



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENAPISAN BAKTERI PENGHASIL BIOPLASTIK POLI  
(3-HIDROKSIBUTIRAT) DARI SAMPEL TANAH HUTAN  
PENDIDIKAN DAN PENELITIAN BIOLOGI, KAMPUS UNAND,  
LIMAU MANIS, PADANG**

**SKRIPSI**



**FAKHRIZAL HARIANTO  
07 133 065**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2011**

*I Dedicate this Manuscript to  
My Inspiration Mama Suryawinati*

*And Alm Papa Wahdizem...*

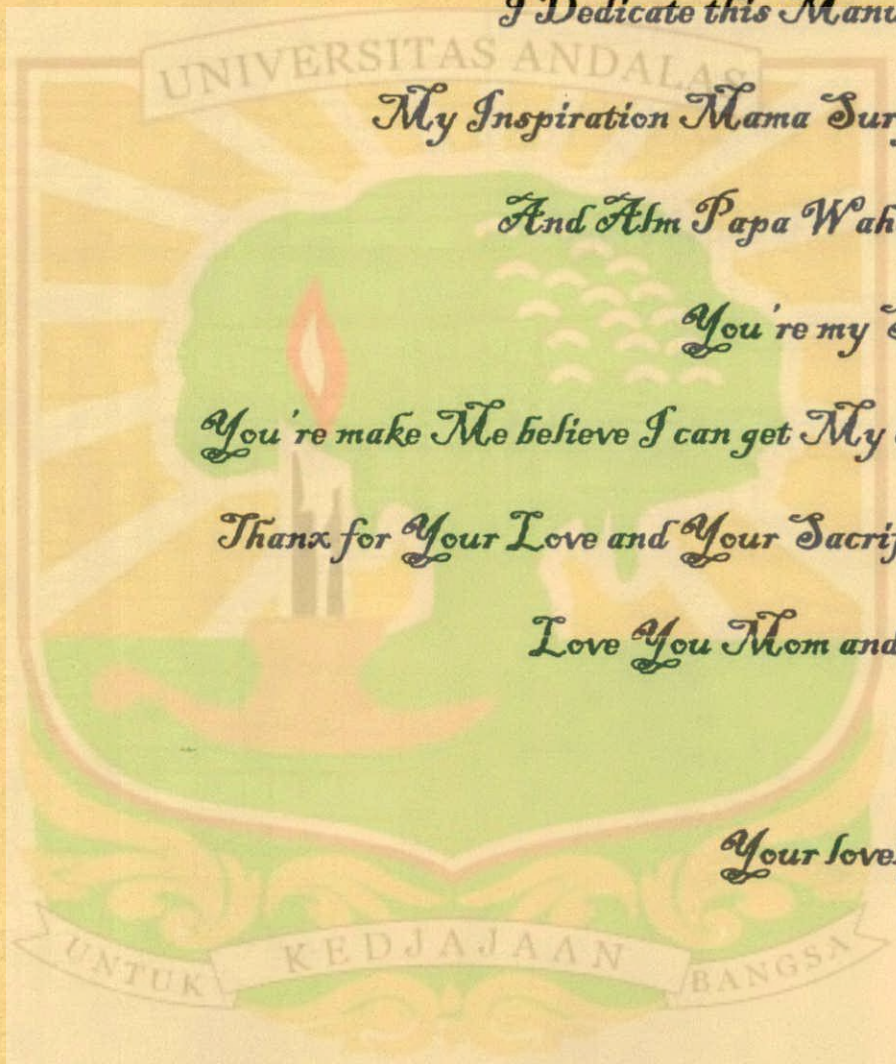
*You're my Spirit...*

*You're make Me believe I can get My dream...*

*Thank for Your Love and Your Sacrifice to me*

*Love You Mom and Dad...*

*Your lovely son...*



## KATA PENGANTAR

Assalammu'alaikum Warahmatullah Wabarakatuh

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang merupakan salah satu syarat mendapatkan gelar sarjana science dalam bidang studi biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Shalawat beriring salam senantiasa disampaikan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW, sebagai suri tauladan yang baik bagi seluruh alam.

Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan di Laboratorium Biota Sumatera bagian Bioteknologi Universitas Andalas dan Laboratorium Mikrobiologi dan Mikologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas dalam mata kuliah Mikrobiologi dengan judul "Penapisan Bakteri Penghasil Bioplastik Poli(-3-Hidroksibutirat) dari Sampel Tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi, Kampus Unand, Limau Manis, Padang".

Penulis mengucapkan terima kasih pada bapak Dr. Anthoni Agustien, M.S selaku pembimbing I dan bapak Prof. Dr. Akmal Djamaan, M.S. Apt selaku Pembimbing II. Yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan kepada penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan pada:

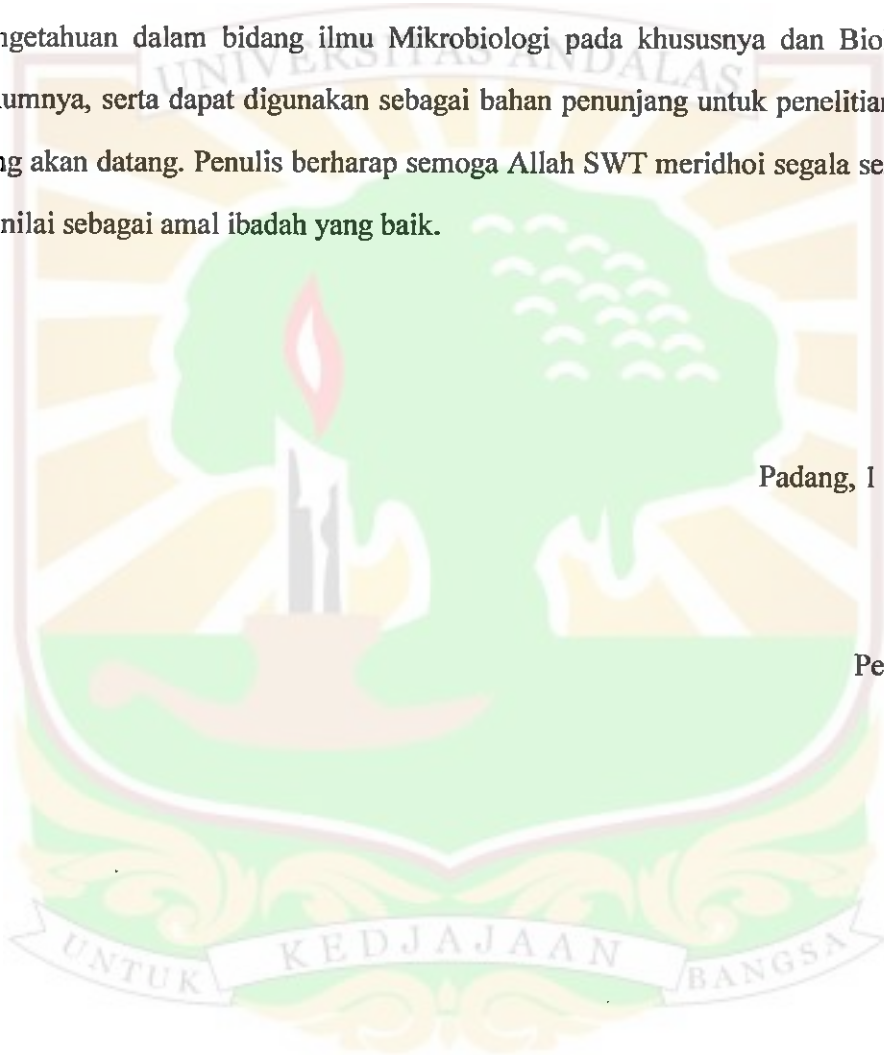
1. Ketua Jurusan Biologi, Universitas Andalas
2. Kepala laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Universitas Andalas
3. Kepala laboratorium Biota Sumatera, Universitas Andalas
4. Ibu Netty W.S, M.S selaku pembimbing akademik

5. Bapak/ Ibu pengajar staf Jurusan Biologi, Universitas Andalas
6. Civitas akademi Jurusan Biologi, Universitas Andalas
7. Serta semua pihak yang membantu dan mendukung penelitian dan penulisan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan memberikan kontribusi pengetahuan dalam bidang ilmu Mikrobiologi pada khususnya dan Biologi pada umumnya, serta dapat digunakan sebagai bahan penunjang untuk penelitian di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga Allah SWT meridhoi segala sesuatu dan menilai sebagai amal ibadah yang baik.

Padang, 1 Juli 2011

Penulis



## ABSTRAK

Penelitian mengenai Penapisan Bakteri Penghasil Bioplastik Poli (-3-Hidroksibutirat) dari Sampel Tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi, Kampus Unand, Limau Manis, Padang telah dilaksanakan dari bulan November 2010 sampai Mei 2011 di Laboratorium Biota Sumatera Bagian Bioteknologi Universitas Andalas dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Penelitian ini menggunakan metoda deskriptif. Deteksi bakteri penghasil bioplastik dengan menggunakan metoda Nile Blue-A. Kandungan P(3HB) dalam sel bakteri diekstraksi dengan kloroform. Penentuan Kandungan P(3HB) dalam sel bakteri dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Gas (GC-MS). Empat puluh isolate bakteri terindikasi menghasilkan P(3HB), isolate BFA-21 mengandung P(3HB) tertinggi 1.8%. isolate BFA-21 memiliki karakteristik koloni bulat, berwarna kuning, motil dengan bentuk sel basil dan termasuk gram positif.



## ABSTRACT

The screening of bacteria producing P(3HB) from soil sample Hutan Pendidikan dan penelitian Biologi, Kampus Unand, Limau Manis, Padang have been carried out on November 2010 until Mei 2011. Research was done at Biota Sumatra Laboratory, Biotechnology division and Microbiology and Micology Laboratory, Biology Departmen, Faculty of Mathematics and Natural Science, Andalas University. By using Descriptive method. Detection biodegradable plastic producing bacterial with Nile Blue-A method. The P(3HB) content on cell bacteria were extracted by chloroform. The number content of P(3HB) on cell bacteria were done with Gas-Mass Spectra Chromatography (GC-MS). Fourthy isolates bacteria indication produce P(3HB), bacteria isolate BFA-21 is the highest of P(3HB) content 1.8%. Isolate BFA-21 have characteristic round colony, yellow colored, motil, shape cell bacil and positive Gram.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK .....	iii
ABSTRACT .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
<b>I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan dan Manfaat .....	4
1.4. Hipotesis .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Tanah dan Komposisi Tanah .....	5
2.2. Komposisi Mikroba Tanah .....	5
2.3. Defenisi Bioplastik .....	6
2.4. Poli Hidroksialkanoat (PHA) .....	7
2.5. Poli (-3_Hidroksibutirat) .....	8
2.6. Biosintesis Poli Hidroksialkanoat (PHA) dan Poli (3-Hidroksibutirat) .....	9
<b>III. PELAKSANAAN PENELITIAN</b>	
3.1. Waktu dan Tempat .....	12
3.2. Metoda Penelitian .....	12

3.3. Bahan dan Alat.....	12
3.4. Pengambilan Sampel.....	12
3.5. Pembuatan medium.....	13
3.5.1. Medium Nutrien Agar (NA).....	13
3.5.2. Medium Glukosa Agar Nisbah C/N = 20.....	13
3.5.3. Larutan Nile Blue-A.....	13
3.5.4. Medium Produksi Bioplastik .....	13
3.6. Pemiakan Sampel di Laboratorium.....	14
3.7. Inokulasi Bakteri dalam Medium Glukosa Agar Nisbah C/N = 20 .....	14
3.8. Deteksi Bakteri Penghasil Bioplastik (P3HB) .....	14
3.9. Pemurnian dan Penyimpanan Stok Bakteri Penghasil Bioplastik .....	14
3.10. Penghasilan Biomassa Bakteri.....	14
3.11. Penentuan Kandungan P(3HB) dalam Sel Bakteri .....	15
3.12. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri .....	15
3.12.1. Pengamatan Makroskopis .....	15
3.12.2. Pengamatan mikroskopis .....	15
3.13. Analisa Data.....	16
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1. Bakteri Penghasil Bioplastik dengan Metoda Nile Blue-A .....	17
4.2. Biomassa Bakteri .....	20
4.3. Kandungan P(3HB) dalam Sel Bakteri.....	22
4.4. Makroskopis dan Mikroskopis.....	26
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1. Kesimpulan .....	30



5.2. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA .....	31
LAMPIRAN.....	36



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>halaman</b>
1. Isolat bakteri yang berasal dari HPPB penghasil bioplastik .....	17
2. Tabel Biomassa Bakteri .....	20
3. Kandungan P(3HB) dalam sel Bakteri.....	24
4. Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri .....	26
5. Pengamatan Mikroskopis Bakteri .....	28



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>halaman</b>
1. Struktur Kimia PHA.....	8
2. Struktur Kimia P(3HB).....	9
3. Jalur Biosintesis P(3HB) pada <i>Alcaligenes eutrophus</i> .....	10
4. Deteksi Bakteri Penghasil Bioplastik Secara Nile Blu-A dibawah sinar uv .....	11
5. Kromatogram P(3HB) murni .....	23
6. Kromatogram P(3HB) sampel .....	23
7. Hitogram biomassa, persentase P(3HB) dan pH.....	25
8. Bentuk makroskopis koloni bakteri BFA 21.....	27
9. Motilitas bakteri yang ditumbuhkan pada medium NA semi solid .....	27
10. Bentuk Mikroskopis sel bakteri BFA 21.....	29
11. Isolat bakteri penghasil P(3HB).....	42
12. Ekstrak sel bakteri.....	42
13. Ekstrak bioplastik.....	43
14. Penghasilan biomassa bakteri setelah fermentasi .....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Jadwal penelitian.....	36
2. Denah hutan pendidikan dan penelitian biologi (HPPB).....	36
3. Skema kerja.....	37
4. Pengamatan makroskopis.....	38
5. Pengamatan mikroskopis .....	39
6. Perhitungan kadar P(3HB) sampel.....	40
7. Dokumentasi kegiatan.....	42



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Plastik sudah digunakan sejak 50 tahun lalu, namun penggunaannya meningkat tajam sejak 25 tahun terakhir seiring dengan perubahan gaya hidup masyarakat menjadi semakin konsumtif. Plastik memiliki sifat yang ringan, transparan, murah, isolator yang baik, mudah dibentuk, dan dapat dimodifikasi sesuai dengan keperluan telah menjadikan plastik sebagai bahan yang paling banyak digunakan oleh manusia (Khoiri, 2007). Pemakaian plastik sintetis yang semakin meluas ini telah menimbulkan masalah pencemaran alam yang serius, karena plastik ini tidak dapat diuraikan secara alami (Djamaan, 2011). Diperkirakan lebih dari satu juta hewan laut mati setiap tahunnya akibat terjerat atau terhalang oleh sisa – sisa plastik yang berada didalam maupun yang terapung di air laut (Lee, 1996).

Selain dibuang, terkadang sampah plastik tersebut juga dibakar oleh masyarakat. Pembakaran plastik dapat melepaskan asap beracun seperti adipat dan ftalat yang bersifat karsinogen, dan proses produksinya juga menghasilkan polusi dalam jumlah yang besar seperti vinil klorida. Senyawa – senyawa akibat pembakaran plastik ini bila terhirup oleh manusia akan menyebabkan berbagai penyakit pada manusia, seperti: memicu penyakit kanker, hepatitis, pembengkakan hati, gangguan sistem syaraf dan memicu depresi (Mushashi, 2008). Disamping itu sampah plastik terutama kantong-kantong plastik dari pasar swalayan yang dibuang sembarangan juga dapat menyumbat saluran drainase dan sungai (Raberg *et al.*, 2008).

Salah satu solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut diatas adalah dengan menggunakan biopolimer atau bioplastik yang mudah terurai yang disebut

polyhydroxyalkanoates (PHA). PHA merupakan biopolyester yang tersusun atas 3-hydroxy monomer asam lemak yang berfungsi sebagai karbon dan cadangan energi pada sel prokaryotik (Anderson dan Dawes, 1990). PHA dibentuk di dalam sitoplasma sel, dan merupakan hasil akumulasi metabolisme sel bakteri saat terjadi kelebihan karbon di lingkungan tempat hidupnya (Matthysse *et al.*, 2008), dan bila nutrisi lain tersedia kurang dalam seperti nitrogen, sulphur, fosfat, besi, magnesium, potassium dan oksigen (Steinbuechel and Schegel, 1989). PHA akan diuraikan secara intra seluler dengan bantuan enzim depolimerase dan selanjutnya dimetabolisme sebagai sumber karbon atau tenaga (Kunioka *et al.*, 1989).

PHA merupakan salah satu kajian bioteknologi yang populer dilakukan pada skala laboratorium di universitas dan skala besar di industri bioplastik, hal ini disebabkan bioplastik bersifat termoplastik yang mudah diurai (Steinbuechel, 1996). Sejauh ini, PHAs dihasilkan dari sumber daya alam yang dapat diperbaharui dan polimernya merupakan biocompatible (Sudesh *et al.*, 2000; Volova *et al.*, 2003), oleh karena itu, PHA ini sangat berguna diaplikasikan dalam packaging, pharmaceutical, pertanian dan makanan (Walle *et al.*, 2001), atau bahkan sebagai bahan bioimplan untuk teknik jaringan (Deng *et al.*, 2002).

Di Inggris bioplastik telah diproduksi dengan merk Biopol sebanyak 100 ton pertahun dengan sumber bioplastik dari bakteri *Alcaligenes eutrophus* dengan nilai USD 16/ kg. Dalam tahun 1990 dilaporkan bahwa lebih dari 6.8 juta ton dari thermoplastik resin atau 25% pasaran plastik dunia telah dijual untuk pembungkusan. Pasaran yang diharapkan untuk bioplastik ini kira – kira 1.5 juta ton/tahun (Lindsay, 1992)

Sampai saat ini telah diketahui lebih dari 300 jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan PHA didalam selnya. Diantara PHA yang telah diketahui secara meluas dan telah banyak dilakukan uji coba adalah poli(-3-Hydroxibutirat), P(3HB)

dan kopolimernya poli(-3-Hydroxibutirat-ko-3-hydroxivalerat), P(3HB-ko-3HV) (Lee, 1996). Akumulasi P(3HB) dalam sel mikroorganisme seperti pada *Alcaligenes eutrophus*, recombinant *E. coli*, *Haloferax mediterranei*, *Rhodococcus ruber*, *Bacillus cereus* dan bakteri lainnya telah dilaporkan sebelumnya (Yu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 1995 ). Polimer P(3HB) secara normal terakumulasi karena respon bakteri terhadap keterbatasan nutrisi yang esensial di alam dan karena kondisi habitat yang tidak seimbang. Biosintesis polyester ini sangat banyak menarik perhatian karena P(3HB) ini dapat digunakan sebagai sumber energi untuk pembentukan materi plastik biodegradasi (Doi, 1990). Penapisan mikroorganisme penghasil PHA dan P(3HB) dapat dilakukan dengan menggunakan metoda Nile Blue-A (Ostle *et al.*, 1982).

Dari penelitian yang dilakukan di daerah bermusim, telah berhasil diisolasi bakteri – bakteri penghasil bioplastik dari tanah dan air. Sedangkan dari daerah tropis masih belum banyak dilaporkan atau diteliti mikroorganisme penghasil bioplastik. Belum adanya informasi mengenai bakteri penghasil bioplastik dari tanah hutan Sumatera Barat, diasumsikan bahwa akan didapatkan strain bakteri yang mempunyai kemampuan dalam menghasilkan bioplastik (Agustien, 2001).

HPPB merupakan Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi yang termasuk salah satu hutan tropis yang terdapat di Sumatera Barat. Oleh karena itu tempat ini sangat potensial untuk dilakukan penelitian karena merupakan hutan tropis yang masih terjaga dan belum dilakukan perubahan dalam ekologi hutan tersebut. Selain itu kondisi tanah yang beragam yang terdapat dalam HPPB ini sangat memungkinkan untuk mendapatkan bakteri isolat lokal yang mampu menghasilkan P(3HB), sehingga sangat baik untuk dilakukan penelitian ditempat ini. Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian penapisan bakteri penghasil P(3HB) asal HPPB.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan bahwa:

- a. Apakah isolat bakteri asal HPPB dapat menghasilkan P(3HB)?
- b. Berapakah kandungan P(3HB) dari isolat asal HPPB?

## 1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri asal HPPB penghasil P(3HB) dan untuk mengetahui kandungan P(3HB) masing – masing isolat bakteri. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk menambah informasi mengenai bakteri isolat lokal yang dapat menghasilkan P(3HB) dan untuk memberikan informasi tentang kandungan P(3HB) masing – masing isolat bakteri dari HPPB.

## 1.4 Hipotesis

Dari permasalahan diatas didapatkan hipotesis sebagai berikut:

- a. Isolat bakteri asal HPPB dapat menghasilkan P(3HB)
- b. Masing – masing isolat memiliki kandungan P(3HB) yang berbeda.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanah dan Komposisi Tanah

Tanah merupakan media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba secara alami, karena banyak mengandung bahan makanan yang dibutuhkan untuk kehidupan (Soebagyo, 1970 *cit.* Sutedjo *et al.*, 1991). Tanah yang normal tersusun atas unsur – unsur padat, cair dan gas yang secara umum dibagi atas 5 kelompok, yaitu:

- a. Partikel – partikel dan mineral, meliputi kelompok – kelompok batu kerikil, pasir halus, lempung dan lumpur.
- b. Sisa tanaman dan binatang, terdiri dari daun – daun segar yang jatuh, tunggul, jerami dan bagian – bagian tanaman yang tersisa serta bangkai – bangkai binatang dan serangga yang membusuk dan hancur menyatu dengan partikel – partikel di atas.
- c. Sistem – sistem kehidupan, termasuk berbagai kehidupan tumbuhan tinggi, binatang dan berbagai macam serangga.
- d. Air, terdiri dari air bebas dan air higroskopik.
- e. Berbagai gas, terdiri dari CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> dan gas lainnya (Sutedjo *et al.*, 1991).

Unsur – unsur diatas menjadikan tanah subur yang menjamin keberlangsungan kehidupan berbagai makhluk hidup termasuk mikroba (Sutedjo *et al.*, 1991).

#### 2.2 Komposisi Mikroba dalam Tanah

Komposisi mikroba dalam tanah terutama disusun oleh golongan flora dan fauna. Golongan flora meliputi bakteri baik autotroph maupun heterotroph, Actinomycetes, fungi dan ganggang. Golongan fauna meliputi Protozoa, binatang berderajat agak lebih tinggi, Nematoda dan cacing tanah (Sutedjo *et al.*, 1991).

Bakteri merupakan mikroorganisme tanah yang populasinya paling besar dan ukurannya paling kecil. Ukuran bakteri tanah sekitar 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  dengan panjang 2  $\mu\text{m}$ . Populasi bakteri terbesar yang dijumpai di tanah dari famili *Corynebacteriaceae* dengan jumlah mencapai 65% dari total populasi bakteri tanah. Tempat kedua diduki oleh *Bacillus* dengan populasi mencapai 25%, sedangkan yang 10% terdiri dari jenis-jenis antara lain *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Clostridium*, dan *Spirillum*. Kepadatan bakteri di dalam tanah berkisar antara 10<sup>6</sup> dan 10<sup>9</sup> sel per gram tanah, tetapi pada keadaan yang benar-benar menguntungkan untuk pertumbuhannya, kepadatan bakteri dapat mencapai 10<sup>11</sup> sel per gram tanah (Anonymous, 2011a).

Distribusi bakteri di dalam tanah berkaitan dengan distribusi bahan organik di dalam tanah, hal ini disebabkan karena sebagian besar bakteri tanah bersifat heterotrof. Dengan demikian, daerah permukaan tanah dan sekitar perakaran tanaman kepadatan bakteri lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi lain (Anonymous, 2011a). Bakteri yang hidup dalam tanah memegang peranan penting dalam meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman, sehubungan dengan kemampuannya dalam mengikat N<sub>2</sub> dari udara dan mengubah ammonium menjadi nitrat. Termasuk kedalam golongan ini yang berbentuk basil yang mampu membentuk spora dan yang tidak membentuk spora. Spora pada bakteri bukan alat untuk perkembangbiakan melainkan alat untuk mempertahankan diri kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Sutedjo *et al.*, 1991).

### 2.3 Defenisi Bioplastik

Bioplastik adalah suatu plastik yang dapat mengalami perubahan secara alamiah oleh aktifitas seperti bakteri, jamur dan alga (Swift, 1994). Bioplastik dapat digolongkan menjadi dua, yaitu fotodegradasi dan biodegradasi. Senyawa bioplastik fotodegradasi

merupakan plastik yang mempunyai kelompok tambahan yang sensitif terhadap cahaya dan hanya menguraikan plastik menjadi fragmen kecil yang tak dapat diuraikan lagi. Plastik biodegradasi adalah plastik yang dapat diuraikan oleh aktifitas enzim yang dapat menyebabkan hidrolisis (Scott, 1994).

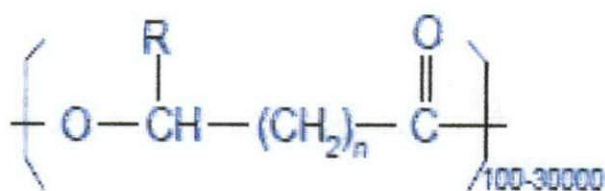
#### 2.4 Poli Hidroksialkanoat (PHA)

Poli hidroksialkanoat merupakan karbon intraselular dan material energi yang diakumulasikan oleh berbagai bakteri dibawah kondisi pertumbuhan yang kurang baik (Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996). Banyak jenis mikroorganisme yang telah diketahui dapat mengumpulkan PHA didalam selnya sebagai sumber simpanan makanan dan sumber karbon (Doi, 1990; Kunioka *et al.*, 1989; Lee, 1996). Bila keadaan lingkungan tidak menguntungkan, seperti ketersediaan bahan makanan yang terbatas, maka PHA akan diuraikan secara intrasel dengan bantuan enzim depolimerase dan selanjutnya dimetabolisme sebagai sumber karbon (Doi, 1990; Lee, 1996).

PHA telah menarik perhatian dunia industri untuk dijadikan berbagai produk konsumen, pertanian, kelautan dan aplikasi kesehatan. Poliester ini dibagi atas:

- a. PHA rantai pendek mengandung 3 sampai 5 atom karbon.
- b. PHA rantai menengah mengandung 6 sampai 14 atom karbon (PHA-mcl).

PHA-MCL merupakan elastomer biodegradabel dengan kristal rendah dan temperatur kaca transisi rendah. PHA-MCL sangat menarik karena memiliki properti yang fleksibel untuk berbagai aplikasi yang mana tidak dapat ditemukan pada PHA-SCL (Chen and Wu, 2005; Preusting *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000). PHA merupakan senyawa kimia optik aktif dengan atom karbon kiral yang terdiri dari unit monomer yang berbeda – beda (Anderson *et al.*, 1990).



Gambar 1. Struktur Kimia PHA (Ojumu *et al*,2004)

Keterangan:

n = 1	R = hydrogen	poly (-3-hidroksipropionat)
	methyl	poly (-3-hidroksibutirat)
	ethyl	poly (-3-hidroksivalerat)
	propyl	poly (-3-hidroksiheksanoat)
	pentyl	poly (-3-hidroksioktanoat)
	nonyl	poly (-3-hidroksidodekanoat)
n = 2	R = hydrogen	poly (-4-hidroksiobutirat)
n = 3	R = hydrogen	poly (-5-hidroksivalerat)

#### 2.5 Poli (3- Hidroksibutirat), P(3HB).

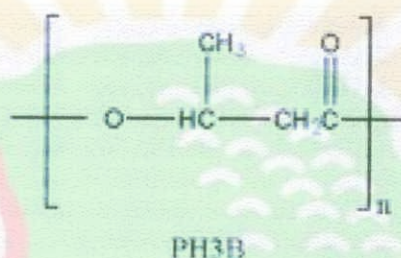
Senyawa biopolimer poli (3-hidroksibutirat), dilaporkan pertama kali oleh Lemoigne pada tahun 1925 seorang ahli mikrobiologi dari Institute Pasteur di Paris. Lemoigne mengisolasi polimer tersebut dari bakteri *Bacillus megaterium* dan mengekstrak dengan kloroform (Kunioka *et al.*, 1989). Dalam banyak bakteri, P(3HB) berperan sebagai sumber karbon dan tenaga dalam keadaan kekurangan *nutrien*. Dilaporkan bahwa *Azospirillum brasiliense* mempunyai peluang hidup yang lebih lama karena mempunyai kandungan P(3HB) yang lebih tinggi pada keadaan lingkungan yang lebih jelek (Doi , 1990a).

Poly-(3-hydroxybutyrate), P[3HB], adalah biopolimer yang diproduksi oleh sejumlah bakteri. Secara fisiologi, P(3HB) disimpan oleh bakteri dalam sitoplasmik sebagai sumber energi cadangan dan mengurangi energi dibawah kondisi pertumbuhan lingkungan yang tidak menguntungkan (Anderson & Dawes, 1990; Steinbüchel & Fächtenbusch, 1998). Peranan P(3HB) sebagai bahan simpanan dalam sel bakteri ditunjang oleh karena sifatnya yang mempunyai berat molekul tinggi dan tingkat kelarutannya yang rendah dan tidak meningkatkan tekanan osmotik sel (Senior *et al*, 1973).

Kajian awal mengenai biosintesis P(3HB) telah dikemukakan oleh Gottschalk (1964), yang menyatakan bahwa P(3HB) disintesis dari asetil-CoA dalam sel

*Alcaligenes eutrophus*. Hal ini berarti bahwa semua sumber karbon perlu ditukar terlebih dahulu kepada asetil-CoA sebelum proses biokimia dimulai (Doi, 1990b; Doi, 1990 c).

P(3HB) memiliki polimer makromolekul yang terdiri dari unit berulang 3-hidroksibutirat, 3HB, aktif secara optik karena mempunyai atom karbon asimetrik pada posisi C<sub>3</sub> dengan bobot molekul antara 200.000 hingga 3.000.000 dalton. P(3HB) memiliki rumus empiris yaitu (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> dengan struktur kimia sebagai berikut:



Gambar 2. Struktur kimia P(3HB) (Suzuki *et al.*, 1986)

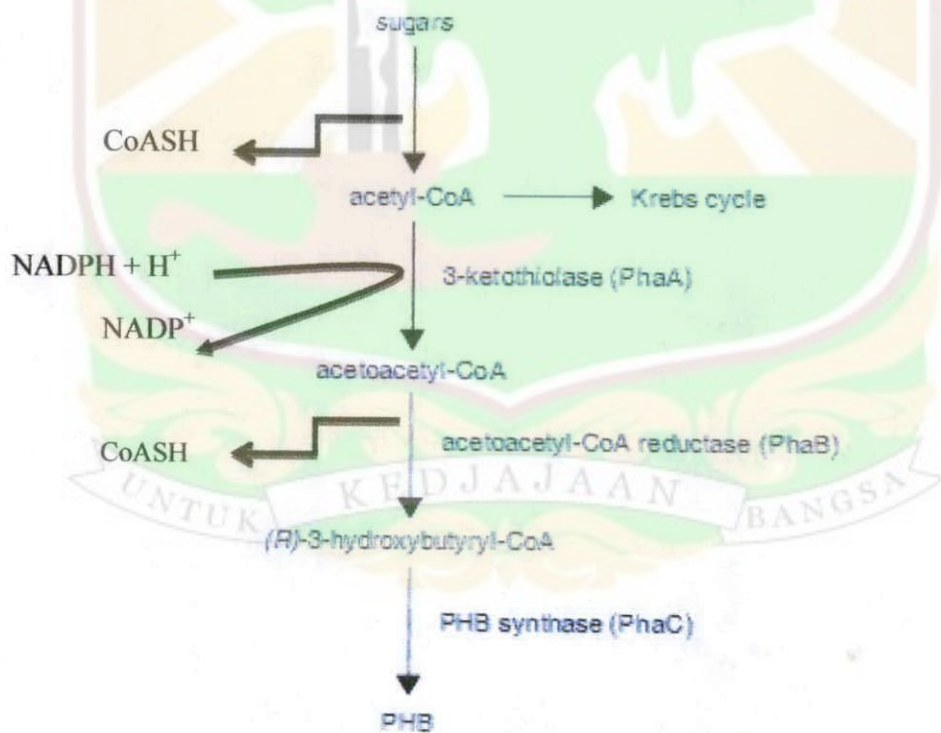
P(3HB) merupakan senyawa polimer yang memiliki titik lebur yang sangat tinggi, yaitu 175 – 180°C. Hal ini merupakan salah satu kendala dalam menggunakan P(3HB) secara komersial, karena bersifat rapuh dan mudah pecah, namun keadaan ini dapat diatasi dengan kopolimernya poli (3-Hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (Barham, 1990; De Koning and Lemstra, 1993; Hocking *et al.*, 1987).

P(3HB) berwujud granul dalam cairan sitoplasma sel bakteri dengan ukuran yang berbeda untuk tiap – tiap spesies (Byron, 1994). Granul – granul ini dapat dilihat dengan jelas dibawah mikroskop elektron transmisi. P(3HB) berupa granul dengan diameter antara 0,3 – 1,0 µm seperti yang terdapat didalam sel *Ralstonia eutropha*.

## 2.6 Biosintesis Poli Hidroksialkanoat (PHA) dan Poli-3-hidroksibutirat (PHB)

Poli Hidroksi Alkanoat merupakan poli ester dari Alkanoat (Ahs). Pertama kali dilaporkan pada tahun 1926 sebagai unsur pokok dari bakteri *Bacillus*

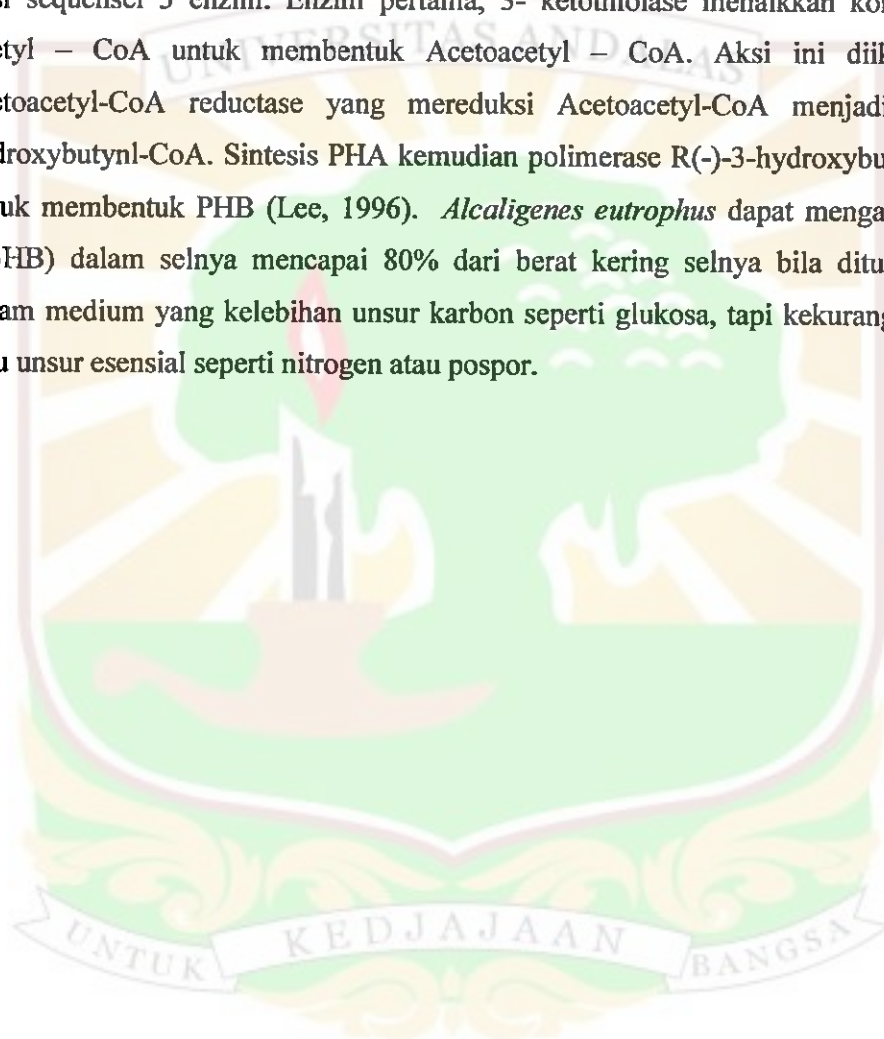
*megaterium* (Lemoigne, 1926). Beberapa bakteri mensintesis dan mengumpulkan PHA sebagai sumber karbon dan sumber cadangan energi atau untuk mengurangi kelebihan energi dibawah kondisi kekurangan nutrisi seperti pada tempat yang kelebihan unsur karbon (Steinbüchel, 1991; Byron, 1994; Yu, 2001; Du and Yu, 2002). Simpanan PHA dapat dapat didegradasi oleh depolimerase intraseluler dan metabolisme sebagai sumber karbon dan energi yang dapat dihasilkan secara cepat untuk menyuplai kekurangan nutrisi (Byron, 1994). Mayoritas PHA disusun oleh monomer asam R(-)-3-hydroxyalkanoic berkisar dari C3 sampai C14 atom karbon dengan variasi jenuh dan tidak jenuh dan lurus atau rantai bercabang mengandung grup aliphatik dan aromatik (deSmet *et al.*, 1983). Berat molekul dari polimerase ini berkisar dari  $2 \times 10^5$  sampai  $3 \times 10^6$  dalton berdasarkan tipe mikroorganisme dan kondisi pertumbuhan (Byron, 1994).



Gambar 3. Siklus Biosintesis P(3HB) oleh *Alcaligenes eutrophus* (Verlinden *et al.*, 2007)

PHA dapat dibagi dua berdasarkan nomor atom dalam unit monomer, yaitu PHA rantai pendek (PHA scl) atom C3 – C5, PHA rantai menengah (PHA mcl) mengandung atom C6 – C14 (Anderson and Dawes, 1990).

Pada bakteri *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxybutyrate (PHB), secara keseluruhan merupakan karakteristik dari PHA yang disintesis dari Acetyl-CoA oleh aksi sequensel 3 enzim. Enzim pertama, 3- ketotiolase menaikkan kondisi dua acetyl – CoA untuk membentuk Acetoacetyl – CoA. Aksi ini diikuti oleh acetoacetyl-CoA reductase yang mereduksi Acetoacetyl-CoA menjadi R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA. Sintesis PHA kemudian polimerase R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA untuk membentuk PHB (Lee, 1996). *Alcaligenes eutrophus* dapat mengakumulasi P(3HB) dalam selnya mencapai 80% dari berat kering selnya bila ditumbuhkan dalam medium yang kelebihan unsur karbon seperti glukosa, tapi kekurangan salah satu unsur esensial seperti nitrogen atau pospor.



## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2010 sampai Mei 2011 di Laboratorium Biota Sumatera bagian Bioteknologi dan Laboratorium Mikrobiologi, jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

#### **3.2 Metode Penelitian**

Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah metoda eksperimen dan dianalisa secara deskriptif dengan melihat kandungan P(3HB) dari masing – masing isolat bakteri di HPPB.

#### **3.3 Bahan dan Alat**

Dalam penelitian ini alat yang digunakan adalah cawan petri, Erlemenyer, batang pengaduk, jarum ose, lampu spritus, testube, laminary air flow, Vortex, timbangan analitik, lemari es, lampu UV  $\lambda$  365nm, magnetik stirer dan autoclaf.

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah yang diambil di Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi (HPPB), aquadest, natrium agar, glukosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , bakto agar dan mineral agar.

#### **3.4 Pengambilan Sampel**

Sampel yang digunakan adalah sampel tanah yang diambil dari tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi (HPPB). Sampel diambil pada dua titik di HPPB. Titik pertama diambil dekat vila dan titik kedua berjarak kurang lebih 300 m dari vila. Titik yang ditentukan, tanahnya digali dengan ukuran 5 x 5 cm sedalam 10 cm, tanah bagian bawah diambil sebanyak 10 g dan dimasukkan dalam plastik.



### 3.5 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium nutrien agar, larutan mineral pH 7, larutan Nile blue-A 1% dan medium glukosa agar dengan nisbah C/N 20.

#### 3.5.1 Medium Nutrien agar

Sebanyak 23 g bubuk NA dilarutkan dalam 1 liter aquades dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih. Kemudian disterilkan dalam autoclaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### 3.5.2 Medium Glukosa Agar dengan nisbah C/N 20

Sebanyak 19,4 g glukosa dilarutkan dalam 500 ml aquadest. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih, kemudian disterilkan dalam autoclaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Kemudian sebanyak 1,1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 15 g bakto agar dilarutkan dalam 500 ml aquades dan dipanaskan sampai mendidih sambil terus diaduk. Kemudian disterilkan dalam autoclaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Setelah disterilkan larutan glukosa dimasukkan dalam larutan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> secara steril (Agustien, 2001).

#### 3.5.3 Larutan Nile Blue-A 1%

Bubuk nile blue-A (C<sub>4</sub>OH<sub>4</sub>ON<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S) dilarutkan dalam etanol absolute (Djamaan, 2011).

#### 3.5.4 Medium Produksi

Dalam 1 liter air suling terdiri dari: 19,4 g Glukosa, 3,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M, 1,0 ml larutan mikroelemen dibuat dengan pH 7 (Swift, 1994).

Larutan mikroelemen terdiri dari : 2,78 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,98 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2,8 g CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,67 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,17 g CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,29 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dalam 1 liter 0,1 N (Djamaan, 1996).

### 3.6 Pemiakan Sampel di Laboratorium

Sebanyak 10 gr sampel tanah dilarutkan dalam 90 ml aquadest dan di vortex, kemudian dibuat pengenceran sampai  $10^{-5}$ . Masing – masing pengenceran diinokulasikan dalam medium Nutrien Agar dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam (Agustien, 2001).

### 3.7 Inokulasi Bakteri dalam Medium glukosa agar nisbah C/N 20

Masing – masing koloni bakteri pada medium Nutrien Agar diinokulasikan pada medium glukosa agar C/N 20 dan diberi penomoran 1 – 60, kemudian dibuat duplikat pada medium yang sama. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam (Agustien, 2001).

### 3.8 Deteksi Bakteri Penghasil Bioplastik P(3HB)

Pada medium glukosa agar C/N 20 yang telah tumbuh koloni bakteri, dituangkan larutan Nile Blue-A 1% dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 365 nm. Bila koloni bakteri berwarna jingga kemerahan menunjukkan bahwa bakteri tersebut penghasil granul P(3HB) dalam selnya. Nile blue- A ini larut dalam lipid sehingga akan berikatan dengan senyawa P(3HB) didalam sel bakteri. Granul P(3HB) yang terdapat dalam tubuh bakteri penghasil P(3HB) tersebut akan memberikan fluoresensi jingga bila diberi larutan Nile blue-A dilihat dibawah sinar UV 365 nm (Ostle *et al*, 1982)

### 3.9 Pemurnian dan Penyimpanan Stok Bakteri Penghasil Bioplastik

Dilakukan pembuatan stok murni dengan cara menginokulasikan koloni bakteri yang memberikan hasil positif dengan Nile blue-A 1% pada medium glukosa agar C/N 20 dan diinkubasi pada suhu kamar. Inokulasikan satu koloni masing – masing pada medium agar miring dan diinokulasikan pada suhu kamar (Agustien, 2001).

### 3.10 Penghasilan Biomassa Bakteri

Kultur bakteri (Inokulum) 1 ml dipipet ke dalam Erlenmeyer yang berisi 100 ml medium cair produksi bioplastik dan diinkubasi pada shaker 180 rpm, suhu kamar

selama 48 jam. Kultur bakteri kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu kamar selama 15 menit. Pellet yang didapatkan kemudian dicuci dengan air suling sebanyak 3 kali sehingga di dapatkan pellet yang kemudian dimasukkan kedalam botol kecil dan dikeringkan dengan oven suhu 80°C sehingga beratnya konstan dan didapatkan biomassa dari bakteri (Agustien, 2001).

### 3.11 Penentuan Kandungan P(3HB) di dalam sel Bakteri

Biopolimer P(3HB) yang terkandung didalam sel kering ditentukan dengan kromatografi gas dengan cara sebagai berikut: sel kering ditimbang 20 mg, kemudian ditambahkan 1,70 ml metanol, 0,03 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% dan 2 ml CHCl<sub>3</sub> diapanaskan 100°C selama 4 jam untuk mengkonversikan gugus 3-hidroksibutirat menjadi gugus 3-hidroksimetil ester. Setelah reaksi selesai, ditambahkan 1 ml air suling ke dalam larutan sehingga akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan kloroform dipipet dan diinjeksikan 5 µl ke dalam kromatografi gas dengan detektor *Flame Ionization Detector* (FID). Kondisi pengoperasian kromatografi gas adalah sebagai berikut: suhu detektor 250°C, injektor 260°C dan kolom 50°C selama 4 menit dan dinaikkan suhunya 10°C tiap menit hingga mencapai 180°C dan ditambahkan dengan waktu tunggu selama 3 menit. Kandungan biopolimer dapat dianalisa dari luas area dibawah kurva kromatogram yang didapat (Djamaan *et al*, 2002).

### 3.12 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri

#### 3.12.1 Makroskopis

Pengamatan makroskopis bakteri mencakup: bentuk, Warna, Pinggir, Permukaan bakteri dan motilitas bakteri.

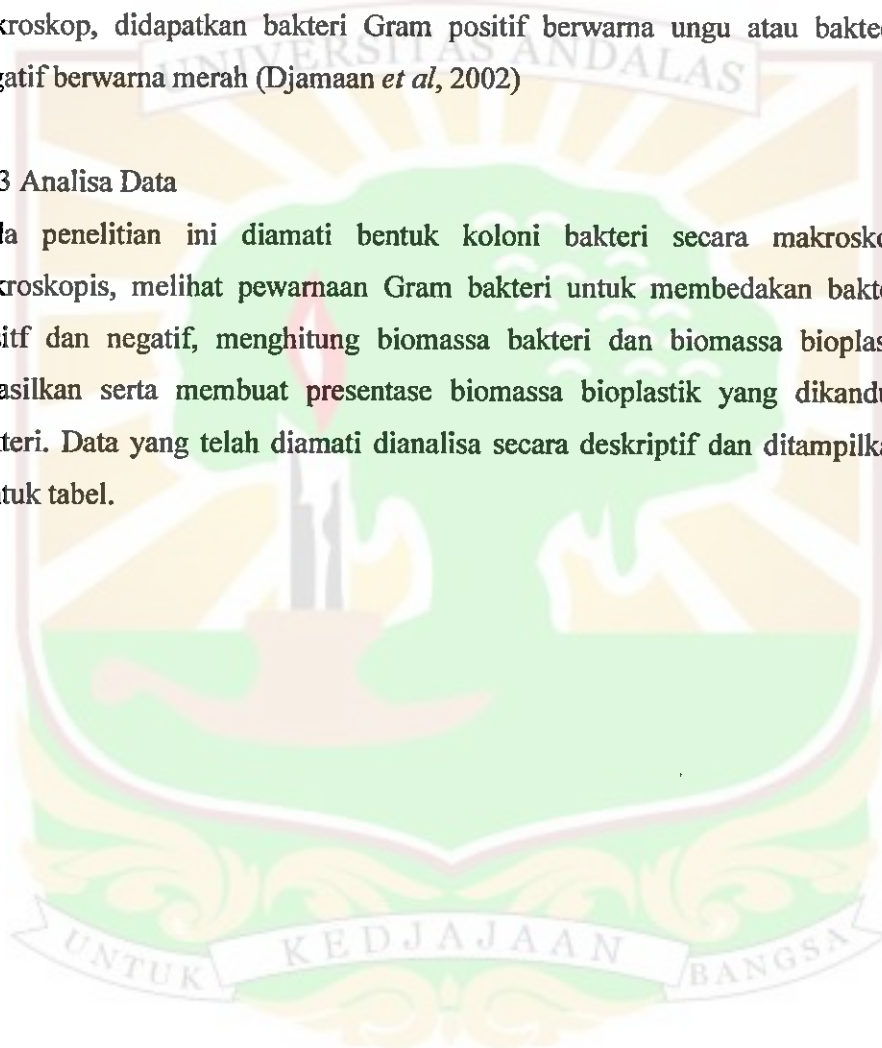
#### 3.12.2 Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis mencakup pewarnaan Gram dan ukuran sel. Pewarnaan Gram bertujuan untuk menentukan jenis bakteri Gram positif atau Gram negatif. Cara melakukan pewarnaan Gram yaitu kaca objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 96% kemudian dipanaskan diatas nyala lampu spritus, ditetesi 1 – 2 tetes NaCl 0,9%. Satu ose bakteri diletakan diatas tetesan NaCl 0,9%, diratakan dan

difiksasi, setelah dingin warnai dengan kristal violet sebanyak 2 tetes biarkan selama 1 menit, bilas dengan air, kering anginkan. Teteskan larutan logol, biarkan selama 1 menit, bilas dengan air, kering anginkan. Hilangkan warna dengan penambahan alkohol 96% biarkan selama 20 – 30 detik, bilas dengan air dan dikering anginkan. Teteskan safranin sebanyak 3 tetes, biarkan selama 1 menit, bilas dengan air. Hilangkan kelebihan air dengan cara kering anginkan. Lakukan pengamatan dibawah mikroskop, didapatkan bakteri Gram positif berwarna ungu atau bakteeri Gram negatif berwarna merah (Djamaan *et al*, 2002)

### 3.13 Analisa Data

Pada penelitian ini diamati bentuk koloni bakteri secara makroskopis dan mikroskopis, melihat pewarnaan Gram bakteri untuk membedakan bakteri Gram positif dan negatif, menghitung biomassa bakteri dan biomassa bioplastik yang dihasilkan serta membuat presentase biomassa bioplastik yang dikandung oleh bakteri. Data yang telah diamati dianalisa secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel.



**BAB IV**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**4.1 Bakteri penghasil bioplastik dengan metoda Nile Blue-A**

Penapisan bakteri penghasil bioplastik pada isolat – isolat bakteri asal tanah hutan pendidikan dan penelitian biologi (HPPB) diperoleh 40 isolat berindikasi menghasilkan bioplastik. Lokasi dan kode 40 isolat penghasil disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Isolat bakteri yang berasal dari HPPB penghasil Bioplastik**

No	Lokasi	Kode sampel	Kode isolat
1		A.1.2	BFA 1
2		A.1.3	BFA 2
3		A.1.4	BFA 3
4		A.1.12	BFA 4
5		A.1.17	BFA 5
6		A.1.20	BFA 6
7		A.1.28	BFA 7
8		A.1.29	BFA 8
9		A.1.30	BFA 9
10		A.1.31	BFA 10
11		A.1.32	BFA 11
12	I	A.1.33	BFA 12
13		A.1.38	BFA 13
14		A.1.39	BFA 14
15		A.1.46	BFA 15
16		A.1.47	BFA 16
17		A.1.50	BFA 17
18		A.1.53	BFA 18
19		A.1.59	BFA 19
20		A.2.21	BFA 20
21		A.2.22	BFA 21
22		A.2.23	BFA 22
23		A.2.38	BFA 23
24	II	B.1.2	BFB 1
25		B.1.11	BFB 2

sambungan

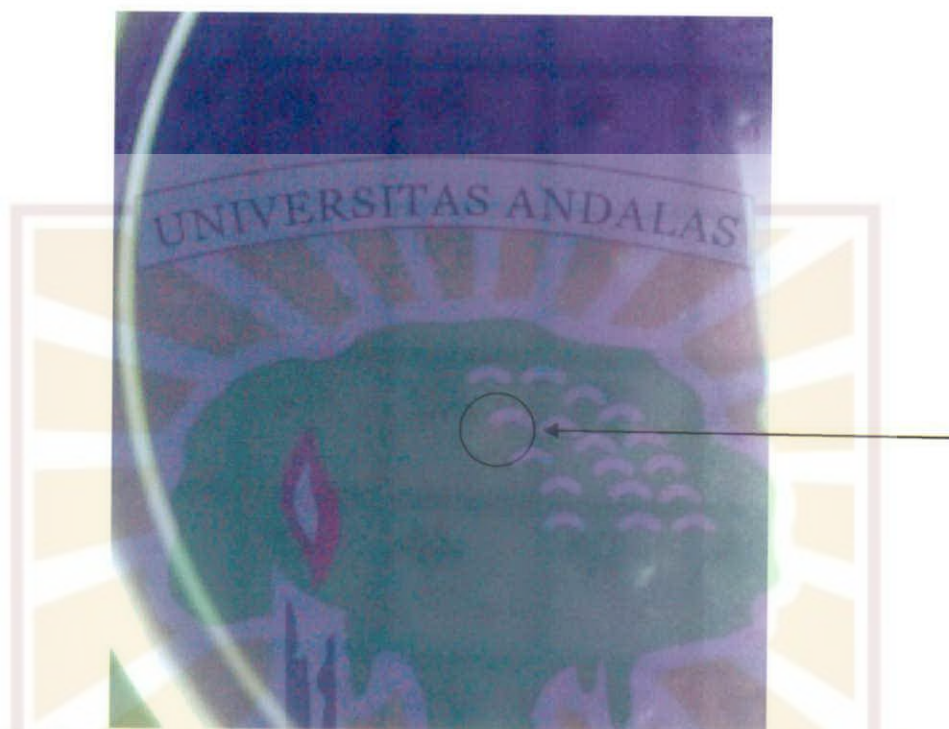
26	B.1.40	BFB 3
27	B.1.53	BFB 4
28	B.1.59	BFB 5
29	B.2.2	BFB 6
30	B.2.20	BFB 7
31	B.2.29	BFB 8
32	B.2.38	BFB 9
33	B.3.23	BFB 10
34	B.3.24	BFB 11
35	B.3.26	BFB 12
36	B.3.27	BFB 13
37	B.3.28	BFB 14
38	B.3.29	BFB 15
39	B.3.30	BFB 16
40	B.3.52	BFB 17

Tabel 1, menunjukkan bahwa dari lokasi 1 diperoleh 23 isolat penghasil bioplastik, sedangkan pada lokasi II diperoleh 17 isolat. Isolat – isolat tersebut pada pengujian dengan menggunakan zat warna Nile Blue-A, koloninya berwarna jingga dibawah sinar UV. Menurut Ostle *et al.* (1982) Larutan Nile Blue-A ini larut dalam lipid sehingga akan berikatan dengan senyawa P(3HB) di dalam sel bakteri. Granul P(3HB) yang terdapat dalam tubuh bakteri tersebut akan berflouresensi jingga bila diberi larutan Nile Blue-A dilihat di bawah sinar UV 365 nm.

Diperolehnya 40 bakteri yang diindikasikan menghasilkan bioplastik menurut metoda Nile Blue-A, hal ini berarti pada masing – masing sel bakteri tersebut mengandung gen phaA, phaB dan phaC yang mengkode enzim – enzim pengkatalis terbentuknya bioplastik (Agustien, 2001).

Terbentuknya bioplastik pada sel bakteri yang ditumbuhkan pada medium produksi nisbah C/N = 20, hal ini berarti bakteri tersebut menghasilkan bioplastik pada keadaan kondisi pertumbuhan yang tidak seimbang (*Unbalance growth*),

dimana polimer terbentuk setelah nitrogen habis dan karbon sangat tinggi pada medium.



Gambar 4. Deteksi bakteri penghasil bioplastik secara Nile Blue-A dibawah sinar UV

Keterangan: tanda panah menunjukkan fluoresensi jingga dari sel bakteri yang positif menghasilkan bioplastik.

Menurut Doi (1991), mikroorganisme dapat mengakumulasi bioplastik poliester P(3HA) dalam sel, apabila pertumbuhan sel terbatas dan kekurangan suatu nutrisi penting seperti nitrogen dalam keadaan sumber karbon yang berlebihan. Menurut Shang *et al* (2003), akumulasi PHA merupakan proses yang alami bagi bakteri dalam menyalurkan karbon dan energi ketika asupan nutrisi tidak seimbang. Poliester ini akan terakumulasi ketika bakteri tumbuh pada keadaan keterbatasan Nitrogen, Posphor atau oksigen dan kelebihan jumlah karbon.

#### 4.2 Biomassa bakteri

Penghasilan biomassa bakteri dilakukan dengan cara mengeringkan sel bakteri yang telah didapatkan pada saat fermentasi. Pengeringan sel bakteri dilakukan sampai berat sel bakteri tersebut konstan. Empat puluh isolat bakteri yang ditemukan dilakukan proses fermentasi untuk penghasilan biomassa. Berat biomassa bakteri tersebut seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Biomassa bakteri

No	Kode Isolat	Biomassa (g)
1	BFB 2	1.04
2	BFA 5	0.22
3	BFB 15	0.2
4	BFA 17	0.18
5	BFA 18	0.18
6	BFA 2	0.18
7	BFA 17	0.18
8	BFA 7	0.18
9	BFB 13	0.17
10	BFB 11	0.16
11	BFB 16	0.15
12	BFB 5	0.15
13	BFB 10	0.14
14	BFA 11	0.13
15	BFA 16	0.11
16	BFA 21	0.1
17	BFA 20	0.1
18	BFA 13	0.09
19	BFA 1	0.07
20	BFA 14	0.07
21	BFA 3	0.06
22	BFA 22	0.06
23	BFA 28	0.05
24	BFB 4	0.04
25	BFB 6	0.04
26	BFB 3	0.03
27	BFB 1	0.03



sambungan

28	BFA 12	0.02
29	BFB 12	0.02
30	BFA 9	0.02
31	BFB 7	0.02
32	BFA 15	0.02
33	BFA 6	0.02
34	BFB 8	0.01
35	BFA 4	0
36	BFA 10	0
37	BFA 19	0
38	BFA 23	0
39	BFB 9	0
40	BFB 14	0

Tabel 2 menunjukkan Empat puluh bakteri yang ditumbuhkan pada media produksi bioplastik secara fermentasi, 34 isolat dapat tumbuh dan menghasilkan biomassa, sedangkan 6 isolat tidak mampu untuk tumbuh. Adanya bakteri yang mampu tumbuh dan menghasilkan biomassa menunjukkan bahwa pembentukan P(3HB) terjadi apabila medium pertumbuhan bakteri dibuat dengan keterbatasan nitrogen dan diberi sumber karbon yang berlebih. Menurut Khanna (2005), berdasarkan kondisi pertumbuhan bakteri penghasil bioplastik dapat dibagi dua, yaitu: bakteri yang memerlukan keterbatasan nutrisi esensial seperti nitrogen, oksigen dan kelebihan unsur karbon.

Tabel 2 juga menunjukkan, bakteri BFB 2 memiliki biomassa tertinggi yaitu 1,04 g. Ini berarti bakteri tersebut mampu tumbuh secara optimal dalam medium yang kekurangan unsur esensial. Menurut Steinbuchel and Schegel (1989), biosintesis dan akumulasi polimer P(3HB) pada beberapa jenis bakteri dapat terjadi bila kelebihan unsur karbon dalam lingkungan dan kekurangan unsur yang lain seperti nitrogen, sulfur, fosfat, besi, magnesium, pottasium dan oksigen. Enam isolat bakteri tidak mampu tumbuh yaitu isolat BFA 4, BFA 10, BFA 19, BFA 23,

BFB 9 dan BFB 14. Enam isolat bakteri tersebut mungkin tidak dapat tumbuh karena gen yang mengkode enzim PHB-polimerase tidak terekspresikan sehingga enzim tersebut tidak tersintesis. Menurut Agustien dan Hakam (2002), bakteri rekombinan *E. coli* pWE-16-2 dan pWE-16-4 tidak menghasilkan PHB karena gen yang mengkode enzim PHB-polimerase yang terdapat dalam plasmid sel bakteri tidak terekspresikan sehingga enzim tersebut tidak tersintesis.

#### 4.3 Kandungan P(3HB) dalam sel bakteri

Penentuan kandungan P(3HB) dalam sel bakteri dilakukan dengan menggunakan alat GC-MS. Dengan metoda kromatografi gas dilakukan perbandingan antara kromatogram P(3HB) standar dengan kromatogram P(3HB) yang didapat pada keadaan yang sama (Djamaan *et al*, 2003). Dari hasil penelitian P(3HB) yang didapat identik dengan P(3HB) standar, berdasarkan munculnya puncak – puncak spektrum pada waktu retensi yang sama, seperti terlihat pada Gambar 5.

Hasil ini membuktikan bahwa P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri adalah murni P(3HB). Menurut Doi (1990b), dari spektrum yang didapatkan tersebut dibandingkan dengan spektrum P(3HB) standar dapat dipastikan bahwa polimer yang dihasilkan adalah P(3HB). Penentuan konsentrasi P(3HB) dilakukan dengan membagi jumlah P(3HB) dengan 20 mg biomassa dikalikan dengan jumlah biomassa total, sehingga didapatkan konsentrasi P(3HB) dalam mg/ 100 ml. sementara itu persentase P(3HB) dihitung dengan membagi konsentrasi P(3HB) dengan jumlah biomassa total yang dikalikan 100%.



Kandungan P(3HB) yang dihasilkan oleh 10 isolat bakteri yang memiliki biomassa lebih tinggi dari 24 isolat lainnya disajikan pada Tabel 3.

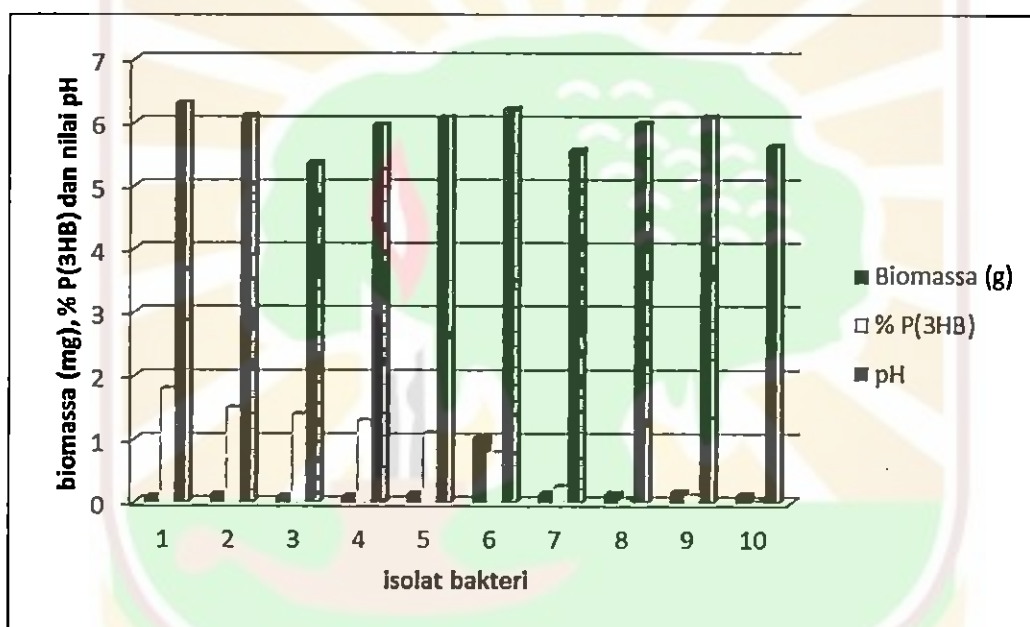
Tabel 3. Kandungan P(3HB) dalam sel bakteri

No	Kode Isolat	P(3HB) sampel	% P(3HB)	ph
1	BFA 21	0.36	1.8	6.31
2	BFB 10	0.3	1.5	6.12
3	BFA 20	0.28	1.4	5.37
4	BFA 16	0.26	1.3	5.97
5	BFB 16	0.22	1.1	6.08
6	BFB 2	0.16	0.8	6.22
7	BFB 5	0.05	0.26	5.57
8	BFA 2	0.01	0.05	5.99
9	BFA 7	0.024	0.12	6.09
10	BFA 11	0.004	0.02	5.63

Tabel 3 diatas dapat dilihat bahwa bakteri BFA 21 memiliki kandungan bioplastik tertinggi yaitu 1.8% dan bakteri BFA 11 memiliki kandungan bioplastik terendah yaitu 0.02%, hal ini berarti pada bakteri BFA 21 dari sel bakteri tersebut 1.8% P(3HB) sedangkan pada bakteri BFA 11, 0.02% dari sel bakteri tersebut adalah P(3HB). Tinggi rendahnya kandungan bioplastik dalam sel bakteri sangat ditentukan aktivitas enzim PHA synthase yang dikode gen PHA C. disamping itu jika gen PHA Z mengekspresikan enzim depolimerase akan mengakibatkan kandungan bioplastik dikatalisis menjadi monomer – monomer sehingga kandungan bioplastik menjadi lebih rendah (Doi, 1990b).

Mumtaz *et al* (2009) melaporkan bahwa bakteri *Comamonas sp* EB 172 mampu mengakumulasi P(3HB) dalam selnya sebesar 45% ketika oksigen pelihara sebesar 30%. Agustien (2001), melaporkan bakteri strain AAP-17 yang diisolasi dari sampel Tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi mampu mengakumulasi polimer P(3HB) dalam selnya sebesar 60%. Bakteri *Alcaligenes eutrophus* dapat

menghasilkan polimer P(3HB) dalam selnya sampai 65% dari berat selnya (Doi, 1990). Menurut Kim *et al* (1992), *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17669 yang ditumbuhkan pada media dengan sumber karbonnya fruktosa dan asam propionat dengan kadar nitrogen yang terbatas dapat menghasilkan polimer P(3HB) dalam selnya mencapai 70%. Hein *et al* (1997) melaporkan bahwa strain recombinan *E. coli* dapat mengakumulasi bioplastik P(4HB) sebesar 80% dalam selnya.



Gambar 7. Histogram Biomassa, persentase P(3HB) dan pH

Keterangan gambar: 1. BFA 21                      6. BFB 2  
 2. BFB 10                                7. BFB 5  
 3. BFA 20                                8. BFA 2  
 4. BFA 16                                9. BFA 7  
 5. BFB 16                                10. BFA 11

Dari tabel 3 dan Gambar 7 dapat dilihat bahwa penurunan pH selama fermentasi tidak begitu signifikan dari pH awal yang dibuat netral. Hal ini disebabkan karena bakteri hanya mengakumulasi atom karbon dari glukosa dalam selnya untuk membentuk P(3HB). Adanya sedikit penurunan pH disebabkan adanya pembentukan asam – asam organik oleh bakteri. Menurut Verlinden *et al* (2007), dalam sel bakteri karbon dimetabolis dalam beberapa jalur yang berbeda. Gula

seperti glukosa dan fruktosa diproses untuk menghasilkan PHB homopolymer. Asam lemak dan gula diproses dalam jalur yang berbeda menghasilkan kopolimer.

#### 4.4 Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri

Pengamatan makroskopis bakteri meliputi bentuk, warna, permukaan, pinggiran koloni dan motilitas koloni, disajikan pada Tabel 4.

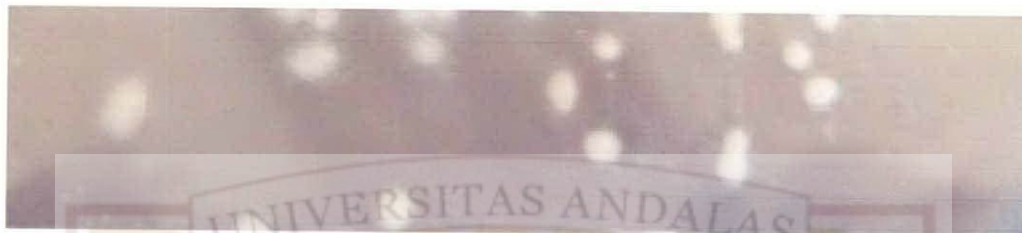
Tabel 4. Makroskopis koloni bakteri

No	Isolat	Bentuk	Warna	Pinggiran	Permukaan	Motilitas
1	BFA 2	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
2	BFA 6	Bulat	Putih	Bergerigi	Licin	Motil
3	BFA 7	Bulat	Putih	Bergerigi	Licin	Motil
4	BFA 11	Bulat lonjong	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
5	BFA 16	Bulat	Kuning	Bergerigi	Kasar	Motil
6	BFA 20	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
7	BFA 21	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
8	BFB 5	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
9	BFB 6	Bulat	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
10	BFB 10	Bulat	Abu – abu	Bergerigi	Licin	Motil

Tabel 4 menunjukkan bahwa makroskopis koloni bakteri yang didapat ada yang berbeda. Bentuk – bentuk koloni tersebut seperti bulat dan bulat lonjong. Menurut Waluyo (2007), bentuk koloni bakteri berbeda – beda untuk setiap spesies, dan bentuk itu merupakan ciri khas suatu spesies tertentu. Besar kecilnya koloni, mengkilat tidaknya, halus dan kasarnya permukaan dan warna dari koloni merupakan sifat – sifat yang khas bagi suatu spesies bakteri.

Tabel 4 juga dapat dilihat bahwa bakteri yang ditemukan memiliki warna koloni kekuningan dan abu – abu. Menurut Waluyo (2007), kebanyakan bakteri memiliki warna keputih – putihan, kelabu, kekuning – kuning atau hampir bening, tetapi pada beberapa spesies memiliki pigmen warna yang lebih tegas. Adanya warna

pada koloni bakteri disebabkan oleh faktor lingkungan seperti pH, oksigen bebas dan medium.



Gambar 8. Bentuk makroskopis koloni bakteri BFA 21

Tabel 4 diatas juga dapat dilihat bahwa semua koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar semi solid ditemukan bersifat motil. Pada bakteri yang ditumbuhkan pada media agar semi solid dengan cara menusukan jarum ose kedalam agar lunak, terlihat koloni bakteri bergerak kepermukaan. Menurut Taringan (1988), gerak bakteri terjadi pada bakteri yang memiliki flagel, karena flagel ini merupakan alat gerak bagi bakteri.



Gambar 9. Motilitas bakteri yang ditumbuhkan pada medium NA semi solid

Flagel merupakan bulu cambuk yang dimiliki oleh beberapa jenis bakteri dan letaknya berbeda – beda tergantung pada spesiesnya. Hastutik (2002), menyatakan bahwa sel bakteri dapat bergerak karena memiliki flagel (motil) dan beberapa bakteri

tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagel. Gerakan koloni bakteri yang menuju permukaan medium menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat aerob (Anonymous, 2011b).

Tabel 5. Pengamatan mikroskopis bakteri hasil isolasi

No	Kode Isolat	Bentuk sel	Gram
1	BFA 20	basil	+
2	BFA 21	basil	+
3	BFB 6	coccus	-
4	BFB 2	basil	+
5	BFA 11	basil	+
6	BFB 5	Coccus	+
7	BFB 10	Coccus	-
8	BFA 2	Coccus	+
9	BFA 6	Coccus	+
10	BFA 7	Coccus	-

Keterangan: + : Gram positif  
- : Gram Negatif

Tabel 5 dapat dilihat bahwa bakteri yang ditemukan memiliki bentuk sel basil dan coccus. Berdasarkan pewarnaan Gram bakteri yang didapatkan termasuk golongan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif yang ditemukan berjumlah 7 bakteri dan bakteri gram negatif didapatkan berjumlah 3 bakteri. Variasi bentuk bakteri dipengaruhi oleh arah pembelahan selnya, umur dan syarat pertumbuhan tertentu seperti makanan, suhu dan keadaan yang tidak menguntungkan bakteri (Anonymous, 2011c).

Pada pewarnaan Gram terjadinya perbedaan bakteri Gram positif dan negatif adalah berdasarkan ketebalan dinding sel dan karakteristik kimia dinding sel. Secara teoritis Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis, sedangkan Gram negatif berlemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada diruang periplasma. Bakteri Gram positif yang sebagian besar dinding selnya mengandung peptidoglikan akan menyerap warna violet. Bakteri Gram negatif memiliki lebih



sedikit peptidoglikan, yang terletak disuatu sel periplasmik antara membrane plasma dan suatu membrane bagian luar (Campbell and Reece, 2003).

Menurut Dwijoseputro (2005), zat warna diberi waktu beberapa lama supaya diserap oleh bakteri yang sudah kering, hal ini tergantung dari sifat khas zat warna yang digunakan. Setelah zat warna yang pertama (ungu) terserap, maka sediaan dicuci dengan alcohol, kemudian diytumpangi dengan zat warna yang berlainan, yaitu dengan zat warna merah. Jika sediaan itu kemudian dicuci dengan air, lalu dengan alcohol, maka dua kemungkinan akan terjadi.



Gambar 10. Bentuk mikroskopis sel bakteri BFA 21

Keterangan: bakteri BFA21 termasuk gram positif dan selnya berbentuk basil.

Pertama, zat warna tambahan terhapus, sehingga yang Nampak adalah zat warna asli (ungu). Inilah yang disebut bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif berwarna ungu karena bakteri gram positif menyerap warna ungu yang berasal dari Kristal violet. Kedua, zat warna tambahan (merah) bertahan hingga zat warna asli tidak tampak. Bakteri ini dikatakan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif menyerap zat warna kedua yang diberikan beerwarna merah yang berasal dari safranin (Dwijoseputro, 2005)

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

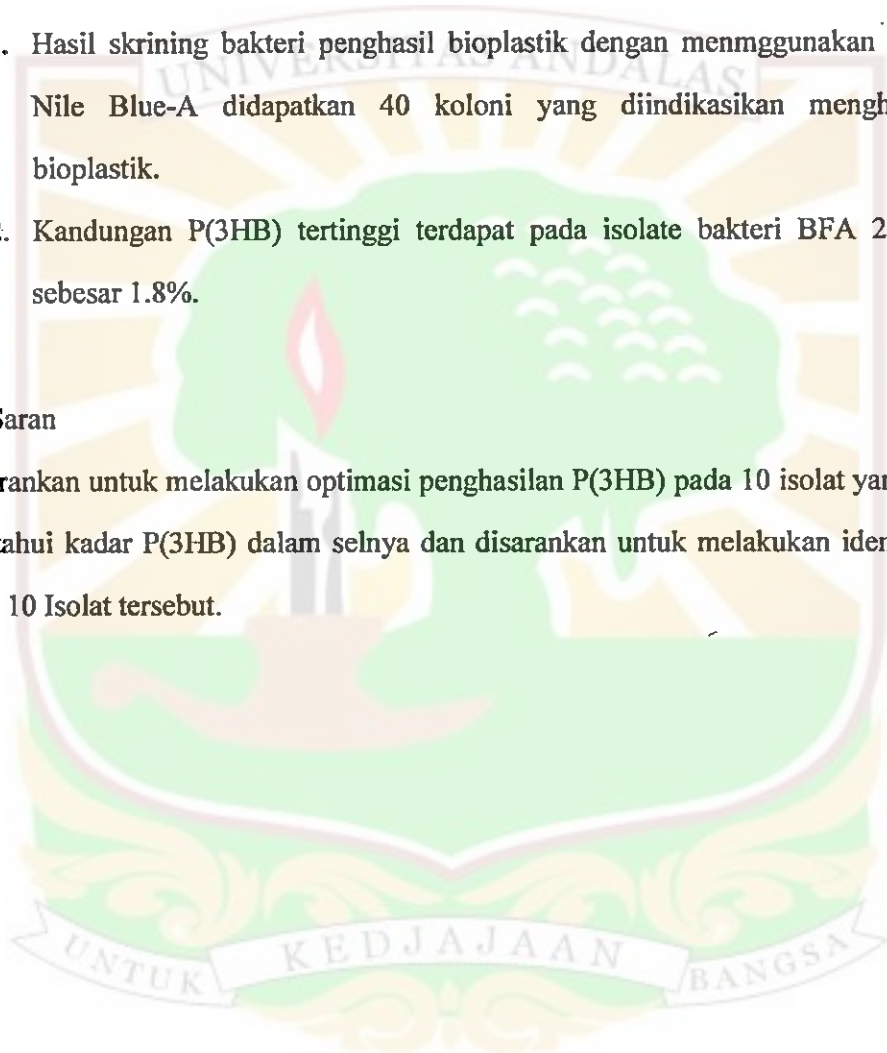
#### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilaksanakan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil skrining bakteri penghasil bioplastik dengan menggunakan metoda Nile Blue-A didapatkan 40 koloni yang diindikasikan menghasilkan bioplastik.
2. Kandungan P(3HB) tertinggi terdapat pada isolate bakteri BFA 21 yaitu sebesar 1.8%.

#### 5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan optimasi penghasilan P(3HB) pada 10 isolat yang telah diketahui kadar P(3HB) dalam selnya dan disarankan untuk melakukan identifikasi pada 10 Isolat tersebut.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2011a. *Populasi Mikroba Tanah*.  
<http://blog.unila.ac.id/anismakmun/files/2011/02/POPULASI-MIKROBA-TANAH.Pdf>. Pdf. diakses tanggal 22 Juli 2011 ;
- Anonymous . 2011b. *Pentingnya Penggambaran Koloni Bakteri*. <http://ekmon-saurus.blogspot.com/2009/05/pentingnya-penggambaran-morfologi.html>. diakses tanggal 15 Juni 2011.
- Anonymous . 2011c. *Morfologi dan Struktur Bakteri*.  
[http://www.google.co.id/url?sa=t&source=web&cd=4&ved=0CDcQFjAD&url=http%3A%2F%2Fpharzone.com%2Fmateri%2520kuliah%2Fmikrob%2FMORFOLOGI%2520DAN%2520STRUKTUR%2520BAKTERI\\_isi.doc&rct=j&q=morfologi%20bakteri&ei=K7\\_4TfD0MoKyrAeuweyCA&usg=AFQjCNEuTXFLTwJtxPYGJk3U2\\_WjJpCuVQ&cad=rja](http://www.google.co.id/url?sa=t&source=web&cd=4&ved=0CDcQFjAD&url=http%3A%2F%2Fpharzone.com%2Fmateri%2520kuliah%2Fmikrob%2FMORFOLOGI%2520DAN%2520STRUKTUR%2520BAKTERI_isi.doc&rct=j&q=morfologi%20bakteri&ei=K7_4TfD0MoKyrAeuweyCA&usg=AFQjCNEuTXFLTwJtxPYGJk3U2_WjJpCuVQ&cad=rja). Diakses tanggal 15 Juni 2011
- Agustien, A. 2001. Produksi Bioplastik dari Bakteri Isolat Lokal. *JUMPA Volume 10, ISSN 0853-003, 22 – 25*
- Agustien, A dan A.D.Hakam. 2003. Produksi Bioplastik Poli(3-Hidroksibutirat) dari Bakteri rekombinan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Andalas. 8, 2, ISSN: 0853-8018, 38 – 41.*
- Anderson, A.J and E.A. Dawes . 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol, Rev, 54, 450-472.*
- Anderson, A.J., D.R. Williams., E.A. Dawes and D.F. Ewing. 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Rhodococcus rubber*. *Can. J. Microbiol. 41 (Suppl.1), pp. 4-13.*
- Barham, P. J. 1990. Physical Properties of Poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), in *Novel Biodegradable Microbial Polymers. Ed. Dawes, E. A. Kluwer Academic Publ. Boston. 81-96*
- Byron, D. 1994. Plastic from Microbes: Microbial Synthesis of Polymers and Polymers Precursor, in Polyhydroxyalkanoate. *Ed. Mobley, D. P. 5– 33*
- Campbell, N.A., J.B, Reece and L.G, Mitchell. 2003. *Biologi Edisi Kelima Jilid 2*. Erlangga: Jakarta.
- Chen, C.W., T.M. Don and H.F. Yen. 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

- hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry* **41**: 2289–2296.
- de Koning, G. J. M. and P.J, Lemstra. 1993. Crystallization Fenomena in Bacterial poly-3-hydroxybutirate. *Polymer*. **34**. 4089 - 4094
- de Smet, M.J., G. Eggink., B. Witholt., J. Kingma and H. Wynberg. 1983.Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* **154**: 870-878.
- Djamaan, A., M.I.A. Majid., A. Agustien., L.L Few., M.S. Razip., Nazalan dan M.N Azizan.1996. Biosynthesis of copolymer poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from palm oil and n- pentanol. *Proceeding of The Regional Confrence on Polymetric Materials. Penang, Malaysia.* **134-140**
- Djamaan, A., M.I.A. Majid dan M.N. Azizan. 2002. Fermentasi Plastik Mudah Lupus Poli (3-Hidroksibutirat) dari Glukosa sebagai Sumber Karbon Tunggal Menggunakan Bakteri *Erwinia sp* USMI 20. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi.* **3(6)**, 78 -79
- Djamaan, A., M.I.A. Majid dan M.A.M. Noor. 2003. Fermentasi Fed-Batch Pada Produksi Plastik Mudah Terurai Poli (-3-hidroksibutirat) dari Asam Oleat. *Majalah Farmasi Indonesia.* **14(1)**. 256 - 264
- Djamaan, A. 2011. *Konsep Produksi Biopolimer P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) secara Fermentasi.* Andalas University Press. Padang
- Doi, Y and Abe. C .1990. Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- $\omega$ -chloroalkanoates. *Macromolecules* **23**: 3705-3707.
- Doi, Y. 1990a. Poly (3-hydroxyalkanoates), metabolism. *Microbial polyesters, chapter 4, UCH Publisher Inc., New York, 63 - 86*
- Doi, Y. 1990b. Microorganism and Poly (3-Hydroxyalkanoates). In: *Microbial Polyester. Chapter 3. UCH Publ. Inc., New York, 33-60*
- Doi, Y. 1990c. Biodegradation of microbial polyester. In: *Microbial Polyester. Chapter 8. UCH Publ. Inc, New York. 135 – 151*
- Du ,G and Yu, J. 2002. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: mcl-poly-3-hydroxyalkanoates) synthesis versus oxidation. *Process Biochem.* **38**: 325-332.
- Dwijoseputro, D. 2005. *Dasar – Dasar Mikrobiologi.* Djambatan: Jakarta.
- Hastutik,S.U. 2002. *Petunjuk Prraktikum Mikrobiologi.* Malang: UMM Press.

- Hein, S., B. Sohling, G. Gotschalk and A. Steinbuchel. 1997. Biosynthesis of poly (-4-Hydroxybutyric acid) by Recombinant Strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**, 411 – 418.
- Hocking, P. J., B.J. Tighe and P. Could. 1987. Polymers for Biodegradable Medical Devices. *Biomaterials.* **8**. 2228 – 2295
- Khanna, S.S. 2005. Recent Advances in Microbial Polyhydroxyalkanoates. *Process biochemistry*: **10**: 607 – 619
- Khoiri, A.A. 2007. *Pengaruh Penambahan Pemlastis Polietilen Glikol 400, Dietilen Glikol, dan Dimetil Ftalat Terhadap Proses Biodegradasi Bioplastik Poli-β-Hidroksialkanoat pada Media Cair dengan Udara Terlimitasi*. [Skripsi]. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Kim, J.H., B.G. Kim and C.Y. Choi. 1992. Effect of propionic acid on Poly(-beta hydroxybutyric acid-co-beta-hydroxyvaleric) acid Production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology. Letter.* **14**, 903 – 906.
- Kunioka, M., Y. Kawaguchi and Y. Doi. 1989. Production of Biodegradable Copolyester of 3-Hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbial Biotechnology.*, **30**, 569-573.
- Lee, S.Y. .1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology. Bioengineering.* **49**: 1-14.
- Lee, S.Y., A.P.J. Middelberg and Y.K. Lee. 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, **19**, 1033–1035.
- Lemoigne M. 1926. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β-oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8**: 770-782.
- Lindsay, K.F. 1992. Truly degradable resin are now truly commercial. *Mod. Plast.* **69**, 62 - 64
- Liu X.W., H.H. Wang, J.Y. Chen, X.T. Li and G.Q. Chen. 2008. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* harboring propionyl-CoA synthase gene (prpE) or propionate permease gene (prpP). *Biochem. Eng. J.* doi:10.1016/j.bej.2008.09.001
- Matthysse, A.G., R. Deora, M. Mishra and A.G. Torres . 2008. Polysaccharides Cellulose, Poly- β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine, and Colanic Acid Are Required for Optimal Binding of *Escherichia coli* O157:H7 Strains to Alfalfa Sprouts and K-12 Strains to Plastic but Not for Binding to Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (8): 2384-2390.

- Mumtaz .T.S., A. Aziz., N.A. Rahman., P.L. Yee., Y. Shirai and M.A. Hasan. 2009. Fed-batch Production of P(-3-HB-co-3-HV) Copolymer by *Comamonas sp.* EB 172 using Mixed Organic Acids Under Dual Nutrient Limitation. *European Journal Of Scientific Research. ISSN 1450-216 X Vol 33 no.3 (2009). PP 374 – 384.*
- Mushashi. 2008. *Bahaya Plastik.* <http://clubbing.kapanlagi.com/showthread.php?t=17579>. Akses 23 November 2010
- Ojumu, T.V., J. Yu and B.O. Solomon. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoate, a Bacterial Biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology Vol. 3 (1), pp. 18-24 ISSN 1684–5315.*
- Ostle, G.A and J.G Holt .1982. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. *Appl. Environ Microbiol., 62. 380-384*
- Raberg, M., F. Reinecke., R. Reichelt., U. Malkus., S. Konig., M. Potter., W. F. Fricke., A. Pohlmann and B. Voigt. 2008. *Ralstonia eutropha* H16 flagellation changes according to nutrient supply and state of poly(3-hydroxybutyrate) accumulation. *Appl Environ Microbiol 74, 4477–4490.*
- Reka, N. 2002. *Aktivitas Dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bacillus sp 1 dan Bacillus sp 2 Isolat Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti. Skripsi Sarjana Biologi.* Universitas Andalas. Padang.
- Scott, G. 1994. Environmental biodegradation of hydrocarbon polymers, in *Biodegradable Plastic and Polymers (Eds. Doi, Y and K. Fukuda). Elsevier Science B. V., Amsterdam. 79 – 105*
- Senior, P.J., G.A. Beech., G.A.F. Ritchie and E.A. Dawes, 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry. J. 128, pp. 1193–1201.*
- Shang, L., M. Jiang and H.N. Chang. 2003. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letter 25, 1415–1419.*
- Steinbüchel, A .1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In: *Byrom D (ed) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, New York, pp. 124-213.*
- Steinbuchel, A. 1996. PHB and Other Polyhydroxyalkanoate Acids, in *H. J. Rehm and G. Reed (Ed). Biotechnology. 6 UCH. Weinheim. PP 405 - 464*
- Steinbüchel, A. and B. Fächtenbusch. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology 16,419–427.*

- Steinbuchel, A. and H.G. Schlegel. 1989. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, pp. 168–175.
- Sudesh, K., H. Abe and Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**:1503-1555.
- Sutedjo. M.M., A.G. Kartosapoetro and R.D.S. Sastroatmodjo. 1991. *Mikrobiologi Tanah*. Rineka Cipta: Jakarta
- Suzuki, T., T. Yamane and Shimizu. 1986. Mass Production Poly-hydroxybutyric Acid by Fed-batch culture with Controlled Carbon/Nitrogen Feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**. 370 – 374
- Swift, G. 1994. Expectation for Biodegradation Testing Methods, in Biodegradable Plastic and Polymers (Eds. Doi, Y and K. Fukuda). Elsevier Science B. V., Amsterdam. 228 – 249
- Taringan, J. 1988. *Pengantar Mikrobiologi*. Depdikbud: Jakarta.
- Verlinden, R.A.J., D.J. Hill., M.A. Kenward., C.D. Williams and I. Radecka. 2007. Bacterial Synthesis of Biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
- Volova, T.G., E.I. Shishatskaya., V.I. Sevastianov., S. Efremov and O. Mogilnaya. 2003. Results of biomedical investigations of PHB and PHB /PHV fibers. *Biochem Eng J –Biopolymers* **16**, 125–133.
- Waluyo. L. 2007. *Mikrobiologi Umum edisi revisi*. UMM press: Malang.
- Yu J. 2001. Production of PHA from starch wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* **86**: 105-112.
- Yu, S.T., C.C. Lin and J.R. Too. 2005. PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry* **40**, pp. 2729–2734.

## LAMPIRAN

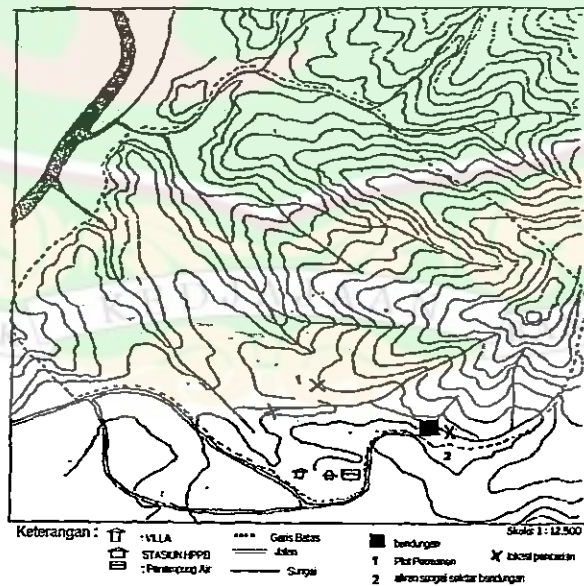
### Lampiran 1.

#### Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	bulan ke			
		1	2	3	4
1	Sterilisasi alat dan bahan				
2	pembuatan medium				
3	pengambilan sampel				
4	peibiakan sampel di laboratorium				
5	inokulasi bakteri pada medium glukosa agar				
6	deteksi bakteri penghasil P(3HB)				
7	pemurnian dan penyimpanan stok bakteri				
8	penghasilan biomassa bakteri				
9	Penentuan kandungan P(3HB) dalam sel				
10	pengamatan makroskopis dan mikroskopis				
11	analisa data				

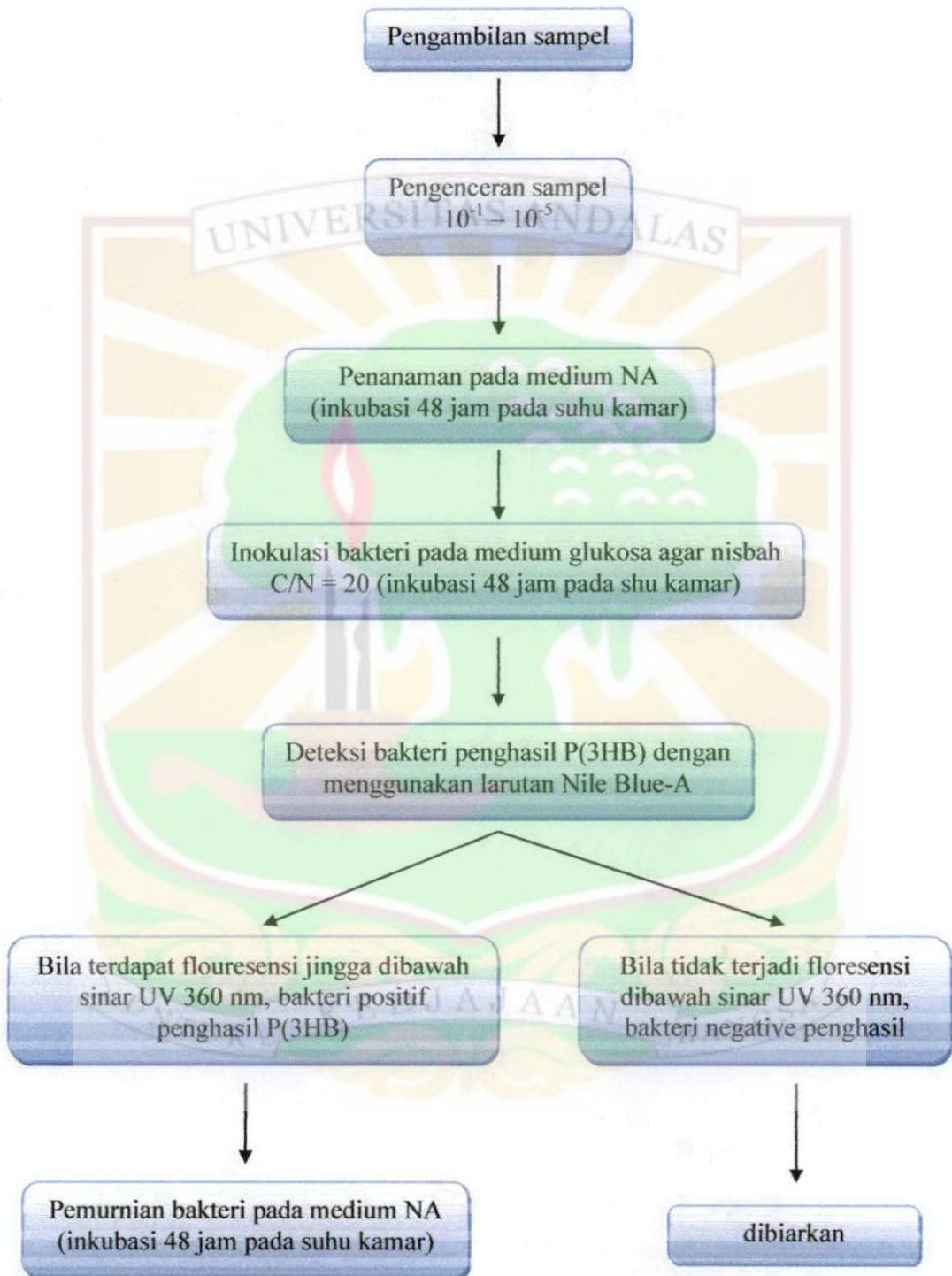
### Lampiran 2.

#### Denah Hutan Pendidikan dan Penelitian Bilogi (HPPB)





Lampiran 3.  
Skema kerja





Lampiran 4.

Pengamatan makroskopis

no	Isolat	Bentuk	Warna	Pinggiran	Permukaan	Motilitas
1	BFA 1	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
2	BFA 2	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
3	BFA 3	Bulat	abu – abu	Bergerigi	Licin	Motil
4	BFA 4	Bulat	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
5	BFA 5	Bulat	Putih	Rata	Licin	Motil
6	BFA 6	Bulat	Putih	Bergerigi	Licin	Motil
7	BFA 7	Bulat	Putih	Bergerigi	Licin	Motil
8	BFA 8	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
9	BFA 9	Bulat	Putih	Rata	Licin	Motil
10	BFA 10	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
11	BFA 11	Bulat lonjong	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
12	BFA 12	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
13	BFA 13	Bulat	Abu – abu	Bergerigi	Licin	Motil
14	BFA 14	Bulat	Putih	Rata	Licin	Motil
15	BFA 15	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil

## Sambungan

16	BFA 16	Bulat	Kuning	Bergerigi	Kasar	Motil
17	BFA 17	Bulat	Abu – abu	Bergerigi	Licin	Motil
18	BFA 18	Bulat lonjong	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
19	BFA 19	Bulat	Abu – abu	Bergerigi	Kasar	Motil
20	BFA 20	Bulat	Biru	Rata	Licin	Motil
21	BFA 21	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
22	BFA 22	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
23	BFA 23	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
24	BFB 1	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
25	BFB 2	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
26	BFB 3	Bulat	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
27	BFB 4	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
28	BFB 5	Bulat	Kuning	Bergerigi	Licin	Motil
29	BFB 6	Bulat	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
30	BFB 7	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
31	BFB 8	Bulat lonjong	Kuning	Rata	Licin	Motil
32	BFB 9	Bulat lonjong	Kuning	Rata	Licin	Motil
33	BFB 10	Bulat	Abu – abu	Bergerigi	Licin	Motil
34	BFB 11	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
35	BFB 12	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
36	BFB 13	Bulat	Abu – abu	Rata	Licin	Motil
37	BFB 14	Bulat	Kuning	Rata	Licin	Motil
38	BFB 15	Bulat	Kuning	Bergerigi	Kasar	Motil
39	BFB 16	Bulat lonjong	Kuning	Bergerigi	Kasar	Motil
40	BFB 17	Ovale	Abu – abu	Rata	Licin	Motil

## Lampiran 5.

## Pengamatan Mikroskopis

No	Kode Isolat	Bentuk sel	Gram
1	BFA 20	Bacil	+
2	BFA 21	Bacil	+
3	BFB 6	Coccus	-
4	BFB 2	Bacil	+
5	BFA 11	Bacil	+

sambungan

6	BFB 5	Coccus	+
7	BFB 10	Coccus	-
8	BFA 2	Coccus	+
9	BFA 6	Coccus	+
10	BFA 7	Coccus	-
11	BFA 22	Coccus	+
12	BFA 10	Basil	+
13	BFA 1	Basil	+
14	BFB11	Coccus	-
15	BFB 12	Basil	+
16	BFA 14	Coccus	+
17	BFB 8	Basil	+
18	BFA 9	Coccus	+
19	BFA 18	Coccus	-
20	BFA 15	Coccus	+
21	BFA 8	Basil	+
22	BFB 7	Coccus	-
23	BFB 1	Coccus	-
24	BFB 6	Coccus	+
25	BFB 9	Coccus	+
26	BFA 23	Coccus	+
27	BFA 13	Coccus	+
28	BFA 5	Coccus	+
29	BFA 17	Coccus	-
30	BFB 16	Coccus	-
31	BFB 3	Basil	-
32	BFB 15	Coccus	-
33	BFB 14	Basil	-
34	BFB 5	Coccus	+
35	BFB 2	Basil	+
36	BFB 4	Coccus	-

Keterangan: + : Gram Positif

- : Gram neagtif

Lampiran 6.

Perhitungan Kadar P(3HB) sampel

$$\text{Mg P(3HB) sampel} = \frac{\text{AUC sampel}}{\text{AUC P(3HB) murni}} \times 5 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB) sampel} = \frac{\text{mg P(3HB) sampel}}{\text{Biomassa}} \times 100\%$$

**Isolat BFB 10**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{28485507}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.30 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.30}{20} \times 100\% = 1.5\%$$

**Isolat BFA 20**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{26500185}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.281 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.281}{20} \times 100\% = 1.4\%$$

**Isolat BFA 21**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{33524183}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.36 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.36}{20} \times 100\% = 1.8\%$$

**Isolat BFB 16**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{20642917}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.22 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.22}{20} \times 100\% = 1.1\%$$

**Isolat BFB 2**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{14588277}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.16 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.16}{20} \times 100\% = 0.8\%$$

**Isolate BFA 11**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{416239}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.004 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.004}{20} \times 100\% = 0.02\%$$

**Isolate BFB 5**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{4915669}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.05 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.05}{20} \times 100\% = 0.26\%$$

**Isolate BFA 2**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{967108}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.01 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.01}{20} \times 100\% = 0.05\%$$

**Isolat BFA 16**

$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{24496469}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.26 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.26}{20} \times 100\% = 1.3\%$$

**Isolate BFA 7**

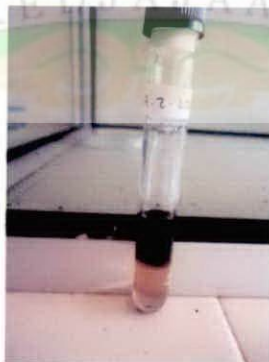
$$\text{Mg P(3HB)} = \frac{4695025}{471208416} \times 5 \text{ mg} = 0.024 \text{ mg}$$

$$\% \text{ P(3HB)} = \frac{0.024}{20} \times 100\% = 0.12\%$$

Lampiran 7.



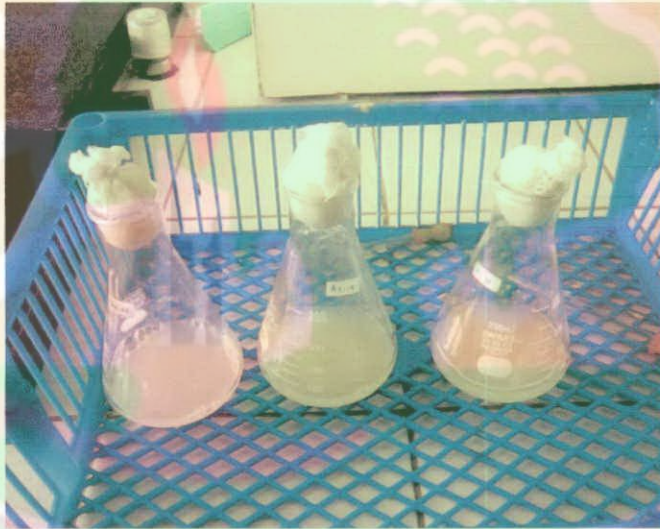
Gambar 11. Isolat bakteri penghasil P(3HB)



Gambar 12. Ekstrak sel bakteri



Gambar 13. Ekstrak bioplastik



Gambar 14. Penghasilan biomassa bakteri setelah fermentasi

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

## BIODATA



Nama lengkap : Fakhri Harianto  
Tempat dan tanggal lahir : Payakumbuh 09 April 1989  
Agama : Islam  
Gol. Darah : O  
Alamat : Andaleh, Kec. Luak, Kab. 50 Kota  
Motto Hidup : Be a good man, do the best and share peace to the world  
Nama Orang Tua  
Ayah : Alm Wahdizem  
Ibu : Suryawinati  
Latar Belakang Pendidikan : SDN 63 Andalas Atas (1995- 2001)  
SMP Negeri 3 Payakumbuh (2001- 2004)  
SMA Negeri 2 Payakumbuh (2004-2007)  
S1 Biologi Universitas Andalas (2007-2011)  
Pengalaman Organisasi : 1. Staf Departmen Infokom BEM KM UNAND  
Kabinet Bersatu (2009-2010)  
Prestasi : 1. Anggota Penerima Hibah Program Kreativitas  
Mahasiswa Kewirausahaan (PKM-P) DIKTI  
2011