

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, erlenmeyer, bunsen, gelas ukur, tabung reaksi, *vorteks mixer*, jarum ose, otoklaf, *laminar air flow*, *hot plate stirrer*, mikroskop, lemari es, oven, pot gerabah, neraca analitik, mikropipet, inkubator bakteri, mikrotip, dan alat pendukung lainnya.

Sebagai bahan untuk penelitian digunakan sampel tanah di sekitar plastik hitam dari TPA Sampah Bakung Kecamatan Teluk Betung Barat Kota Bandar Lampung yang dilihat secara fisik telah hancur atau rapuh. Selain itu digunakan sampel plastik cap mawar untuk uji kemampuan biodegradasi isolat bakteri kandidat, alkohol 70%, cat Gram, cat spora, garam fisiologis, Nutrien Agar (NA), Nutrien Broth (NB), spiritus, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, dan aquades.

### C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun dengan metode rancangan pengacakan RAKL (Rancangan Acak Kelompok Lengkap) dan rancangan perlakuan faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah isolat bakteri hasil dari isolasi dan faktor kedua adalah interval waktu inkubasi plastik hitam yaitu 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 hari. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh dilakukan analisis ragam Anova pada  $\alpha$  (5%) kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi  $\alpha$  (5%). Hasil karakterisasi bakteri pendegradasi plastik hitam di jelaskan secara deskriptif.

### D. Prosedur Kerja

#### 1. Pengambilan sampel

Bahan sampel uji adalah tanah disekitar plastik hitam yang telah hancur atau rapuh. Sampel dimasukkan kedalam wadah yang telah disterilisasi, kemudian dilakukan isolasi bakteri.

#### 2. Isolasi bakteri pendegradasi plastik hitam

Sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril kemudian dihomogenkan dengan *vortek mixer* sehingga didapat pengenceran  $10^{-1}$ , kemudian dengan cara yang sama dibuat pengenceran suspensi hingga  $10^{-6}$ . Masing-masing suspensi pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-6}$  diambil 1 ml untuk diinokulasikan pada

media NA secara *pour plate*, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu lingkungan. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya di pilih berdasarkan perbedaan karakteristik morfologinya untuk dijadikan isolat bakteri kandidat, selanjutnya dilakukan *streak kuadran* untuk mendapatkan isolat bakteri murni.

### 3. Uji biodegradasi

Plastik hitam dimasukkan ke dalam pot-pot kecil yang berisi tanah steril. Pada masing-masing pot diinokulasikan isolat murni bakteri kandidat kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan interval waktu 0, 5, 10,15, 20, 25, dan 30 hari (Windadri, 1988). Adanya degradasi plastik oleh isolat bakteri kandidat dapat diketahui dengan mengukur parameter-parameter sebagai berikut:

#### 1. Persentase kehilangan berat plastik

Menurut Iswanto, Surdia, dan Arcana (2002) penentuan persentase kehilangan berat dilakukan dengan menimbang berat plastik sebelum uji biodegradasi dan berat plastik setelah uji biodegradasi kemudian dihitung persentase kehilangan beratnya.

$$\% \text{ kehilangan berat} = \frac{\text{berat awal plastik} - \text{berat akhir plastik}}{\text{berat awal plastik}} \times 100\%$$

#### 2. Regangan plastik

Menurut Windadri (1988), besar regangan plastik diketahui dengan mengukur panjang plastik awal dan panjang plastik setelah diberi beban tertentu, kemudian dihitung besar regangan plastik tersebut.

$$\text{Besar regangan} = \frac{\text{panjang akhir plastik} - \text{panjang awal plastik}}{\text{panjang awal plastik}}$$

#### **4. Karakterisasi Bakteri**

##### **a. Pengamatan morfologi koloni**

Pengamatan morfologi koloni bakteri yang dilakukan meliputi: bentuk pertumbuhan koloni bakteri pada medium miring, bentuk pertumbuhan koloni bakteri pada agar tegak, dan melihat morfologi koloni bakteri pada agar lempeng baik bentuk, tepian, elevasi, ukuran, serta warna koloni.

##### **b. Pengamatan mikroskopik**

Pengamatan mikroskopik yang dilakukan meliputi :

###### **1. Pewarnaan Gram**

Gelas benda dibersihkan menggunakan alkohol dan dikeringkan di atas api spiritus. Diatas gelas benda ditetesi 3 ose aquades secara aseptis, kemudian diambil 1 ose biakan bakteri lalu diratakan pada gelas benda hingga membentuk lapisan tipis, dikeringkan dengan cara fiksasi. Lapisan biakan bakteri ditetesi Gram A secara berlebihan dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali. Setelah kering, preparat ditetesi dengan Gram B dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian cuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Cuci dengan Gram C selama 30 detik dan dikeringkan kembali. Preparat ditetesi Gram D secara

berlebihan, di diamkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir (Margareth, 1998).

## 2. Pewarnaan spora

Gelas benda dibersihkan menggunakan alkohol dan dikeringkan di atas api spiritus. Diatas gelas benda ditetesi 3 ose aquades secara aseptis, kemudian diambil 1 ose biakan bakteri lalu diratakan pada gelas benda hingga membentuk lapisan tipis, dikeringkan dengan cara fiksasi. Lapisan biakan bakteri ditetesi dengan malchit green secara berlebihan selama 10 menit. Setelah itu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian preparat ditetesi dengan safranin selama 5 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan (Margareth, 1998).

### c. Uji pertumbuhan berdasarkan kebutuhan oksigen

Masing-masing biakan murni bakteri diinokulasikan pada medium NB, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Diamati pola pertumbuhan bakteri berdasarkan kebutuhan oksigen.

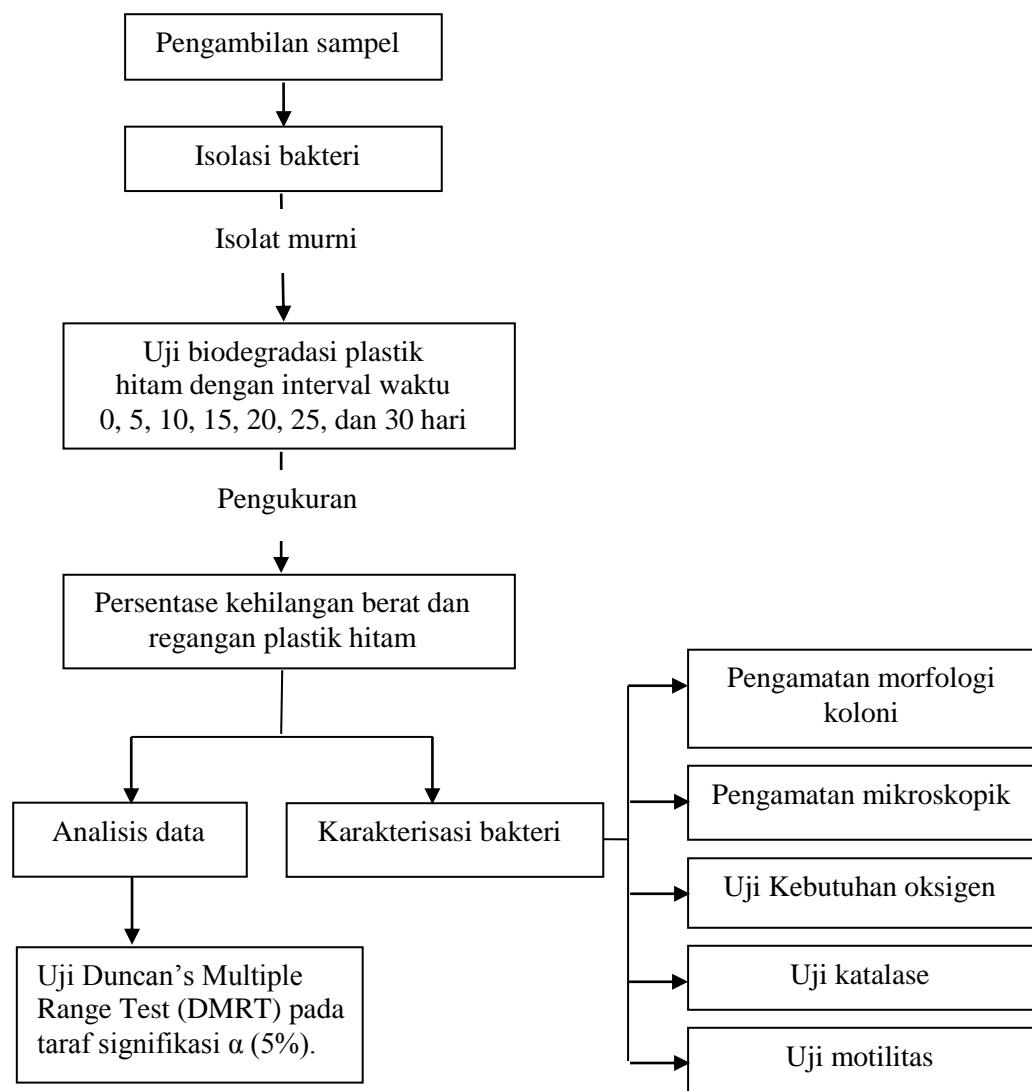
### d. Uji katalase

Larutan  $H_2O_2$  3% diletakkan pada objek glass kemudian diberi isolat bakteri menggunakan jarum ose. Jika terbentuk gelembung-gelembung kecil maka bakteri tersebut bersifat katalase positif.

### e. Uji motilitas

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasi pada medium SSM (*Semi Solid Medium*) tegak, kemudian diinkubasi pada suhu lingkungan selama 48 jam. Hasil positif jika terdapat rambatan-rambatan disekitar bekas tusukan jarum ose.

## E. Diagram Alir Penelitian



**Gambar 3. Bagan prosedur isolasi dan karakterisasi bakteri pendegradasi plastik hitam**