

Prasetyo (2010) menjelaskan bahwa proses pembentukan biogas secara umum melalui tiga fase yaitu:

- a. Fase Hidrolisis, merupakan fase penguraian bahan-bahan organik yang mengandung selulosa, hemiselulosa dan bahan ekstraktif seperti, protein, karbohidrat dan lemak menjadi senyawa dengan rantai yang lebih pendek. Sebagai contoh polisakarida terurai menjadi monosakarida, sedangkan protein terurai menjadi peptida dan asam amino. Pada tahap ini, mikroorganisme yang berperan mengeluarkan sejumlah enzim ekstraseluler seperti *selulose*, *amilase*, *protease*, dan *lipase*.
- b. Fase Pengasaman, merupakan fase bakteri akan menghasilkan asam yang berfungsi untuk mengubah senyawa hasil hidrolisis menjadi asam asetat (CH_3COOH), H_2 , dan CO_2 . Bakteri yang berperan merupakan bakteri anaerob yang dapat tumbuh pada keadaan asam dengan pH 5,5 - 6,5. Bakteri tersebut bekerja secara optimum pada temperatur sekitar 30°C . Selain itu, bakteri tersebut juga mengubah senyawa bermolekul rendah menjadi alkohol, asam organik, CO_2 , H_2S , dan CH_4 . Fase pengasaman sering disebut juga fase asidogenik.
- c. Fase Metanogenik, merupakan fase pembentukan gas CH_4 oleh bakteri *methanogenesis* (bakteri metana), yaitu dari jenis *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanosacaria*, dan *Methanococcus*. Bakteri tersebut memerlukan kondisi digester yang benar-benar kedap udara dan gelap. Temperatur optimum bagi bakteri tersebut adalah 35°C dengan kisaran pH

6,5 – 7,5. Hasil akhir metabolisme adalah CH_4 dan CO_2 yang berasal dari gas H_2 , CO_2 , dan asam asetat yang dihasilkan pada fase pengasaman.

2.1.5. Starter EM-4 (*Effective Microorganism-4*)

Effective Microorganism-4 (EM-4) merupakan salah satu bioaktivator yang efektif untuk menginokulasi sampah seperti sampah organik untuk mempercepat proses penguraian. Mikroorganisme yang terdapat dalam EM-4 adalah bakteri asam laktat, ragi, *Actinomycetes*, dan bakteri fotosintesis yang mampu bersimbiosis satu dengan yang lain sehingga efektif dalam menguraikan sampah. Berbagai penelitian terkait penggunaan EM-4 dalam menguraikan materi organik telah banyak dilakukan. Suatu proses pembentukan biogas di dalam digester yang memanfaatkan bakteri sebagai sarana untuk memecah senyawa polimer (dalam hal ini adalah karbohidrat, lemak, dan protein) diperlukan media tambahan untuk membantu mempercepat proses, dan salah satu media yang dapat digunakan untuk membantu mempercepat proses tersebut adalah EM-4 (*Effective Microorganism-4*) (Sundari *et al.*, 2012).

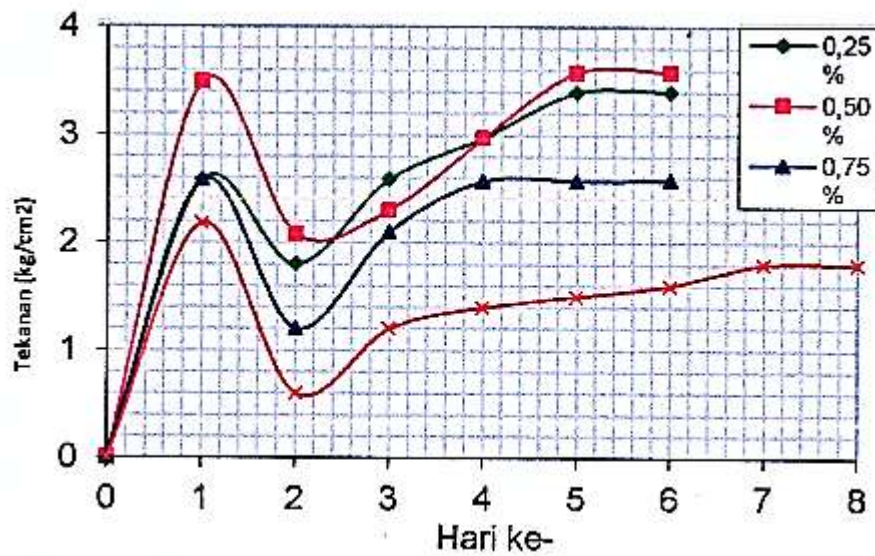
EM-4 merupakan media berupa cairan yang berisi mikroorganisme yang dapat memecah senyawa polimer (dalam hal ini adalah karbohidrat, lemak, dan protein) menjadi senyawa monomernya. Semakin banyak sumber energi yang dihasilkan, sehingga produksi biogas akan semakin tinggi. Hal tersebut akan sangat menguntungkan bagi masyarakat karena semakin tinggi produksi biogas, maka kebutuhan bahan bakar minyak sebagai sumber energi dapat diminimalisir (Megawati & Aji, 2015).

2.1.6. Pengaruh Konsentrasi Penambahan Starter EM-4 pada Laju Pembentukan Biogas Limbah Cair Tahu

Effective Microorganisms-4 (EM-4) adalah salah satu biokatalis yang berpotensi sebagai sumber mikroorganisme dalam pembuatan biogas. Bahan organik difermentasikan dengan bantuan EM-4 untuk kemudian melepaskan hasil-hasil fermentasi berupa gula, alkohol, vitamin, asam laktat, asam amino dan senyawa organik lainnya (Wididana *et al.*, 1996 dalam Hidayat *et al.*, 2012).

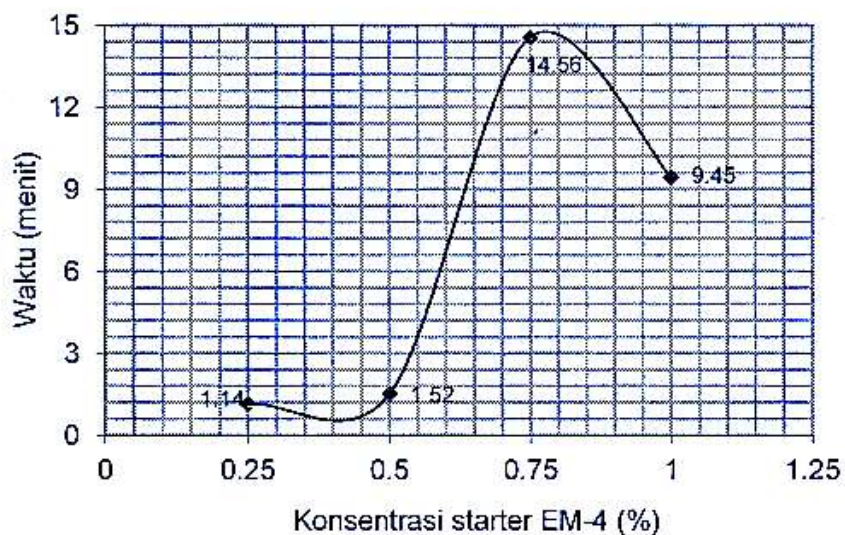
Penambahan EM-4 bertujuan untuk memperpendek fase adaptasi atau fase lag dari mikroorganisme saat permulaan proses degradasi, sehingga dari segi waktu proses pendegradasian akan semakin cepat dan efisien. Disamping itu, penambahan EM-4 secara teknis mudah didapatkan di pasaran dan harganya relatif murah (Paturohman, 2009 dalam Hidayat *et al.*, 2012).

Hidayat *et al.* (2012), menjelaskan bahwa produksi biogas dari limbah cair industri tahu dengan biokatalisator EM-4 dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan pada perbedaan konsentrasi EM-4. Konsentrasi EM-4 yang diujikan adalah 0,25%; 0,5%; 0,75%; dan 1%. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak dua kali. Penambahan EM-4 sebagai starter untuk produksi biogas ternyata mempercepat pembentukan biogas secara signifikan (**Gambar 2.2.**).



Gambar 2.2. Grafik hubungan penambahan starter EM-4 terhadap pembentukan Biogas (Hidayat *et.al.*, 2012).

Banyaknya mikroorganisme yang bersaing mengakibatkan proses degradasi bahan organik menjadi kurang sempurna sehingga gas metana yang dihasilkan tidak optimal (**Gambar 2.3.**)



Gambar 2.3. Grafik hubungan antara penambahan starter EM-4 pada berbagai konsentrasi terhadap lama waktu pembakaran biogas. (Hidayat *et.al.*, 2012).

Pembakaran biogas tertinggi diperoleh pada penambahan konsentrasi starter EM-4 sebanyak 0,75% (Gambar 2.3). Nyala api berwarna biru yang dihasilkan menunjukkan bahwa proses pembakaran cukup sempurna. Grafik pembakaran biogas pada Gambar 2.3 konsisten jika dibandingkan dengan grafik pembentukan biogas pada Gambar 2.2. Terdapat dua kelompok, kelompok pertama adalah konsentrasi EM-4 0,25% dan 0,5% sedangkan kelompok kedua adalah konsentrasi EM-4 0,75% dan 1%. Pada kelompok pertama, meskipun tekanan gas yang dihasilkan tinggi tetapi waktu yang diperlukan untuk membakar habis biogas hanya sebentar yaitu 1 menit 14 detik untuk konsentrasi EM-4 0,25% dan 1 menit 52 detik untuk konsentrasi EM-4 0,50%. Masih banyaknya gas selain metana yang dihasilkan oleh mikroorganisme diduga menjadi penyebab tingginya tekanan yang dihasilkan. Proses pendegradasian bahan organik yang lambat mengakibatkan gas yang dihasilkan pun menjadi tidak seragam. Pada kelompok kedua, meskipun tekanan gas yang dihasilkan tampak lebih rendah tetapi menghasilkan waktu pembakaran yang cukup lama yaitu 14 menit 56 detik untuk konsentrasi EM-4 0,75% dan 9 menit 45 detik untuk konsentrasi EM-4 1%. Pada kelompok ini gas yang terbentuk di dalam digester sebagian besar adalah metana. Hal tersebut terlihat dari waktu pembakaran yang lebih lama dibandingkan kelompok pertama. Pada konsentrasi EM-4 1% terlihat tekanan gas dan waktu pembakaran menjadi menurun dibandingkan konsentrasi EM-4 0,75%. Kondisi ini disebabkan banyaknya mikroorganisme yang terlibat dalam degradasi bahan organik sehingga proses degradasi menjadi kurang sempurna. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa produksi biogas optimum dengan volume substrat 20 liter terjadi pada perlakuan EM-4 konsentrasi 0,75%.

2.1.7. Uji Biokimia

Uji Biokimia merupakan pengujian yang dilakukan dengan berbagai metode uji agar mengetahui kemampuan mikroba secara fisiologis maupun biokimia dalam berbagai aktivitas metabolisme sebagai dasar indentifikasi. Sifat metabolisme mikroba dalam uji biokimia dapat dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen kimia yang digunakan (Waluyo, 2007 dalam Azizah, 2016).

Uji biokimia sebagai dasar identifikasi dapat meliputi: uji indol (mengetahui kemampuan mikroba menghasilkan indol dari *tryptophan*); uji fermentasi karbohidrat (mengetahui kemampuan mikroba dalam memanfaatkan karbohidrat meliputi: glukosa, laktosa, dan sukrosa); uji *methil red* (mengetahui kemampuan mikroba dalam mempertahankan produk akhir asam stabil dari hidrolisis glukosa); uji *voges proskuer* (mengetahui kemampuan mikroba dalam memproduksi senyawa non acidic); uji penggunaan sitrat (mengetahui kemampuan mikroba dalam memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon); uji katalase (mengetahui kemampuan mikroba dalam menghidrolisis senyawa H_2O_2); dan uji urease (mengetahui kemampuan mikroba dalam menghidrolisis urea) (Cappucino & Sherman, 1987).

2.1.8. Identifikasi dan Karakterisasi Mikroba

Identifikasi dan determinasi suatu biakan murni bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi dapat dilakukan melalui pengamatan ciri-ciri morfologi koloni serta pengujian fisiologi dan biokimianya. Mengidentifikasi suatu bakteri dapat dilakukan dengan mengamati karakteristik makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia bakteri tersebut. Karakteristik makroskopis yang dapat diamati meliputi bentuk koloni yaitu berbentuk bulat, titik, tidak teratur, seperti akar dan berfilamen atau berbenang serta kumbaran. Tepi koloni dapat berbentuk utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang dan keriting. Warna koloni terdiri dari keputihan, kekuningan, kemerahan, cokelat, jingga, orange, pink, hijau dan ungu. Elevasi koloni meliputi rata, timbul datar, melengkung dan cembung. Struktur koloninya halus mengkilat, kasar, berkerut atau kering seperti bubuk. Selain itu, ukurannya pun beragam dapat dilakukan dengan mengukur diameter dari koloni bakteri yang tumbuh (Irianto, 2012).

Karakteristik mikroskopis yang diamati meliputi bentuk sel, ukuran sel, dan pewarnaan. Bentuk sel bakteri seperti berbentuk batang (basil), bulat (kokus), dan spiral dengan masing-masing kombinasinya. Pengukuran sel bakteri secara mikroskopis dapat dilakukan dengan micrometer sedangkan pewarnaan yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora (Cappucino & Sherman, 1987).

a. Ukuran Bakteri

Ukuran bakteri sangat kecil, umumnya bentuk tubuh bakteri dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x atau lebih. Satuan ukuran tubuh bakteri adalah micrometer atau micron. Satu *micron* (μ) sama dengan 1/1000 milimeter (mm). panjang tubuh bakteri antara 1-2 μ sedangkan lebarnya antara 2-5 μ (Pelczar & Chan, 2013). Bakteri yang berumur 2-6 jam umumnya lebih besar dari bakteri yang berumur lebih dari 24 jam (Waluyo, 2004). Bakteri berbentuk kokus mempunyai diameter 0,5 μ ada pula yang berdiameter 2,5 μ , sedangkan panjang 1-1,5 μ (Dwidjoseputro, 2010).

b. Bentuk Bakteri

Sel-sel individu bakteri mempunyai beragam variasi bentuk seperti bulat (kokus), batang (basil) dan spiral (spirillum). Masing-masing bentuk atau ciri dapat mencirikan morfologi suatu spesies (Pelczar & Chan, 2013).

1) Kokus

Bentuk sel bakteri yang berbentuk bulat seperti bola-bola kecil. Sel bakteri yang berbentuk kokus ini muncul dalam beberapa penataan yang khas bergantung pada spesiesnya (Pelczar & Chan, 2013). Kokus dibedakan menjadi beberapa kelompok, yaitu: monokokus yang berbentuk bola tunggal, diplokokus yang membentuk bola bergandengan dua-dua, sarkina berbentuk bola berkelompok empat-empat menyerupai kubus, *streptococcus* berbentuk bola berkelompok memanjang membentuk rantai dan

staphilococcus yang berbentuk bola berkoloni membentuk sekelompok sel tidak teratur sehingga mirip dompolan buah anggur (Irianto, 2012).

2) Basil

Bentuk sel bakteri yang berbentuk seperti batang dinamakan basilus.

Ujung beberapa basilus ada yang tampak persegi, ada yang bundar dan ada pula yang meruncing atau lancip seperti cerutu. Basilus juga ada yang saling melekat satu dengan lainnya, ujung dengan ujung sehingga memberikan penampilan rantai (Pelczar & Chan, 2013). Basil dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok berdasarkan jumlah koloni, yaitu: monobasil yakni sel bakteri yang berbentuk satu batang tunggal, diplobasil yakni sel bakteri berbentuk batang bergandeng dua-dua dan streptobasil yakni berbentuk batang yang bergandeng memanjang membentuk rantai (Irianto, 2012).

3) Spiral (Spirillum)

Bentuk sel bakteri yang berbentuk melilit atau berbengkok-bengkok dinamakan spirillum. Terdapat 3 macam bentuk spiral, yaitu: spiral yakni sel bakteri yang bentuknya seperti spiral dan tubuhnya kaku, vibrio berbentuk koma dianggap sebagai bentuk spiral tak sempurna, serta spirochaeta yakni sel bakteri yang berbentuk spiral dan tubuhnya bersifat lentur (Irianto, 2012).

c. Pewarnaan Gram

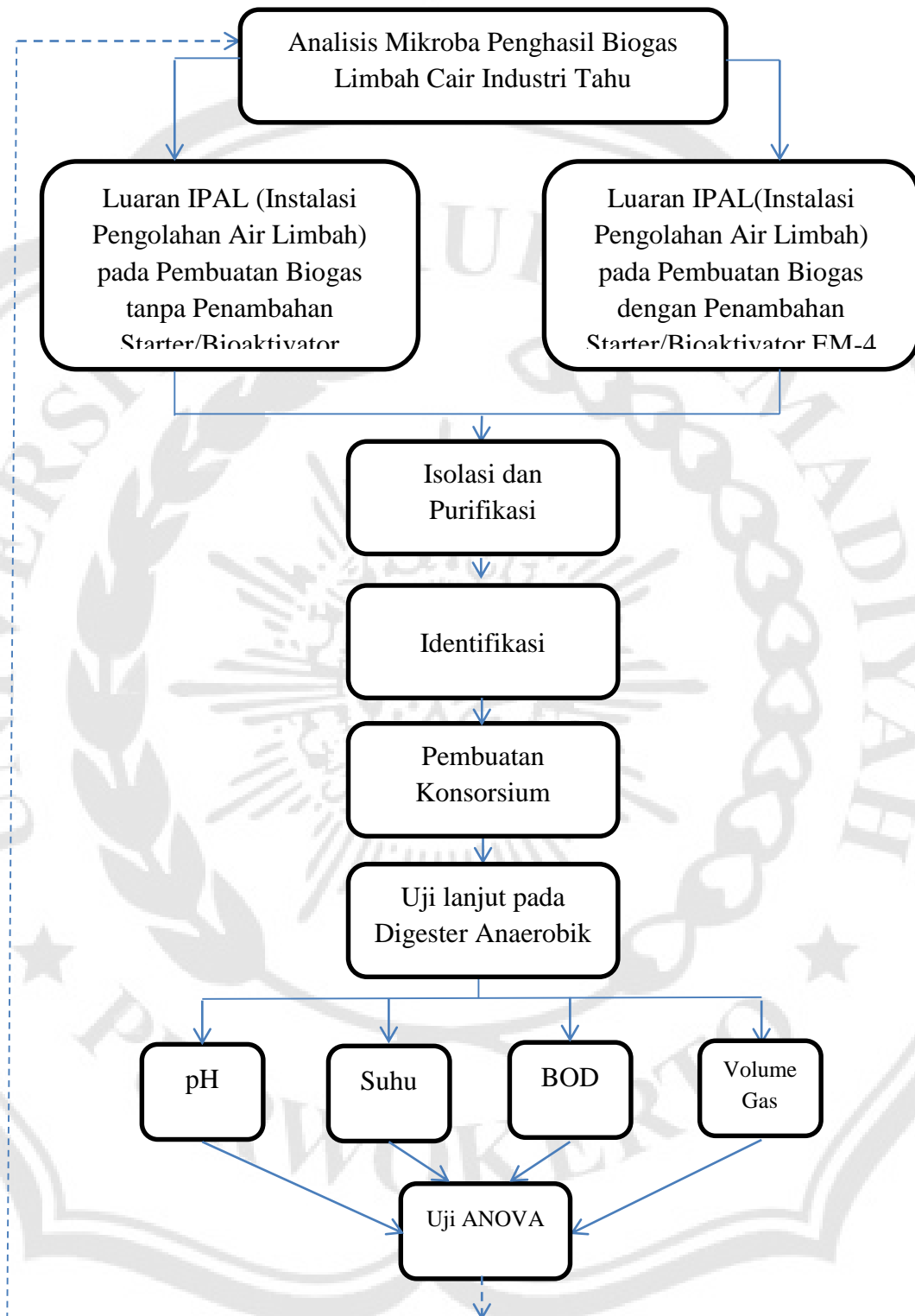
Sebagian besar mikroorganisme tidak berwarna, maka untuk dapat melakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya diperlukan pewarnaan mikroorganisme dengan menggunakan pewarna. Pewarnaan mikroorganisme

pada dasarnya adalah prosedur mewarnai mikroorganisme menggunakan zat warna yang dapat menonjolkan struktur tertentu dari mikroorganisme. Sebelum mikroorganisme dapat diwarnai, mikroorganisme tersebut harus terlebih dahulu difiksasi agar terikat pada kaca objek. Tanpa adanya fiksasi, maka pemberian zat warna pada mikroorganisme yang dilanjutkan dengan prosedur pencucian zat warna dengan air mengalir dapat menyebabkan mikroorganisme ikut tercuci (Brown, 2005).

Pewarnaan diferensial menggunakan lebih dari satu pewarna dan memiliki reaksi yang berbeda untuk setiap bakteri sehingga digunakan untuk membedakan bakteri. Pewarna differensial yang sering digunakan adalah pewarna Gram. Pewarna Gram mampu membedakan dua kelompok besar bakteri, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Pada pewarnaan Gram, bakteri yang telah difiksasi dengan panas dapat membentuk noda pada kaca objek yang diwarnai dengan pewarna basa yaitu kristal ungu. Warna ungu dari kristal ungu akan memenuhi semua sel maka pewarnaan ini disebut pewarnaan primer. Selanjutnya pewarna dicuci dan pada noda specimen ditetesi iodine yang merupakan mordant (penajam). Setelah iodin dicuci, baik bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif akan tampak berwarna ungu. Selanjutnya noda specimen dicuci dengan alkohol yang merupakan senyawa peluntur warna yang pada spesies bakteri tertentu dapat menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah alkohol dicuci, noda spesiemen diwarnai kembali dengan safranin yang merupakan pewarna basa berwarna merah. Bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan dalam bakteri Gram positif sedangkan bakteri yang

berwarna merah digolongkan ke dalam bakteri Gram negatif. Perbedaan warna tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan struktur pada dinding selnya. Dinding sel bakteri Gram positif lebih banyak mengandung peptidoglikan sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif banyak mengandung liposakarida. Kompleks Kristal ungu-iodin yang masuk ke dalam sel bakteri Gram positif tidak dapat tercuci oleh alkohol karena adanya lapisan peptidoglikan yang kokoh pada dinding sel, sedangkan pada bakteri Gram negatif, alkohol akan merusak lapisan lipopolisakarida. Komplek kristal ungu-iodin pada bakteri Gram negatif dapat tercuci dan menyebabkan sel bakteri tampak transparan yang akan bewarna merah setelah diberi safranin (Pratiwi, 2008). Lebih lanjut pewarnaan khusus digunakan untuk mewarnai dan mengisolasi bagian spesifik dari mikroorganisme misalnya endospora, kapsul dan flagella. Endospora bakteri tidak dapat diwarnai dengan metode pewarnaan sederhana seperti pada pewarnaan Gram. Hal ini disebabkan endospora memiliki selubung yang kompak sehingga zat warna sulit menembus dinding endospora dan diperlukan pemanasan serta mordant untuk mengikat zat warna.

2.2. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Bagan Kerangka Konsep.