Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 8, No. 2, 2003, 48-55
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 60/DIKTI/Kep/2000

ISSN No. 1410-0177

Skrining Mikroorganisme Penghasil Senyawa Bioplastik P(3hb) Dengan Metode Pewarnaan Menggunakan *Nile Blue A*

Akmal Djamaan*, Rustini dan Wessi Windrasari
Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang

Diterima : 28 Agustus 2003, Disetujui : 18 September 2003

ABSTRACT

The screening microbial produce of P(3HB) using colouring in-vitro method by Nile Blue A 1 % in ethanol method was carried out. Soil and water sample were taken at several places in West Sumatra. Results showed that there were nine species gave positive reaction with Nile Blue A exhibited a strong orange flouresceence under Ultraviolet λ 365 nm. The species of microbial were of *Bacillus brevis* (FAAC 20211), *Bacillus* sp_1 (FAAC 20212), *Bacillus alvei* (FAAC 20213), *Serratia liquefaciens* (FAAC 20214), *Bacillus circulans* (FAAC 20215), *Pseudomonas* sp (FAAC 20216), *Alcaligenes* sp (FAAC 20217), *Enterobacter* sp (FAAC 20218), *Bacillus* sp_2 (FAAC 20219) respectively.

Keywords: bioplastic, nile blue A, P93HB).

PENDAHULUAN

Plastik sintetis merupakan produk yang tahan pecah, tahan air dan tidak mudah terurai. Peningkatan pemakaian plastik sintetis pada seperempat abad terakhir ini menimbulkan masalah pencemaran alam yang serius, karena plastik ini tidak dapat terurai secara alamiah (Akmal, *et al.*, 2003). Diperkirakan lebih dari satu juta hewan laut mati setiap tahunnya akibat terjerat atau terhalang oleh sisa-sisa plastik yang tenggelam di dalam air laut ataupun yang terapung di permukaan air laut (Doi, 1990). Selain dari masalah pencemaran lingkungan dan terjadinya kerusakan ekosistem, bahan mentah pembuatan plastik, yaitu petroleum merupakan sumber alamiah yang tidak dapat diperbaharui (non-renewable) sehingga tidak mungkin digunakan secara terus menerus dalam waktu yang panjang.

Pemakaian plastik yang dapat diuraikan (biodegradable plastic) merupakan jalan keluar dari permasalahan di atas. Salah satu cara yang mendapat perhatian akhir-akhir ini adalah biosintesis secara fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme penghasil polihidroksialkanoat, PHA. Telah diketahui beberapa mikroorganisme tertentu dapat menghasilkan PHA di dalam selnya yang berguna sebagai simpanan bahan makanan dan tenaga bila keadaan lingkungan tidak menguntungkan misalnya kekurangan N, PO_4, O_2 dan Mg (Akmal, *et al.*, 2001). PHA akan diuraikan secara intra sel dengan bantuan enzim depolimerase dan selanjutnya dimetabolisme sebagai sumber karbon atau tenaga (Kunioka, *et al.*, 1989). Sampai saat ini telah diketahui lebih dari 300 jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan PHA di dalam selnya. Di antara PHA yang telah dilaporkan secara meluas dan telah banyak dikaji adalah poli(3-hidroksibutirat), P(3HB) dan kopolimernya poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat), P(3HB-ko-3HV) (Lee, 1996).

Biosintetis P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) secara fermentasi telah banyak dilaporkan. Dari berbagai cara yang dilakukan mengggunakan berbagai jenis sumber karbon, didapatkan bahwa jumlah polimer dan kopolimer sangat tergantung pada jenis dan konsentrasi sumber karbon yang diberikan. Pada penelitian terdahulu telah dilaporkan bahwa bakteri *Erwinia* sp. USM1-20 menghasilkan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV), sebagai sumber karbon kedua yaitu n-propanol, asam propionat, n-pentanol dan asam valerat pada medium fermentasi (Akmal, *et al.*, 1998: Akmal, *et al.*, 2001).

Negara maju, seperti Jepang, Amerika, Inggeris dan Jerman sejak pertengahan tahun 1950 telah memulai penelitian mengenai senyawa bioplastik yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu. Kajian lanjutannya adalah optimasi produksinya dari berbagai substrat dan teknik fermentasi. Penelitian semacam ini belum pernah dilaporkan di Indonesia dan belum banyak menarik minat ilmuwan di negara kita, padahal kita mempunyai sumber daya alam yang sangat beragam dan berlimpah. Negara maju yang telah lebih dulu memperoleh lisensi dan paten dalam menghasilkan plastik yang biourai ini tidak akan menjual strain mikroorganisme penghasil tersebut karena ini menyangkut bisnis bioplastik dunia di masa mendatang.

Corresponding Author : Tel.62-751-71682,Faks: 62-751-73118
E-mail : akmal64@telkom.net

Oleh karena itu dengan adanya kajian skrining mikroorganisme baru penghasil bioplastik yang telah dilakukan ini, merupakan suatu terobosan baru yang cukup berarti dalam menginventarisasi dan mengunakan beberapa strain mikroorganisme baru yang berasal dari sampel tanah, air laut, bukit kapur dan dari sumber air panas alami di Sumatera Barat yang dapat dikembangkan berbagai penelitian lebih lanjut untuk optimasi produksi bioplastik.

Telah diketahui bahwa P(3HB) mempunyai sifat hidrofobik seperti lipid (Lee, 1996). Berdasarkan sifat ini maka dapat dibedakan antara bakteri penghasil P(3HB) dengan bakteri yang bukan penghasil, yaitu menggunakan larutan *Nile Blue A* 1 % dalam etanol. *Nile Blue A* ini bersifat larut dalam lipid sehingga akan berikatan dengan senyawa P(3HB) di dalam sel bakteri. Granul P(3HB) yang terdapat dalam tubuh bakteri penghasil tersebut akan menunjukkan flouresensi jingga dengan pemberian larutan *Nile Blue A* 1 % dalam etanol yang dilihat dibawah sinar UV 365 nm (Ostle, *et al.*, 1982).

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2001 sampai April 2002 di Lab Mikrobiologi Jurusan Farmasi dan Lab Analitik I Jurusan Farmasi FMIPA UNAND. Identifikasi dilanjutkan di Laboratorium Bakteriologi Balai Penelitian Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) wilayah II Baso, Kab Agam.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah cawan petri, gelas piala, gelas ukur, batang pengaduk, jarum ose, erlenmeyer, lampu spiritus, lemari aseptis, *Digital Colony Counter* (Stuart Scientific®), autoklaf (All American®), timbangan analitik, lemari es lampu UV λ 365 nm (Spectroline®) dan tabung reaksi.

Bahan yang digunakan adalah sampel yang diambil pada 8 lokasi, yaitu : Hutan Penelitian Biologi UNAND, hutan lindung Lembah Anai, Bukit Kapur Indarung, air laut Pantai Padang, air dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, tanah rawa di daerah sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, air Danau Singkarak, dan air Danau Maninjau dan bahan yang digunakan berupa media Nutrient Agar (Merck®), minyak sawit, larutan mineral dan serbuk agar.

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah dari Hutan Penelitian Biologi UNAND, Hutan Lindung Lembah Anai, tanah kapur dari Bukit Kapur Indarung, tanah gambut di daerah sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, air Danau Singkarak, air Danau Maninjau, air dari air laut Pantai Padang, air dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.

Pembuatan Medium

Medium Nutrient Agar
Sebanyak 20 gram serbuk Nutrient Agar dilarutkan dalam 1 liter air suling, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Pipet sebanyak 15 ml medium masukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

Medium Mineral Agar
Medium mineral agar tiap liter air suling terdiri dari : minyak sawit 4,6 gr, agar 20 gr, larutan mineral pH 7 (Akmal, *et al.*, 1998).

Pembuatan Larutan Mineral pH 7
Dalam 1 liter air suling terdiri dari : 3,7 gr KH_2PO_4, 5,8 gr K_2HPO_4, 1,1 gr $(NH_4)_2HPO_4$, 10 ml $MgSO_4.7H_2O$ 1M, 1,0 ml larutan mikroelemen (8), dibuat dengan pH 7. Larutan mikroelemen terdiri dari : 2,78 gr $FeSO_4.7H_2O$, 1,98 gr $MnCl_2.4H_2O$, 2,8 gr $CoSO_4.7H_2O$, 1,67 gr $CaCl_2.2H_2O$, 0,17 gr $CuCl_2.2H2O$, 0,29 gr $ZnSO_4.7H_2O$ dalam 1 liter HCl 0,1 N (Akmal *et al.*, 1998).

Cara Pembuatan Medium Mineral-Agar
Sebanyak 20 gr serbuk agar dilarutkan dalam 1 liter larutan mineral pH 7 kemudian tambahkan 1 ml larutan mikroelemen lalu panaskan sambil diaduk hingga homogen. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit dan minyak sawit sebanyak 4,6 gr disterilkan dalam erlenmeyer bersumbat kapas dan kasa dengan cara yang sama. Masukkan minyak sawit steril kedalam larutan mineral yang telah disterilkan tadi lalu dihomogenkan. Kemudian dituangkan ke dalam tiap-tiap cawan petri steril sebanyak 15 ml.

Pembuatan Larutan *Nile Blue A* 1 %
Dilakukan dengan cara melarutkan bubuk *Nile Blue A* sebanyak 1 % dalam etanol (1gr/100 ml etanol).

Pembiakan sampel di laboratorium

Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 gr dan dibuat suspensi 10 % dalam air suling lalu buat pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-8} dalam air suling dan untuk sampel cair dibuat pengenceran 1:1 dalam air suling, kemudian diinokulasikan dalam medium Nutrient Agar, lalu inkubasi pada suhu 35-37 °C selama 24-48 jam. Diamati dan dicatat jumlah koloni yang tumbuh.

Inokulasi Bakteri pada Medium Mineral-Agar

Masing-masing koloni bakteri dari cawan petri media NA dipindahkan pada medium mineral agar yang telah diberi penomoran dan juga ke medium NA yang telah diberi penomoran sebagai stok. Lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37 °C.

Deteksi Bakteri Penghasil Bioplastik P(3HB)

Pada medium mineral agar yang telah ada koloni bakteri, dituangkan larutan pewarna *Nile Blue A* 1 % dan diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selanjutnya dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 365 nm. Bila koloni bakteri berwarna jingga, menunjukkan bahwa bakteri tersebut penghasil granul P(3HB) dalam selnya. Sedangkan jika koloni bakteri berwarna hitam, berarti sel bakteri tidak menghasilkan P(3HB) (Ostle, *et al.*, 1982).

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 Nutrient Agar (NA), inkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37°C. Inokulasikan satu koloni masing-masing pada medium agar miring NA dan medium mineral agar dengan cara goresan. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37°C dan disimpan pada suhu 4°C untuk selanjutnya diidentifikasi.

Identifikasi Bakteri Penghasil Bioplastik

Identifikasi bakteri dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis menurut metoda Cowan and Stells (1973) yang meliputi reaksi biokimia, uji katalase, uji pembentukan indol, uji hidrolisis urea, uji penggunaan sitrat, uji methyl red (MR), uji voges proskauer (VP), uji hidrogen sulfida, uji fermentasi karbohidrat (Laktosa, Glukosa, Sukrosa dan Manitol), uji oksidasi fermentasi (OF), uji oksidase, uji reduksi nitrat, uji dekarboksilase lisin, uji dekarboksilase ornitin, uji KCN. Skema lengkap skrining mikroba ditunjukkan pada Gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Dari penapisan yang dilakukan dengan menggunakan larutan *Nile Blue A* 1 % dalam etanol diperoleh sembilan isolat bakteri yang memberikan flouresensi jingga. Bakteri tersebut adalah isolat C_2 51 dengan kode koleksi FAAC 20211 dan isolat C_3 25 dengan kode koleksi FAAC 20212 dari tanah rawa disekitar sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman, isolat D_1 94 dengan kode koleksi FAAC 20213 dari tanah kapur Bukit Kapur Indarung, isolat E_2 32 dengan kode koleksi FAAC 20214 dan isolat E_3 17 dengan kode koleksi FAAC 20215 dari air pantai Padang, G_3 7 dengan kode koleksi FAAC 20216, isolat G_3 36 dengan kode koleksi FAAC 20217 dan isolat G_3 55 dengan kode koleksi FAAC 20218 dari air danau Sing-karak, isolat H_1 44 dengan kode koleksi FAAC 20219 dari air sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman (Tabel 2).

Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa tanah dari Hutan Penelitian Biologi UNAND dan Hutan Lindung Lembah Anai, tanah kapur dari Bukit Kapur Indarung, tanah rawa didaerah sekitar sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, air Pantai Padang, air Danau Singkarak, air Danau Maninjau, dan air dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Lokasi pengambilan sampel ini didasari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi bakteri misalnya kekurangan N, PO_4, O_2, dan Mg, bakteri penghasil bioplastik ini akan menggunakan PHA sebagai sumber C dan tenaga (Doi, 1990). Pengambilan sampel yang berbeda ini diharapkan dapat memberikan variasi mikroorganisme yang diperoleh.

Penggunaan metoda pewarnaan dengan *Nile Blue A* karena dengan metoda ini memberikan hasil yang cukup akurat dan cepat dengan timbulnya flouresensi jingga yang jelas pada koloni bakteri yang menghasilkan P(3HB) setelah ditetesi dengan larutan *Nile Blue A* 1 % dalam etanol (Ostle, *et al.*, 1982).

Pada langkah awal dilakukan isolasi mikroorganisme dari 8 sampel yang digunakan dan dihitung jumlah koloni untuk masing-masing sampel pada pengenceran 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-6}, 10^{-8}. Ternyata dari 4 tingkat pengenceran tersebut yang memiliki jumlah koloni pada interval 30-300 koloni adalah pengenceran 10^{-8} untuk semua sampel (Tabel 1).

Untuk menentukan jenis bakteri penghasil tersebut maka dilakukan identifikasi berupa pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan beberapa uji reaksi biokimia. Dari identifikasi yang dilakukan diperoleh sembilan spesies dengan 5 genus. Kesemua spesies memberikan uji biokimia yang berbeda, yaitu: *Bacillus brevis*, *Bacillus* sp_1, *Bacillus alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes*, *Enterobacter* sp, *Bacillus* sp_2, (Tabel 3).

Bacillus sp_1, merupakan Divisio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Bacilliaceae, Genus *Bacillus* sp. Pada Nutrient Agar koloni bakteri berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk oval sampai tidak beraturan dan merupakan gram positif. Bacillus sp_1 bersifat

aerob tetapi mampu tumbuh pada kondisi anaerob fakultatif dan tidak mampu memfer-mentasikan gula (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994). Hasil dari uji biokimia bakteri yang negatif adalah terhadap uji : H_2S, Indol, Laktosa, Sukrosa, Manitol, Voges Proskauer, Oksidasi, Fermentasi dan Urea.

Bacillus brevis, merupakan Divisio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Baciliaceae, Genus Bacillus dengan spesies *Bacillus brevis*. Pada Nutrient Agar koloni bakteri berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan warna koloni putih susu, sel berbentuk batang dan merupakan gram positif. *Bacillus brevis* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang dan mempunyai spora, dan mampu memfermentasikan gula (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994). Hasil dari uji biokimia bakteri yang negatif adalah terhadadap uji : H_2S, Indol, Laktosa, Sukrosa, Manitol, Voges Proskauer, Oksidasi Fermentasi, Citrat, KCN, Ornitin dan Lisin.

Bacillus circulans merupakan Divisio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Bacilliaceae, Genus Bacillus dengan spesies *Bacillus circulans*. Pada Nutrient Agar koloni bakteri ini berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk batang, memiliki spora dan merupakan gram positif. *Bacillus circulans* mampu memfermentasikan gula (Cowan and Stells, 1973: Lay, 1994) dan memberikan reaksi negatif terhadap uji : H_2S, Indol, Laktosa, Manitol, Katalase, Oksidase, Oksidasi Fermentasi, Urease, Citrat, KCN, Ornitin dan Lisin.

Bacillus alvei merupakan Divisiio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Baeilliaceae, Genus Bacillus dengan spesies *Bacillus alvei*. Pada Nutrient Agar koloni bakteri ini berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk batang dan merupakan gram positif. *Bacillus alvei* termasuk gram positif yang mempunyai endospora yang tahan panas, bersifat aerob tapi mampu tumbuh pada kondisi anaerob fakultatif. Bakteri ini mampu memfer-mentasi gula (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994) dan memberikan reaksi negatif pada uji : H_2S, Indol, Laktosa, Sukrosa, Methyl Red, Voges Proskauer, Oksidasi Fermentasi, Oksidase, Urease, Ornitin dan Lisin.

Alcaligenes sp merupakan Divisio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Achromobacteriaceae, Genus Alcaligenes dengan spesies *Alcaligenes* sp. Pada Nutrient Agar koloni bakteri ini berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih bening, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk batang dan merupakan gram negatif. *Alcaligenes* sp termasuk gram negatif, berbentuk batang halus, bakteri ini mampu tumbuh pada suhu 20-27°C beberapa spesies katalase positif, dan tidak mampu memfermentasikan gula (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994). Reaksi biokimia bakteri yang negatif terhadap uji : H_2S, Gas, Indol, Laktosa, Sukrosa, Methyl Red, Voges Proskauer, Oksidasi Fermentasi, Oksidase, Urease, Ornitin dan Lisin.

Serratia liquefaciens merupakan Divisio Monera, klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Enterobacteriacea, Genus Serratia dengan Spesies *Serratia liquefaciens*. Pada Nutrient Agar koloni bakteri berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, sel berbentuk batang dan merupakan gram negatif. Bakteri ini mampu memfermentasikan glukosa (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994), pada reaksi biokimia bakteri ini memberikan reaksi negatif terhadap uji : H_2S, Indol, Laktosa, Manitol, katalase, Oksidase, Ornitin dan Lisin.

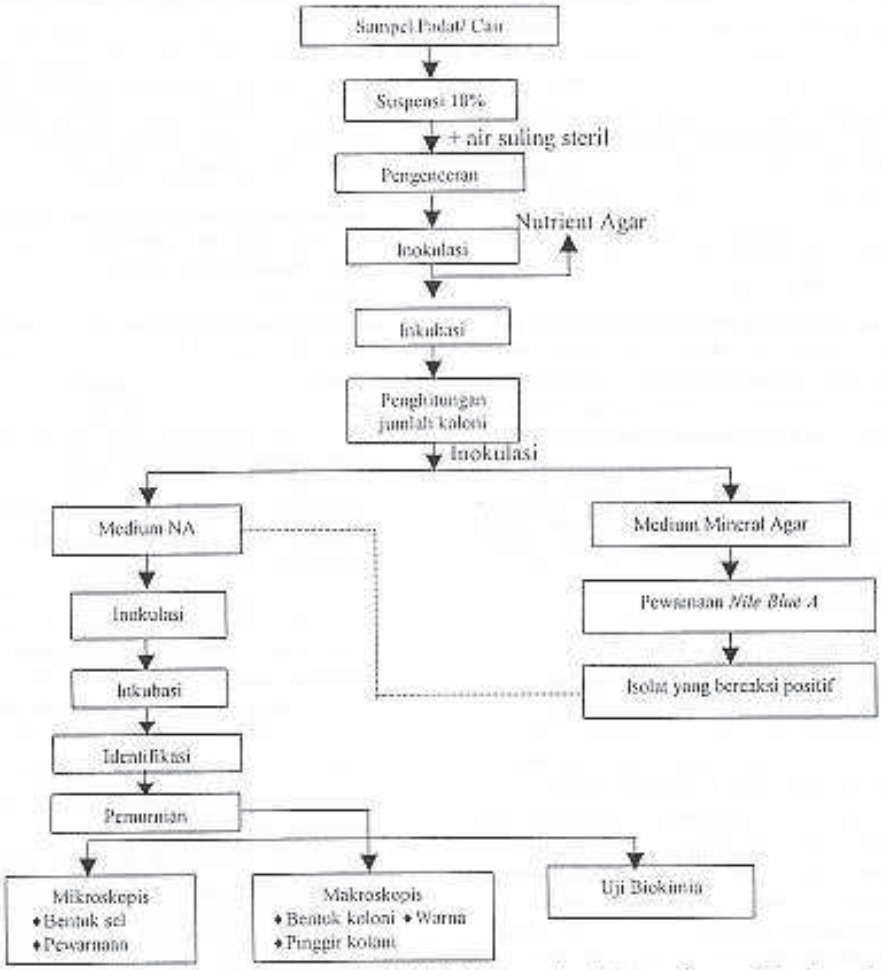
Pseudomonas sp merupakan Divisio Monera, Klas Schyzomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Pseudomonaceae, Genus Pseudomonas, Spesies *Pseudomonas* sp. Pada Nutrient Agar koloni bakteri ini berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih bening, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk ovoid sampai batang dan merupakan gram negatif. Bakteri ini mampu memfermentasikan glukosa (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994), reaksi biokimia bakteri yang negatif terhadap uji: Gas, H_2S, Indol, dan Voges Proskauer.

Enterobacter sp merupakan Divisio Monera, Klas Schyzomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Enterobacteriaceae, Genus Enterobacter, Spesies *Enterobacter* sp. Pada Nutrient Agar koloni berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, sel berbentuk ovoid sampai batang, dan merupakan gram negatif. Bakteri ini mampu memfermentasikan glukosa (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994), reaksi biokimia bakteri yang negatif terhadap uji : Gas, H_2S, Voges Proskauer, Katalase dan Ornitin.

Bacillus sp_1 merupakan Divisio Monera, Klas Schizomycetes, Ordo Eubacteriales, Famili Baciliaceae, Genus *Bacillus* sp. Pada Nutrient Agar koloni bakteri berbentuk bulat sampai oval tidak beraturan, warna koloni putih susu, pinggir koloni berlekuk, sel berbentuk oval sampai tidak beraturan dan merupakan gram positif. Bacillus sp_1 bersifat aerob tetapi mampu tumbuh pada kondisi anaerob fakultatif dan tidak mampu memfermentasikan gula (Cowan and Stells, 1973; Lay, 1994). Hasil dari uji biokimia bakteri yang negatif adalah terhadap uji : Indol, Laktosa, Sukrosa, Manitol, Voges Proskauer, Oksidasi Fermentasi dan Urea.

Dengan ditemukannya sebanyak sembilan spesies bakteri penghasil P(3HB) ini akan menambah koleksi mikroba penghasil P(3HB) yang telah dilaporkan selama ini. Untuk mengetahui sejauhmana kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan P(3HB) perlu dilakukan kajian lanjutan terutama fermentasi dengan menggunakan sumber karbon

tertentu. Sebelumnya, perlu ditentukan kondisi optimum fermentasi tersebut sehingga diperoleh P(3HB) dengan jumlah yang cukup tinggi di dalam sel bakteri. Biosintesis P(3HB) secara fermentasi telah banyak dilakukan terhadap berbagai strain bakteri penghasil. *Alcaligenes eutrophus*, satu dari bakteri penghasil P(3HB) yang dilaporkan mampu menghasilkan P(3HB) di dalam selnya mencapai 85 % b/b dengan menggunakan asam butirat sebagai sumber karbon tunggal (Doi, 1990). Selain itu telah dilaporkan juga *Erwinia* sp USMI-20 dapat menghasilkan P(3HB) dan kopolimernya P(3HB-ko-3HV) dari sumber karbon minyak kelapa sawit dan sumber karbon keduanya alkohol, diperoleh P(3HB) di dalam selnya mencapai 69 % b/b dan kopolimernya 47 % b/b (Akmal *et al*, 1998).



Gambar 1. Urutan proses skrining mikroorganisme penghasil P(3HB) dari sampel padat atau cair yang dilakukan pada percobaan ini.

Tabel 1. Kerapatan populasi bakteri tiap-tiap sampel setelah diinkubasi pada medium Nutrient Agar

No	Kode Sampel	Jumlah koloni Bakteri	Jumlah Sel Bakteri sel/gr: sel/ml
1.	A	142 136 123	$1,42 \times 10^{10}$ $1,32 \times 10^{10}$ $1,23 \times 10^{10}$
2.	B	132 142 129	$1,32 \times 10^{10}$ $1,42 \times 10^{10}$ $1,29 \times 10^{10}$
3.	C	209 157 138	$2,09 \times 10^{10}$ $1,57 \times 10^{10}$ $1,38 \times 10^{10}$
4.	D	123 138 146	$1,23 \times 10^{12}$ $1,38 \times 10^{12}$ $1,46 \times 10^{10}$
5.	E	166 198 170	$1,66 \times 10^{10}$ $1,98 \times 10^{10}$ $1,70 \times 10^{10}$
6.	F	106 102 114	$1,06 \times 10^{10}$ $1,02 \times 10^{10}$ $1,14 \times 10^{10}$
7.	G	115 121 120	$1,15 \times 10^{10}$ $1,21 \times 10^{10}$ $1,20 \times 10^{10}$
8.	H	89 94 92	$8,9 \times 10^{7}$ $9,4 \times 10^{9}$ $9,2 \times 10^{9}$

Keterangan :

A = Tanah dari Hutan Penelitian Biologi
B = Tanah dari Hutan Lindung Lembah Anai
C = Tanah rawa disekitar daerah sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman
D = Tanah Kapur dari Bukit Kapur Indarung
E = Air dari Pantai Padang
F = Air dari Danau Maninjau
G = Air dari Danau Singkarak
H = Air dari sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman.

Tabel 2. Isolat bakteri yang memberikan reaksi positif terhadap larutan *Nile Blue A*

No	Kode Sampel							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1.	-	-	C_3 51	D_3 94	E_3 32	-	G_3 7	H_3 44
2.	-	-	C_1 25	-	E_1 17	-	G_1 55	-
3.	-	-		-		-	G_2 36	-

Keterangan :

C = Isolat bakteri dari tanah rawa disekitar sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman
D = Isolat bakteri dari tanah kapur Bukit Kapur Indarung
E = Isolat bakteri dari air Pantai Padang
G = Isolat bakteri dari Danau Singkarak
H = Isolat bakteri dari sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman
$_{1,2,3}$dst = Kode sampel pada tingkat pengenceran yang sama
1,2,3,dst = Nomor isolat bakteri pada cawan petri yang memberikan reaksi positif

Tabel 3. Pengamatan mikroskopis dan uji biokimia bakteri

No	Kode Sampel	Mikroskopis		Uji Biokimia																		Spesies Bakteri	Kode koleksi di Lab. Mikrobiologi Farmasi UNAND
		Pewarnaan Gram	Bentuk	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1.	C_1 51	+	BS	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Bacillus brevis	PAAC 2211
2.	C_2 25	+	B	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Bacillus sp_1	PAAC 2212
3.	D_1 94	+	BS	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Bacillus alvei	PAAC 2213
4.	E_2 32	-	B	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	F	-	+	+	+	+	-	-	Serratia liquefaciens	PAAC 2214
5.	E_3 17	+	BS	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Bacillus circulans	PAAC 2215
6.	G_1 7	-	OB	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	O	+	+	+	+	+	-	+	Pseudomonas sp	PAAC 2216
7.	$G_2$36	-	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Alcaligenes sp	PAAC 2217
8.	$G_3$55	-	OB	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	F	+	+	+	+	+	-	+	Enterobacter sp	PAAC 2218
9.	H_3 44	+	B	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Bacillus sp_2	PAAC 2219

Keterangan :

1 = H_2S
2 = Gas
3 = Indol
4 = Motility
5 = Laktosa
6 = Glukosa
7 = Sukrosa
8 = Manitol
9 = Methyl Red
10 = Voges Proskauer
11 = Katalase
12 = Oksidasi Fermentasi
13 = Oksidase
14 = Urease
15 = Citrat
16 = Nitrat
17 = KCN
18 = Ornitin
19 = Lysin
F = Fermentasi Karbohidrat
B = Basil
BS = Basil Spora
OB = Basil Ovoid
O = Oksidasi

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Telah diisolasi sebanyak sembilan isolat bakteri yang memberikan reaksi positif (flouresensi jingga) terhadap pewarnaan dengan *Nile Blue A*, yaitu isolat C_7 51 dengan kode koleksi FAAC 20211 dan isolat C_3 25 dengan kode isolat FAAC 20212 dari tanah rawa disekitar sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman, Isolat D_3 94 dengan kode koleksi FAAC 20213 dari tanah kapur bukit kapur Indarung, isolat E_2 32 dengan kode koleksi FAAC 20214 dan isolat E_3 17 dengan kode koleksi FAAC 20215 dari air pantai Padang, isolat G_3 7 dengan kode koleksi FAAC-22016, isolat G_3 55 dengan kode koleksi FAAC 20217 dan isolat G_3 36 dengan kode koleksi FAAC 20218 dari air danau Singkarak, isolat H_3 44 dengan kode koleksi FAAC 20219 dari air sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman.

Dari identifikasi yang dilakukan terhadap isolat bakteri tersebut diperoleh sembilan spesies penghasil bioplastik, yaitu *Bacillus brevis*, *Bacillus* sp_1, *Bacillus alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Enterobacter* sp, *Bacillus* sp_2.

Saran

Disarankan pada peneliti berikutnya untuk mencari kondisi optimum pertumbuhan bakteri penghasil bioplastik yang telah didapat untuk selanjutnya digunakan dalam proses produksi senyawa bioplastik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebahagian data penelitian ini dibiayai oleh Program Duelike Universitas Andalas tahun 2001 di bawah Program Studi Farmasi dengan No. Kontrak 05/Due/Far-UA/2001, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan yang diberikan oleh Dikti Depdiknas RI.

DAFTAR PUSTAKA

Akmal, D., MN Azizan, M.I.A. Madjid, (2003). "Biodegradation of microbial polyester P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment", *J. Polym. Degrad. Stab.*, 80(3): 513-518.

Akmal, D., M.I.A.,Majid, M.S. Razip, M.N.Nazalan, dan M.N., Azizan (1998). Biosynthesis of a copolimer poly(3-hydroksibutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from palm oil and n-propanol or propionic acid as a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Proceeding The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, Tokyo, Japan.

Akmal, D., M.I.A. Madjid, MN Azizan (2001), "Fermentasi Plastik Mudah Lupus P(3HB) dari Glukosa sebagai Sumber Karbon Tunggal Menggunakan Bakteri *Erwinia* sp. USMI-20", *J. Biosci.*, 6(1): 11-15.

Cowan dan Steels (1973). *Manual For Identification of Medical Bacteria*, 2nd Ed, Cambridge University Press, London.

Doi, Y.(1990). *Microbial polyesters*, VCH Publisher Inc., New York.

Kunioka, M., Y. Kawaguchi and Y. Doi (1989). "Production of Biodegradable copoliester of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxy-butyrate *Alcaligenes eutrophus*" *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 30, 569-573.

Lay, B.W (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta,

Lee, S.Y (1996). Bacterial polyhydroxyalka-noates, *Biotechnol Bioeng*, 49, 1-14.

Ostle, G. A., and Holt, J. G.(1982), "Nile Blue A as a flourescent stain for poly-β-Hydroxybutyrate", *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 238-241.