermentasi substrat bahan serat oleh inokulum cairan rumen segar domba (CRDF), yakni menurunkan hingga 28,8% untuk *A. noterae* bila ditambahkan faktor pertumbuhan mikroba (FPM) dan defaunator (P<0,01), dan hingga 20,6% untuk *A. woodii* bila ditambahkan FPM dan defaunator (P<0,05). Hasil komposisi dan produksi VFA hasil fermentasi substrat bahan serat oleh inokulum CRDF dengan dan tanpa kombinasi dengan kultur *A. noterae* dan *A. woodii* tidak berbeda nyata kecuali pada kultur *A. noterae* yang dikombinasikan dengan aditif FPM dan defaunator menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05) dibandingkan dengan inokulum CRDF (yaitu VFA total = 122,9 vs. 97,9 mM dan komposisi asam asetat = 73,43 vs. 68,37%). Diasumsikan dari penelitian ini bahwa isolat bakteri *A. noterae* dan *A. woodii* dapat berperan sebagai inhibitor metanogenesis berdasarkan peranannya mengkatalisis reduksi CO₂ dengan hidrogen membentuk asam asetat dan dengan berlangsungnya reaksi ini maka reduksi CO₂ dengan H₂ membentuk CH₄ menjadi terhambat atau berkurang, dan efektivitasnya sebagai inhibitor metanogenesis menjadi lebih signifikan bila dikombinasikan dengan defaunator dan faktor pertumbuhan mikroba.

Kata Kunci: Bakteri Asetogenik, *Acetoanaerobium Noterae*, *Acetobacterium Woodii*, Rusa, Metana

PENDAHULUAN

Pada sistem pencernaan rumen hewan ruminansia, metanaogenesis merupakan salah satu alur reaksi fermentasi makromolekul yang menghasilkan gas CH₄ melalui reduksi CO₂ dengan gas hidrogen yang dikatalisis oleh enzim yang dihasilkan bakteri metanaogenik menurut jalur reaksi seperti berikut:



Produksi gas CH₄ oleh hewan ruminansia meningkat bila kualitas hijauan pakan yang dikonsumsi rendah, dan sejalan dengan itu berpengaruh negatif terhadap produktivitas ternak. Metanaogenesis dapat menyebabkan kehilangan energi hingga 15% dari total energi kimia yang tercerna (BOCAZZI dan PATTERSON, 1995). Estimasi emisi gas CH₄ secara global oleh hewan ruminansia pertahun sekitar 80 juta ton (LENG, 1991), sementara total emisi gas CH₄ global sekitar 500 juta ton pertahun (CICERONE dan OREMLAND dalam NEUE, 1993).

Metanaogenesis dapat diinhibisi dengan berbagai macam zat kimia dengan beberapa tipe mekanisme, antara lain berdasarkan sifat toksik terhadap bakteri metanaogen seperti senyawa-senyawa derivat metana (BOCAZZI dan PATTERSON, 1995; MILLER dan WOLIN, 2001); berdasarkan pada reaksi hidrogenasi seperti senyawa asam-asam lemak berantai panjang tidak jenuh (FIEVES *et al.*, 2003; THALIB, 2004; MACHEMULLER, 2006); berdasarkan pada senyawa-senyawa kimia yang afinitasnya terhadap hidrogen lebih tinggi dari pada CO₂ seperti ion ferri dan ion sulfat (OBASHI *et al.*, 1995; THALIB, 2004); dan berdasarkan defaunasi/penekanan populasi protozoa seperti senyawa saponin (JOUANY, 1991; THALIB, 2004).

Inhibisi metanaogenesis terutama yang mekanismenya berdasarkan pada sifat toksik terhadap bakteri metanaogen, memiliki kelemahan yaitu menimbulkan sifat resisten pada bakteri metanaogen dan juga menyebabkan terjadi akumulasi residu senyawa inhibitor tersebut dalam produk hewan ternak, sehingga pendekatan ini tidak *sustainable*. Oleh karena itu pendekatan dengan intervensi bakteri asetogenik menjadi alternatif yang sudah mulai dikembangkan akhir-akhir ini (LE VAN *et al.*, 1998; LOPEZ *et al.*, 1999; FONTY *et al.*, 2007). Bakteri asetogenik atau lebih tepat dinamakan bakteri homoasetogenik, adalah eubakterium yang dapat mengkatalisis reduksi karbondioksida menjadi asam asetat. Hampir semua bakteri homoasetogenik adalah pengguna hidrogen-karbondioksida, dan beberapa spesies diketahui sebagai pengguna karbon monoksida (DIEKERT, 1992). Bakteri asetogenik pengguna H₂-CO₂ terdapat dalam rumen, dan yang telah teridentifikasi adalah: *Acetitomaculum ruminis*, *Eubacterium limosum* dan *Clostridium*

pfennigi (MACKIE dan BRYANT, 1994). LEEDLE dan GREENING (1988) menemukan bakteri asetogenik spp dalam jumlah yang tinggi pada rumen rusa. Laporan tentang pengujian bakteri asetogenik dalam sediaan kultur murni sebagai inhibitor metanaogenesis dalam rumen masih sangat kurang, terutama bila kultur bakteri ini ditambahkan langsung sebagai aditif. Dalam penelitian ini dipelajari kemungkinan keberadaan bakteri asetogenik dari hasil isolasi mikroba rumen rusa dan juga dipelajari potensi bakteri asetogenik sebagai inhibitor metanaogenesis secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Isolat bakteri bersumber dari mikroba rumen rusa (Rusa Hitam dari Timor: *Cervus Timorensis*) yang dipelihara di SPBU Lorena, Tajur, Bogor. Isolat diuji morfologis dan pewarnaannya untuk mendapatkan bakteri asetogenik. Feses rusa yang baru keluar diambil bagian atasnya secara hati-hati agar tidak terkontaminasi dengan tanah lalu dimasukkan kedalam kantong plastik dan dibawa dengan kit termostat anaerobik dan secepatnya langsung dibawa ke laboratorium mikrobiologi rumen Balai Penelitian Ternak. Kotoran ditambahkan larutan pengencer (1 : 1 ^b/_b), dicampur rata lalu diperas dan disaring dengan 2 lapis kain muslin. Larutan pengencer disiapkan menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981). Bakteri yang terdapat dalam filtrat feces diisolasi dengan menggunakan 2 tipe media isolasi asetogen, yaitu media isolasi asetogen pengguna hidrogen-karbondioksida, dan media isolasi asetogen pengguna karbon monoksida

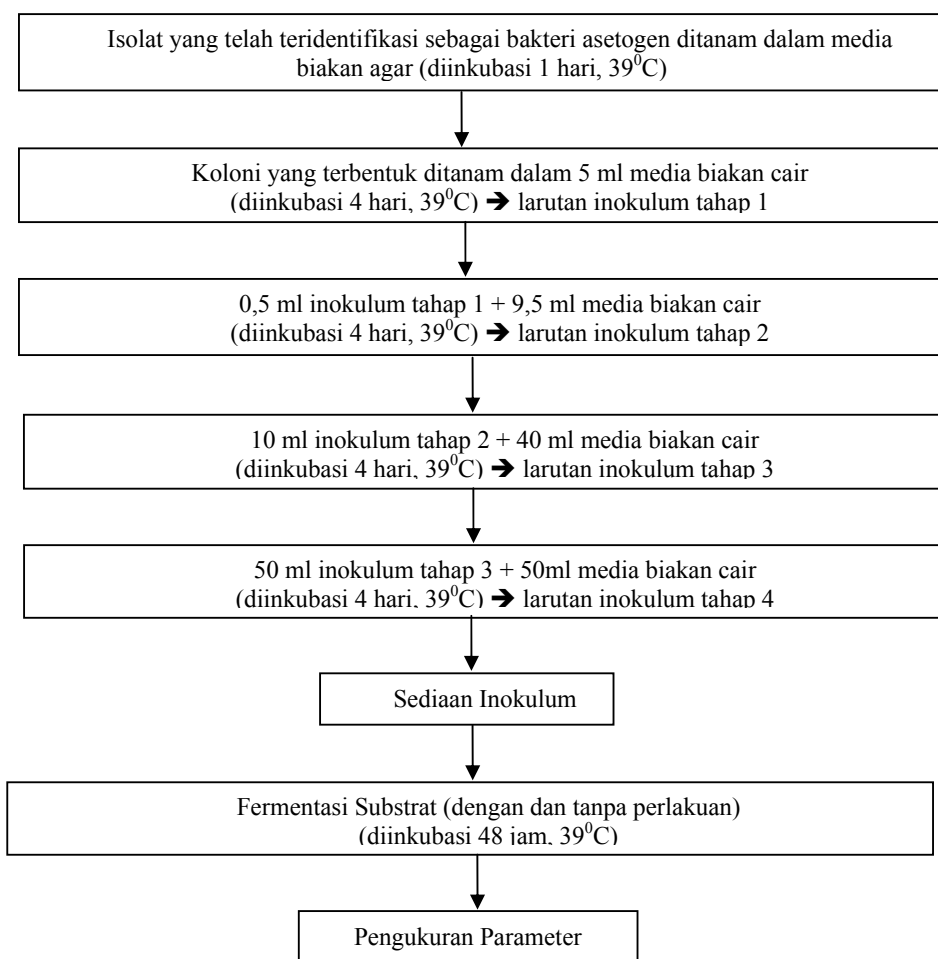
Media isolasi asetogen pengguna hidrogen-karbondioksida disiapkan menurut prosedur ATLAS (1993), yaitu larutan aquous yang terdiri dari campuran NH₄Cl, yeast extract, garam-garam makromineral, buffer kaliumfosfat, cairan rumen steril, mikromineral, vitamin, natrium tungstat, dan resazurin. Larutan dipanaskan perlahan hingga mendidih sambil dialirkan gas N₂ dan CO₂ (80% : 20%), kemudian didinginkan dan setelah suhu turun menjadi 45 – 50°C, ditambahkan NaHCO₃ dan *reducing agent*. Sebelum media diinokulasi dengan filtrat feces rusa, dilakukan *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C. Setelah diinkubasi dengan filtrat (sebanyak 5% dalam larutan media) dialirkan gas H₂ dan CO₂ (80% : 20%), untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan goyangan 200 rpm diatas *water bath* selama 2 hari. Proses ini dilakukan secara berulang sebanyak 3 kali melalui proses pemindahan dari hasil inkubasi kedalam media baru yang disiapkan seperti diatas. Selanjutnya diinokulasi kedalam media kultur RGCA (OGIMOTO dan IMAI, 1981) yang dimodifikasi dengan penambahan *bactocasitone*, *yeast extract*, dan *starch soluble*, dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37°C. Pemiakan ini memberikan hasil dalam bentuk

penyebaran populasi koloni bakteri disepanjang dinding tabung, dan setiap koloni diklasifikasi secara morfologis dan tipe Gram. Proses kultur dilakukan berulang untuk mendapatkan bentuk dan ukuran yang sama. Pemisahan dan pemurnian koloni dilakukan berdasarkan pengamatan morfologis dengan *Olympus Biological Microscope* seri CH2 yang dilengkapi dengan *Automatic Exposure Photomicrograph* tipe PM-10AK3. Tipe dinding sel dari isolat yang telah murni secara morfologis, diuji menurut prosedur LAY (1994). Isolat-isolat yang telah murni secara morfologis ini, selanjutnya dikirim ke Departemen Mikrobiologi, FMIPA jurusan biologi, ITB Bandung untuk identifikasi spesies.

Media isolasi asetogen pengguna karbonmonoksida disiapkan menurut prosedur GEERLINGS *et al.*, (1987), yaitu larutan aquous yang terdiri dari larutan basal (mengandung makromineral, buffer dan resazurin), larutan vitamin, *reducing agent*, dan larutan

mikromineral. Larutan (aquous) media sebelum penambahan Na_2SO_4 , yeast extract, NaHCO_3 , dan cystein, terlebih dahulu di *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C . Kedalam larutan media yang telah disteril ini, dialirkan gas hingga tekanan 200 kPa dengan komposisi gas CO (50%), N_2 (33%), dan CO_2 (17%). Selanjutnya siap diinokulasi dengan filtrat feses, dan prosedur seterusnya seperti inokulasi filtrat feses kedalam media asetogen pengguna hidrogen-karbon dioksida diatas.

Isolat yang telah teridentifikasi sebagai bakteri asetogenik dikembang biakkan menurut prosedur THALIB *et al.* (2000) sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 1, dan selanjutnya digunakan sebagai inokulum untuk pengujian potensinya sebagai inhibitor metanaogenesis (dengan dan tanpa perlakuan). Pada tahap ini pengukuran/penetapan kandungan asam-asam lemak volatil (VFA) juga dilakukan.



Gambar 1. Penyiapan sediaan kultur bakteri asetogen sebagai inokulum

Inokulum kultur bakteri asetonik pada tahap fermentasi substrat, dilakukan dengan dan tanpa perlakuan. Perlakuan yang diberikan kepada inokulum (dalam media fermentasi) adalah faktor pertumbuhan mikroba (FPM) yang terdiri dari mineral mikro (Cu, Zn, dan Fe^{III}), Vitamin (tiaminhidroklorida, riboflavin, dan asam folat), molases, dan urea dengan level pemberian untuk masing-masing substans di dalam volume media fermentasi sesuai dengan prosedur penggunaan FPM sebelumnya (THALIB *et al.*, 1998) tanpa phenylpropionic acid.

Perlakuan dilanjutkan ke tahap kedua, yaitu penggunaan kultur bakteri asetonik sebagai inokulum yang dikombinasikan dengan cairan rumen domba segar dalam perbandingan volume yang sama, dan kombinasi inokulum ini diuji dengan dan tanpa perlakuan defaunator dan FPM dalam fermentasi substrat. Fermentasi substrat bahan serat (serbuk rumput gajah sebanyak 1 g) dengan inokulum kultur bakteri asetonik dan inokulum cairan rumen domba segar dilakukan menurut prosedur THEODOROU dan BROOKS (1990) yang dimodifikasi (THALIB *et al.*, 2000). Prosedur mencakup inkubasi substrat selama 48 jam dengan 10 ml inokulum dalam media fermentasi pada pH 6,9 dan suhu 39°C. Komposisi media terdiri dari 86 bagian volume larutan basal dan 4 bagian volume larutan pereduksi. Total volume media dan inokulum = 100 ml.

Parameter yang diukur:

Volume gas CH₄ hasil fermentasi substrat bahan berserat diukur menurut prosedur TJANDRAATMADJA (1981). Prosedur mencakup penampungan gas hasil fermentasi dengan siring pengukur volume dan dengan sistem konektor T, gas tersebut diinjeksikan kedalam 2 tabung yang dihubungkan secara serial dan keduanya berisi larutan NaOH 6 N. Selanjutnya gas yang lepas ditampung dengan siring pengukur volume kedua untuk menampung gas CH₄. Produk hasil fermentasi berupa asam-asam lemak volatil (VFA) ditetapkan dengan kromatografi gas (GC Chrompack CP 9002).

Data hasil pengukuran fermentasi substrat rumput gajah (secara *in vitro*) oleh perlakuan inokulum kultur bakteri asetonik dengan dan tanpa kombinasi, dengan 5 ulangan untuk setiap perlakuan, dianalisis berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL). Perbedaan nilai rata-rata antar perlakuan diuji berdasarkan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi isolat bakteri (yang diisolasi dengan media asetonik pengguna hidrogen-karbon dioksida) disimpulkan adalah spesies

Acetoanaerobium noterae, dan hasil identifikasi isolat bakteri (yang diisolasi dengan media asetonik pengguna karbonmonoksida) disimpulkan adalah spesies *Acetobacterium woodii* (Tabel 1). Morfologi dari masing-masing spesies tersebut seperti diperlihatkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Kedua spesies bakteri anaerobik ini tergolong homoasetogen yang bersifat autotropik. Bakteri anaerobik kelompok homoasetogen autotropik pertama kali yang dilaporkan adalah bakteri *A. woodii* (BALCH *et al.*, 1977), setelah itu beberapa spesies lainnya dari golongan bakteri ini juga telah ditemukan, antara lain *Acetogenium kivui* (LEIGH *et al.*, 1981), *Acetobacterium wieringae* (BRAUN dan GOTTSCHALK, 1982), *A. carbinolicum* (FICHLER dan SCHINK, 1984), dan *A. noterae* (SLEAT *et al.*, 1985). Hampir semua bakteri homoasetogenik (termasuk *A. noterae* dan *A. woodii*) menggunakan CO₂ + H₂ sebagai substrat, dan selain substrat CO₂ + H₂, *A. woodii* juga dapat menggunakan CO dan fenilmetileter sebagai substrat (DIEKERT, 1992).

Bakteri homoasetogenik mereduksi CO₂ menjadi asam asetat melalui jalur *acetyl-CoA*, dengan demikian reduksi CO₂ oleh gas H₂ terhambat membentuk CH₄. Berdasarkan prinsip jalur reaksi metabolisme ini maka telah diamati secara *in vitro* komposisi produksi gas metana dalam total volume gas hasil fermentasi substrat oleh inokulum cairan rumen domba segar (CRDF), dan kultur bakteri asetonik (*CA. Noterae* dan *CA. Woodii*) dengan dan tanpa kombinasi, dan hasilnya sebagaimana yang diperlihatkan dalam Tabel 2.

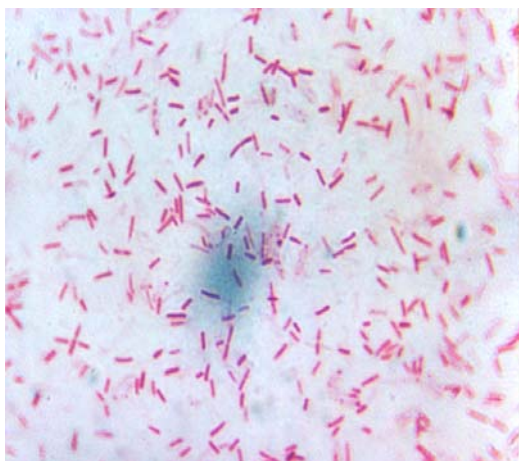
Uji analisis statistik terhadap persentase gas metana dalam volume gas total pada semua perlakuan inokulum yang ditampilkan pada Tabel 2. Produksi gas metana pada semua inokulum kultur bakteri asetonik dengan dan tanpa perlakuan lebih rendah daripada inokulum cairan rumen domba segar (CRDF). Pengaruh FPM terhadap produksi gas metana oleh masing-masing inokulum kultur bakteri memperlihatkan bahwa penambahan FPM pada inokulum *CA. Noterae* dapat menurunkan produksi gas metana dari 24,9 % menjadi 19,8 % (P<0,01), demikian pula penambahan FPM pada inokulum *CA. Woodii* dapat menurunkan produksi gas metana dari 23,2 % menjadi 18,6 % (P<0,01). Hal ini diasumsikan karena pada penambahan FPM terjadi pertumbuhan bakteri yang lebih cepat selama inkubasi, sehingga populasinya meningkat. Asumsi ini didukung oleh data produksi gas total yang dihasilkan oleh inokulum kultur asetonik yang ditambah FPM, bahwa produksi gas total inokulum (*CA. Noterae* + FPM) *versus CA. Noterae* adalah 55 ml *versus* 35 ml, dan produksi gas total inokulum (*CA. Woodii* + FPM) *versus CA. Woodii* adalah 59 ml *versus* 31 ml. Pengaruh FPM terhadap peningkatan populasi dan

Tabel 1. Kesimpulan spesies hasil identifikasi isolat bakteri pada media aseton pengguna H₂-CO₂ dan pengguna CO

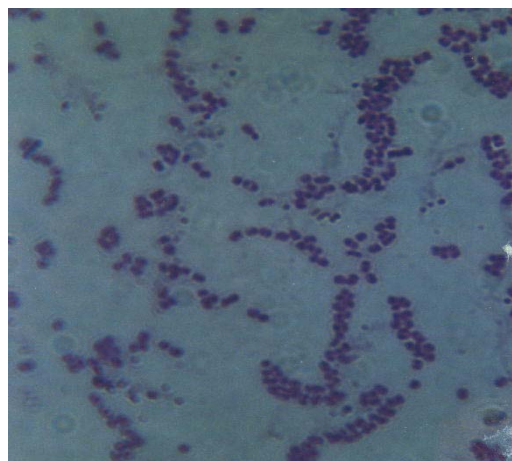
Uji yang dilakukan ^(*)	Hasil pengamatan	
	Media H ₂ -CO ₂	Media CO
A. Pewarnaan		
Gram dan bentuk sel	Gram negatif, bentuk sel batang	Gram positif, bentuk batang-bulat
Spora	Tidak menghasilkan Endospora	Tidak menghasilkan Endospora
B. Pengamatan morfologi		
Pertumbuhan pada medium cair	-	Pertumbuhan terjadi pada bagian dasar tabung (anaerobik)
Pertumbuhan pada agar	-	Effuse: tipis
Koloni pada cawan petri		
bentuk (form)	-	Circular: bulat
pinggiran (margin)	-	Entire: rata
elevasi (elevation)	-	Convex: cembung
C. Motilitas	Motil	Motil
D. Biokimia		
Hidrolisis pati	Negatif	Negatif
Hidrolisis lemak	Negatif	Negatif
Hidrolisis kasein	Negatif	Negatif
Hidrolisis gelatin	Negatif	Negatif
Fermentasi laktosa	Positif (asam)	Positif
Fermentasi sukrosa	Positif (asam)	Positif
Fermentasi glukosa	Positif (asam)	Positif
Triple sugarion	Positif	Positif
Metil merah	Negatif	Positif
Voges-Proskauer	Negatif	Negatif
Indol	Positif	Negatif
Sitrat	Negatif	Positif
H ₂ S	Negatif	Negatif
Urease	Negatif	Negatif
Reduksi nitrat	Negatif	Positif
Katalase	Negatif	Negatif
Susu Litmus	-	Asam, curd, gas, reduksi litmus
E. Kebutuhan oksigen	Anaerobik	-

Kesimpulan dari hasil identifikasi isolat yang diuji pada Media H₂-CO₂ adalah bakteri *Acetoanaerobium noterae* dan Media CO adalah bakteri *Acetobacterium woodii*

(*): HOLT *et al.*, 1994; CAPPUCINO dan SHERMAN, 1987; ATLAS, 1993



Gambar 2. Acetoanaerobium noterae



Gambar 3. Acetobacterium woodii

Tabel 2. Produksi gas CH₄ hasil fermentasi substrat (rumput gajah) dengan Inokulum kultur Asetogen (*A. noterae* dan *A. woodii*) secara *in vitro*

Inokulum (10 ml)	Gas Total (ml)	Gas CH ₄ (ml)	Gas CH ₄ /Gas _{total} (% v/v)
CRDF	119	34,4	28,9 ^c
CA. <i>Noterae</i>	35	8,7	24,9 ^{b*}
CA. <i>Noterae</i> + FPM	55	10,9	19,8 ^{a**}
CA. <i>Woodii</i>	31	7,2	23,2 ^{b**}
CA. <i>Woodii</i> + FPM	59	11,0	18,6 ^{a**}

Nilai rata-rata persentase gas metana dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan. Terhadap kontrol, tanda (*): berbeda nyata ($P < 0,05$) dan (**): berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). CRDF: Cairan rumen segar dari domba berfistula yang diberi pakan rumput gajah dan konsentrat GT.03 (200 g/hari); CA: Kultur isolat bakteri asetogen; FPM: faktor pertumbuhan mikroba

aktivitas bakteri pada sistem fermentasi substrat bersertat oleh mikroba rumen secara *in vitro* telah dilaporkan dalam penelitian sebelumnya (THALIB *et al.*, 1998; 2000). Dengan demikian diharapkan dalam aplikasi di lapang kedua spesies bakteri asetogen ini dapat berkompetisi dengan mikroba rumen hewan ruminansia sehingga dapat memberikan efek aktivitasnya terhadap penurunan produksi gas metana dalam pencernaan rumen. Komposisi produksi gas hasil fermentasi substrat bahan serat oleh inokulum cairan rumen segar (CRDF) dan inokulum CRDF yang dikombinasikan dengan inokulum kultur bakteri asetogen dengan dan tanpa penambahan FPM/(FPM+Defaunator), diperlihatkan dalam Tabel 3.

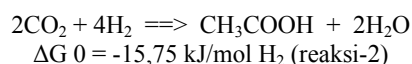
Terhadap persentase gas metana dalam volume gas total pada semua perlakuan inokulum dilakukan analisis statistik, dan hasilnya memperlihatkan bahwa produksi gas metana pada semua inokulum kultur bakteri asetogenik dengan dan tanpa perlakuan lebih rendah daripada inokulum cairan rumen domba segar (CRDF).

Dibandingkan dengan inokulum kontrol CRDF, produksi gas metana oleh semua inokulum perlakuan, (kecuali CRDF + CA.*Woodii*), lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) untuk inokulum (B), (F) dan (G), dan lebih rendah sangat nyata ($P < 0,01$) untuk inokulum (C) dan (D). Hal ini mengindikasikan bahwa sediaan kultur bakteri *A. noterae* dan *A. woodii* dapat melakukan aktivitasnya bersama-sama dengan mix bakteri dari cairan rumen. Berbeda dengan inokulum CRDF + CA.*Noterae*, penurunan produksi gas metana oleh CRDF + CA. *Woodii* tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan inokulum kontrol CRDF. Hal ini diduga karena daya kompetisi *A. woodii* terhadap mix mikroba yang ada dalam cairan rumen domba segar lebih rendah daripada *A. noterae*. Namun bila kedalam masing-masing inokulum campuran cairan rumen domba segar dan sediaan kultur bakteri asetogenik ini ditambahkan FPM terjadi peningkatan penurunan yang lebih besar, yakni dari 23,6% (CRDF + CA.*Noterae*) menjadi 21,0% (CRDF + CA.*Noterae* + FPM) dan dari 24,2%

(CRDF + CA. *Woodii*) menjadi 22,0% (CRDF + CA. *Woodii* + FPM). Penambahan defaunator cenderung meningkatkan penurunan komposisi produksi gas metana masing-masing inokulum campuran (CRDF + kultur asetogenik + FPM), dimana penurunan komposisi produksi gas metana tertinggi diberikan oleh inokulum perlakuan CRDF + CA.*Noterae* + FPM + Defaunator.

Karakteristik homoasetogenik dari bakteri *A. noterae* dan *A. woodii* diuji berdasarkan komposisi produksi VFA yang dihasilkan oleh kedua bakteri ini dalam memfermentasi substrat bahan berserat, dan hasilnya sebagaimana yang tercantum dalam Tabel 4.

Uji statistik yang dilakukan terhadap VFA total dan komposisi molar asam asetat, diperlihatkan bahwa VFA total pada semua perlakuan inokulum kultur asetogenik dengan dan tanpa FPM lebih rendah daripada inokulum cairan rumen domba segar (CRDF). FPM yang ditambahkan pada inokulum CA. *Noterae* dapat meningkatkan konsentrasi VFA total dari 13,1 mM (CA. *Noterae*) menjadi 23,9 mM (CA. *Noterae* + FPM) ($P < 0,01$), demikian pula terhadap CA. *Woodii*, FPM dapat meningkatkan VFA total dari 10,8 mM (CA. *Woodii*) menjadi 21,6 mM (CA. *Woodii* + FPM) ($P < 0,01$). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa FPM dapat meningkatkan kandungan VFA total inokulum mikroba rumen (THALIB *et al.*, 1998; 2000). Reaksi reduksi CO₂ membentuk CH₃COOH oleh bakteri asetogenik berlangsung mengikuti jalur reaksi menurut LJUNGDAHL (1986), seperti berikut ini:



Dilaporkan (GADDY, 1998) bahwa *A. woodii* menghasilkan asam asetat mengikuti reaksi-2, sedangkan *A. noterae* (disamping) menghasilkan asam asetat juga menghasilkan asam propionat dan asam butirat. Komposisi VFA yang diperoleh (Tabel 4) sesuai dengan laporan ini, bahwa fermentasi substrat bahan serat oleh inokulum CA. *Woodii* dengan dan tanpa FPM hanya menghasilkan asam asetat, sedangkan oleh inokulum CA. *Noterae* dengan dan tanpa FPM menghasilkan asam asetat dan juga asam propionat dan asam butirat.

Dengan perlakuan inokulum yang sama seperti pada Tabel 3, komposisi dan total produksi VFA hasil fermentasi substrat bahan berserat diperlihatkan dalam Tabel 5. Dibandingkan terhadap inokulum kontrol (CRDF), produksi VFA total dan komposisi produksi asam asetat secara nyata ($P < 0,05$) menunjukkan lebih tinggi (hanya) pada inokulum (CRDF + CA. *Noterae* + FPM + Defaunator). Walaupun tidak nyata ($P > 0,05$), produksi VFA total dan komposisi produksi asam asetat pada perlakuan inokulum lainnya cenderung lebih tinggi daripada kontrol.

Peningkatan komposisi molar asam asetat oleh inokulum perlakuan (Tabel 5) dan penurunan komposisi gas metana oleh inokulum perlakuan (Tabel 3) berkaitan dengan persamaan reaksi-1 dan reaksi-2. Didalam inokulum rumen terjadi pembentukan gas metana menurut persamaan reaksi-1 dengan adanya bakteri metanaogen, dan pembentukan gas metana akan terhambat atau berkurang bila kedalam inokulum cairan rumen ditambahkan kultur bakteri asetogenik (CA. *Noterae* dan CA. *Woodii*). Adanya perbedaan jumlah

Tabel 3. Persentase produksi gas CH₄ hasil fermentasi substrat (rumput gajah) dengan Inokulum kombinasi kultur Asetogen dengan cairan rumen domba secara *in vitro*

Inokulum (10 ml)	Gas Total (ml)	CH ₄ (ml)	CH ₄ /Gas _{total} (% v/v)	Δ % CH ₄ dari CRDF
A: CRDF	123	32,8	26,7 ^d	0
B: CRDF + CA. <i>Noterae</i> (1:1)	104*	24,5	23,6 ^c *	11,6
C: (B) + FPM	113	23,7	21,0 ^{ab} **	21,3
D: (B) + FPM + Defaunator	118	22,4	19,0 ^a **	28,8
E: CRDF + CA. <i>Woodii</i> (1:1)	110	26,6	24,2 ^{cd}	09,4
F: (E) + FPM	117	25,7	22,0 ^{bc} *	17,6
G: (E) + FPM + Defaunator	127	26,9	21,2 ^{ab} *	20,6

Nilai rata-rata dengan huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan. Terhadap kontrol, tanda (*): berbeda nyata ($P < 0,05$) dan (**): berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). CRDF: Cairan rumen segar dari domba berfistula yang diberi pakan rumput gajah dan konsentrat GT.03 (200 g/hari); CA: Kultur isolat bakteri asetogenik; FPM: faktor pertumbuhan mikroba; Δ %: besarnya penurunan komposisi gas metana perlakuan (B s/d G) dalam % terhadap komposisi gas metana kontrol

Tabel 4. Rataan total dan komposisi kandungan VFA hasil fermentasi substrat (rumput gajah) dengan inokulum kultur asetogen (*A. noterae* dan *A. woodii*) secara *in vitro*

Inokulum (10 ml)	VFA _{total} (mM)	Komposisi VFA (mM)			
		C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
CRDF	65,2 ^d	43,8 ^d	13,9	6,1	1,4
CA. <i>Noterae</i>	13,1 ^{b**}	8,2 ^{a**}	1,4	3,5	0
CA. <i>Noterae</i> + FPM	23,9 ^{c**}	21,5 ^{c**}	0,1	2,2	0,1
CA. <i>Woodii</i>	10,8 ^{a**}	10,8 ^{b**}	0	0	0
CA. <i>Woodii</i> + FPM	21,6 ^{c**}	21,6 ^{c**}	0	0	0

Nilai rata-rata dengan huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan. Terhadap kontrol, tanda (**): berbeda sangat nyata (P<0,01)

CRDF: Cairan rumen segar dari domba berfistula yang diberi pakan rumput gajah dan konsentrat GT.03 (200 g/hari); CA: Kultur isolat bakteri asetogen; FPM: faktor pertumbuhan mikroba

Tabel 5. Rataan total dan komposisi kandungan VFA hasil fermentasi Substrat (rumput gajah) dengan Inokulum kombinasi kultur Asetogen dengan cairan rumen domba secara *in vitro*

Inokulum (10 ml)	VFA total (mM)	Komposisi VFA (mM)				% C ₂ dari VFA total
		C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	
A: CRDF	97,9	66,93	20,86	6,89	3,22	68,37
B: CRDF + CA. <i>Noterae</i> (1:1)	103,8	73,58	21,24	6,54	2,44	70,89
C: (B) + FPM	114,1	82,12	23,53	6,32	2,13	71,97
D: (B) + FPM + Defaunator	122,9*	90,24	23,11	7,47	2,08	73,43*
E: CRDF + CA. <i>Woodii</i> (1:1)	99,6	69,04	20,36	7,28	2,92	69,32
F: (E) + FPM	111,2	78,03	21,46	8,60	3,11	70,17
G: (E) + FPM + Defaunator	115,7	83,07	20,54	8,14	3,95	71,80

Terhadap kontrol, tanda (*): berbeda nyata (P<0,05)

CRDF: Cairan rumen segar dari domba berfistula yang diberi pakan rumput gajah dan konsentrat GT.03 (200 g/hari); CA: Kultur isolat bakteri asetogen; FPM: faktor pertumbuhan mikroba

energi bebas yang dilepaskan oleh kedua reaksi ini dimana reaksi-1 ($\Delta G^0 = -32,75 \text{ kJ/mol H}_2$) menunjukkan lebih eksergonik daripada reaksi-2 ($\Delta G^0 = -15,75 \text{ kJ/mol H}_2$), maka diperlukan daya kompetisi hidup dan tumbuh dari bakteri asetogen (*A. noterae* dan *A. woodii*) yang lebih tinggi daripada bakteri metanaogen. FONTY *et al.* (2007) menyimpulkan dari percobaan mereka bahwa bakteri asetogen reduktif (gram-positive, anaerobic coccobacilli, nama spesies tidak disebut), cukup potensial untuk bekerja menurunkan produksi gas metana dalam sistem pencernaan rumen, namun diperlukan penekanan populasi bakteri metanaogen agar bakteri asetogen reduktif dapat hidup dan tumbuh dalam rumen dengan baik.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi isolat bakteri yang berasal dari rumen rusa hasil isolasi dengan media asetogen pengguna hidrogen-karbon dioksida dan media asetogen pengguna karbonmonoksida masing-masing adalah bakteri *Acetoanaerobium noterae* dan *Acetobacterium woodii*. Kedua spesies bakteri asetogenik ini cukup potensial untuk dapat menghambat metanaogenesis, namun untuk mampu berkompetisi dengan mix bakteri yang terdapat dalam inokulum cairan rumen dibutuhkan faktor pertumbuhan mikroba dan pengurangan populasi bakteri metanaogen melalui defaunasi. Isolat bakteri *A. noterae* dan *A. woodii* dapat berperan sebagai inhibitor metanaogenesis berdasarkan peranannya mengkatalisis

reduksi CO₂ dengan hidrogen membentuk asam asetat. Reaksi ini mereduksi CO₂ dengan H₂ sehingga pembentukan CH₄ menjadi terhambat atau berkurang. Efektivitas kedua spesies bakteri ini sebagai inhibitor metanaogenesis akan mejadi lebih signifikan bila dikombinasikan dengan defaunator dan faktor pertumbuhan mikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- ATLAS, R.M. 1993. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Inc.
- BALCH, W.E., S. SCHOBERTH, R.S. TANNER and R.S. WOLFE. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 355 – 361.
- BOCCAZZI, P. and J.A. PATTERSON, 1995. Potential for functional replacement of methanogenic bacteria by acetogenic bacteria in the rumen environment. IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Sept., 16 – 17, Clermont-Ferrand, France.
- BRAUN, M. and G. GOTTSCHALK. 1982. *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Abt. 1 Org., C3*: 33. p. 368–376.
- CAPPUCCINO, J.G. and N. SHERMAN. 1987. Microbiology: A Laboratory manual. 2nd ed. The Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc.
- DIEKERT, G. 1992. The Acetogenic Bacteria. In: The Prokaryotes, 2nd ed., Vol. 1, A. BALOWS, H.G. TRUPER, M. DWORKIN, W.HARDER and K.H. SCHLEIFER (Eds.) Springer Verlag, New York. p.517–533.
- FICHLER, B. and B. SCHINK. 1984. Oxidation of primary aliphatic alcohol by *Catobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobic. *Arch. Microbiol.* 140: 147 – 152.
- FIEVES, A., F. DOHME, M. DANEELS, K. RAES and D. DEMEYER. 2003. Fish oil as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104: 41–58.
- FONTY, G., K. JOBLIN, M. CHAVAROT, R. ROUX, G. NAYLOR and F. MICHALLON. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6391–6403.
- GADDY, J.L. 2002. Biological production of products from waste gases. US Patent 6340581.
- GEERLINGS, G.H.C., H.C. ALDRICH, W. HARDEN and G. DIEKERT. 1987. Isolation and characterization of a carbonmonoxide utilizing strain of the acetogen *Peptostreptococcus productus*. *Arch. Microbiol.* 148: 305 – 313
- HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY and S.T. WILLIAM. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., The Williams and Wilkins Co., Inc.
- JOUANY, J.P. 1991. Defaunation of the rumen. In: Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. (Ed: J.P. JOUANY). INRA. p. 239 – 261.
- LAY, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. P.T. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- LEEDLE, J.A.Z. and R.C. GREENING, 1988. Postpandial changes in methanogenic and acetogenic bacteria in the rumen of steers fed high or low-forage diets once daily. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 502 – 506.
- LEIGH, J.A., F. MAYER and R.S. WOLFE. 1981. *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* 129: 275 – 280.
- LENG, R.A. 1991. Improving Ruminant Production and Reducing Methane Emissions from Ruminant by Strategic Supplementation. United National Environmental Protection Agency/400/1-91/004, New York.
- LE VAN, T.D., J.A. ROBINSON, J. RALPH, R.C. GREENING, W.J. SMOLENSKI, J.A.Z. LEEDLE and D.M. SCHAEFER. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium population and *Acetitomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3429–3436.
- LJUNGDAHL, L.G., 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 415–450.
- LOPEZ, S., F.M. MCINTOSH, R.J. WALLACE and C.J. NEWBOLD. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 1–9.
- MACHEMULLER, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric. Ecosyst. Environ.* 112: 107 – 114.
- MACKIE, R.I. and M.P. BRYANT, 1994. Acetogenesis and the rumen : syntropic relationships. In : Acetogenesis H.L. DRAKE (Ed.). Chapman and Hall. New York, pp. 331 – 364.
- MILLER, T.L. and M.J. WOLIN. 2001. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-SCoA reductase inhibitors. *J. Dairy Sci.* 84: 1445-1448.
- NEUE, H. 1993. Methane emission from rice fields: Wetland rice fields may make a major contribution to global warming. *BioScience* 43: 466 – 473.
- OBASHI, Y., K. USHIDA, K. MIYASAKI, and K. KOJIMA. 1995. Effect of initial sulfate level on electron partition between methanogenesis and sulfate reduction in the rumen. Sattelite Symposium of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Clermont-Ferrand, France, September 16-17, 1995. p. 42.
- OGIMOTO, K. and S. IMAI. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. *Jap. Sci. Soc. Press*, Tokyo.

- SLEAT, R., R.A. MAH and R.ROBINSON. 1985. *Acetoanaerobium noterae* gen. nov., sp. nov.: An anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 10-15.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1980. Principles and Procedures of Statistic. A Biometrical Approach. McGrawhill Int. Book Co., Singapore.
- THALIB, A. 2004. Uji efektivitas saponin buah *Sapindus rarak* sebagai inhibitor metanaogenesis Secara *in vitro* pada sistem pencernaan rumen. *JITV* 9: 164- 171.
- THALIB, A., B. HARYANTO, S. KOMPIANG, I.W.MATHIUS dan A. AINI. 2000. Pengaruh mikromineral dan fenilpropionat terhadap performans bakteri selulolitik cocci dan batang dalam mencerna serat hijauan pakan. *JITV* 5: 92-99.
- THALIB, A., D. DEVI, Y. WIDIAWATI dan Z.A. MAS'UD. 1998. Efek kombinasi defaunator dengan faktor pertumbuhan mikroba terhadap kecernaan ruminal jerami padi. *JITV* 3: 171-175.
- TJANDRAATMADJA, M. 1981. Anaerobic Digestion of Fibrous Materials. A Thesis of Master of Agricultural Science. University of Melbourne, Australia.
- THEODOROU, M.K. and A.E. BROOKS, 1990. Evaluation of a New Laboratory Procedure for Estimating the fermentation Kinetic of Tropical Feeds. Annual Report AFRC Institute, Hurley, Maidenhead, UK.