

## ISOLASI, IDENTIFIKASI 16S rRNA DAN KARAKTERISASI MORFOLOGI BAKTERI PENDEGRADASI PLASTIK POLIETILEN (PE)

NORMA SAINSTIKA PANGESTU\*, ANTO BUDIHARJO, MG. ISWORO RUKMI

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Jl. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang,  
Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275. \*Telp. +6285747900093 email: [pangestu.norma@gmail.com](mailto:pangestu.norma@gmail.com)

**Abstract.** Plastic waste is one of the environmental issues that still need to be handled properly. plastic commonly used are basically formed by polyethylene which is contains chemical compound. Less cavity of plastic can disturb soil aeration which is important for other aerobic organism. This problem lead to increasing ecological threat. The main objective of present study is to isolate the soil microorganism that have a role as an agent through plastic degradation. Bacteria were isolated from the surface of the plastic which is buried in soil. The isolation is been carried out through soil serial dilution method and inoculated into selective *King's B* agar. Isolates were obtained and then tested the ability of degradation of the PE. Isolates with the highest degradation activity isolates G then identified using molecular methods based on 16S rRNA. the results showed that the 16S rRNA sequencing isolates G measuring 1,500 bp with the highest homologous species derived from the genus *Bacillus*.

**Keywords:** *Polyethylene, bacteria, biodegradation*

**Abstrak.** Limbah plastik merupakan salah satu masalah lingkungan yang masih perlu ditangani dengan baik. Plastik yang dipakai pada umumnya merupakan plastik jenis Polietilena (PE). Komponen kimiawi dan sifat *non-degradable* dari plastik menyebabkan plastik sulit untuk diuraikan sedangkan produksi terus dilakukan dengan demikian volume plastik akan terus bertambah. Volume kantong plastik yang semakin meningkat menjadikan plastik jenis ini menumpuk ditempat pembuangan sampah, bahkan terkubur didalam tanah dan mengganggu aerasi beberapa organisme aerob didalam tanah. Salah satu alternatif metode penguraian sampah plastik adalah dengan menggunakan mikroorganisme tanah yang berpotensi dalam penguraian sampah plastik. Isolasi dilakukan dengan mengekstraksi tanah kemudian kemudian menumbuhkan bakteri pada medium selektif yaitu *King's B* agar. Isolat yang didapat kemudian diuji kemampuan degradasinya terhadap plastik PE. Isolat bakteri dengan aktivitas degradasi tertinggi yaitu isolat G kemudian diidentifikasi menggunakan metode molekuler berdasarkan 16S rRNA. hasil sekuensing menunjukkan bahwa 16S rRNA isolat bakteri G berukuran 1.500 bp dengan spesies homolog tertinggi berasal dari genus *Bacillus*.

**Kata kunci:** *Polietilen, bakteri, biodegradasi*

### PENDAHULUAN

Jumlah sampah plastik saat ini semakin meningkat seiring dengan penggunaannya yang semakin luas. Jumlah peningkatan timbunan sampah di Indonesia

telah mencapai 175.000 ton/hari atau setara 64 juta ton/tahun (menlh.go.id, 2015). Sementara itu pengelolaan sampah plastik dirasa masih belum tepat sasaran, dan cenderung tidak ramah lingkungan. Menurut Kementerian lingkungan hidup, Berdasarkan

hasil studi yang dilakukan di beberapa kota tahun 2012, pola pengelolaan sampah di Indonesia sebagai berikut: diangkut dan ditimbun di TPA (69%), dikubur (10%), dikompos dan didaur ulang (7%), dibakar (5%), dan sisanya tidak terkelola (7%). Saat ini lebih dari 90% kabupaten/kota di Indonesia masih menggunakan sistem open dumping atau bahkan dibakar. Hal ini tentu menimbulkan berbagai permasalahan termasuk mengganggu kehidupan organisme disekitarnya.

Pastik merupakan polimer sintesis yang tersusun atas karbon, hidrogen dan oksigen (Sharma dan Sharma, 2004). Polietilen (PE) juga tersusun atas komponen yang mirip dengan penyusun senyawa organik, tetapi dengan nilai n yang berbeda. PE merupakan polimer termoplastik tersusun atas rantai hidrokarbon yang panjang (Furukawa *et al.*, 2006). Berbagai metode yang digunakan dalam proses pengolahan sampah seperti pembakaran, daur ulang, penguburan serta biodegradasi.

Biodegradasi plastik menggunakan agen mikrobiologis seperti bakteri dan fungi masih terus dipelajari. Tahun 2003 Kathiresan menguji beberapa jenis mikroorganisme yang diisolasi dari substrat akar mangrove untuk mengetahui kemampuan degradasi plastik melalui uji potensi selama satu bulan dalam rotary shaker. Hasilnya degradasi PE dalam kultur tunggal berkisar antara 2.19 % hingga 20.54 %.

Metode penguraian sampah masih terus dipelajari dan dikaji. Salah satu alternatif penguraian sampah plastik adalah dengan menggunakan mikroorganisme tanah yang berpotensi dalam penguraian sampah plastik. Beberapa spesies yang diketahui memiliki potensi mendegradasi sampah plastik diantaranya *Sphingomonas* sp dan *Pseudomonas* sp. Secara alami, mikroorganisme tersebut ada di dalam tanah, hidup dan menggunakan plastik sebagai sumber karbon untuk kelangsungan

hidupnya. Dengan demikian plastik-plastik tersebut dapat diurai menjadi unsur-unsur yang kemudian dapat dimanfaatkan kembali oleh organisme lain. Adanya potensi dari mikroorganisme inilah yang kemudian membuka kesempatan untuk dilakukannya penguraian sampah secara alami dengan bantuan mikroorganisme.

## ALAT BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah autoklaf, cawan petri, gelas kimia, gelas ukur, pipet volumetrik, pipet tetes, ose, lampu spiritus, sentrifuse, mikroskop cahaya, microscope slides, botol scoot, magnetic stirer, vortex dan penangas air. Bahan yang digunakan adalah ekstrak tanah disekitar Hortus Botanica, kantong plastik polietilena, bahan pembuat media berupa Nutrient Agar (NA), Nutrien Broth (NB), King's medium B agar, aquadest, sodium dodecyl sulphate (SDS), primer 27F, primer 1492R, 1 % agarosa, 0,5 % saponin dalam phosphat buffer saline (PBS), ddH<sub>2</sub>O, 1X PBS, 20 % chelex 100, 1X buffer TAE, KAPA 2G fast kits, marker (1kb DNA ladder II), loading dye, buffer Sodium Borate (SB), EtBr, kristal violet, iodine, alkohol, safranin, spiritus, korek api, kapas, aluminium foil, dan seal.

### Isolasi Bakteri

Sampel tanah yang diambil dari kawasan Hortus Botanicus Biologi Undip diencerkan dengan metode pengenceran standar. Sampel tanah kemudian diinokulasikan kedalam dua medium selektif yaitu King's medium B agar dan medium selektif streptomycin-piperacillin dalam NA (Yin, 2010).

### Uji Degradasi

Isolat diinokulasikan kedalam 100 ml nutrien minimal broth dalam erlenmeyer berbeda.

Tabung 1 bakteri yang diinokulasikan adalah isolat A, tabung 2 isolat G dan dan seterusnya hingga seluruh isolat (A, B, C, D, E, F, dan G) diinokulasikan. Erlenmeyer kemudian ditambahkan potongan plastik berukuran 1x1 cm<sup>2</sup> yang sudah di sterilisasi, kemudian diinkubasi dalam suhu 40 °C dan shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 8 minggu.

### Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan cara pengamatan morfologi dan identifikasi berdasarkan gen 16S rRNA. Identifikasi 16S rRNA dilakukan terhadap satu isolat yang memiliki aktivitas degradasi tertinggi. Proses identifikasi 16S rRNA diawali dengan ekstraksi DNA menggunakan metode Chelex 100 (Walsh *et al.*, 1991), kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan primer spesifik 16S rRNA yaitu primer 27F dan 1492R. Hasil amplifikasi kemudian disekuensing dan dianalisis menggunakan BLAST dalam NCBI. Identifikasi berdasarkan karakter morfologi dilakukan sebagai uji konfirmasi antara isolat bakteri G dan hits yang muncul dalam BLAST. Karakter morfologi yang diamati meliputi pengamatan bentuk, warna, tepian koloni dan pewarnaan gram.

## HASIL

### Isolat murni

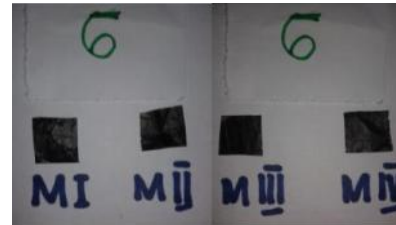
Hasil isolasi bakteri dari tanah yang diambil dari permukaan plastik yang terkubur diperoleh 9 isolat murni yang berhasil dikultur dan ditumbuhkan dalam bentuk biakan murni.



Gambar 1. Kultur murni isolat A, B, C, D, E, F, dan G

### Hasil Uji degradasi

Pengamatan aktivitas degradasi yang dilakukan selama 8 minggu dengan melihat tepian potongan plastik. Berdasarkan uji degradasi, diketahui bahwa isolat G merupakan isolat dengan aktivitas degradasi tertinggi.

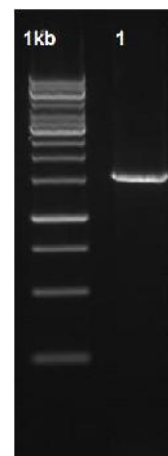


Gambar 2. Hasil pengamatan tepian plastik PE yang didegradasi oleh isolat G

### Identifikasi isolat bakteri

#### Identifikasi 16S rRNA

Hasil identifikasi 16S rRNA dari isolat G diketahui bahwa ukuran basanya yaitu sebesar 1.500 bp. Hasil sekuensing yang selanjutnya dimasukkan dalam program BLAST dalam menunjukkan bahwa isolat bakteri G homogen dengan 16S rRNA bakteri lain dari genus *Bacillus*.



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis 16S rRNA isolat G dalam 0,8 % gel agarosa dengan marker 1 kb DNA ladder

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Bacillus cereus strain JY2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2303	2303	95%	0.0	96%	F0E33C23.1
<a href="#">Uncultured Bacillus sp. clone C3D04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	94%	0.0	96%	KP016607.1
<a href="#">Bacillus sp. F221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	94%	0.0	96%	KJ918311.1
<a href="#">Bacillus sp. TAW 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	94%	0.0	96%	JX155396.1
<a href="#">Bacillus sp. C34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	94%	0.0	96%	JX010695.1
<a href="#">Bacillus cereus strain Se05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	94%	0.0	96%	JN730126.1
<a href="#">Bacillus sp. TR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2302	2302	95%	0.0	96%	FJ627446.1
<a href="#">Bacillus cereus strain BS14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2300	2300	94%	0.0	96%	KR063164.1
<a href="#">Bacillus cereus strain BS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2300	2300	94%	0.0	96%	KR763161.1
<a href="#">Bacillus sp. JB5128 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2300	2300	94%	0.0	96%	KM676360.1
<a href="#">Bacillus sp. IAT24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2300	2300	94%	0.0	96%	KJ944203.1

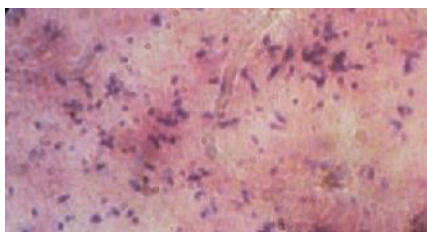
Gambar 4. Hits yang muncul dalam BLAST dari 16S rRNA isolat bakteri G

### Identifikasi morfologi

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi isolat potensial, yaitu isola G diketahui bahwa isolat G memiliki karakteristik sebagai berikut

Tabel 1. Perbandingan karakter isolat bakteri G dan *Bacillus*

Karakter morfologi	Isolat G	<i>Bacillus</i> (de Vos et al., 2009)
Bentuk	<i>Irregular</i>	<i>Circular - Irregular</i>
Warna	Putih	Putih-krem
Gram	Positif	Positif
Tepian	<i>Crenate</i>	<i>Crenate / fimbriate</i>
Bentuk sel	Basil	Basil



Gambar 5. Hasil pewarnaan gram isolat bakteri G (perbesaran 1000x)

### PEMBAHASAN

Berdasarkan uji aktivitas degradasi diketahui bahwa isolat G merupakan isolat yang menunjukkan aktivitas degradasi yang paling tinggi. Mikroorganisme tanah

diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi plastik. Penelitian oleh Zufahair dkk. (2007) menunjukkan bahwa isolat bakteri GT3 mampu mendegradasi polietilen sebesar 2.33 % dalam waktu satu bulan. Kathiresan (2003) menguji kemampuan degradasi polietilen dari isolat bakteri yang berasal dari substrat perakaran mangrove yaitu *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* dan *Streptococcus* yang diisolasi dari substrat perakaran mangrove. Hasilnya menunjukkan masing-masing isolat tunggal tersebut dapat mendegradasi polietilen sebesar 2.19 % hingga 20.54 % dalam waktu satu bulan. Penelitian Wu (2012) menunjukkan bahwa *Azospirillum brasilense* BCRC 12270 dapat mendegradasi total *Poli butylene succinate adipate* (PBSA) suatu polimer alifatik penyusun komponen plastik, dalam waktu 20-40 hari.

Identifikasi dilakukan untuk mengetahui identitas isolat G berdasarkan karakter yang tampak. Berdasarkan identifikasi molekuler dengan 16S rRNA sebagai gen target menunjukkan bahwa isolat bakteri G homogen dengan genus *Bacillus* dengan nilai identitas sebesar 96 %. Identifikasi melalui pengamatan morfologi isolat G juga dilakukan sebagai uji konfirmasi. Perbandingan antara karakter morfologi antara isolat bakteri G dan genus *Bacillus* ditampilkan dalam tabel 1. *Bacillus*

merupakan bakteri gram positif, berbentuk basil, sel dapat berbentuk rantai panjang, berpasangan atau tunggal. Karakter koloni *Bacillus* sangat beragam namun dapat dikenali, yaitu : ukuran koloni dengan diameter 2-7 mm, bentuk circular atau irregular, tepian crenate atau fimbriate, tekstur granula, warna koloni keputihan hingga krem namun beberapa strain mampu memproduksi pigmen coklat kemeraan, pigmen diffusible kuning atau pigmen fluorescent hijau kekuningan. Suhu minimal untuk pertumbuhan *Bacillus* adalah 10-20 °C dan suhu maksimal 40-45 °C, dengan suhu optimum sekitar 37 °C (de Vos *et al.*, 2009).

#### SIMPULAN

Isolat G merupakan isolat yang memiliki aktivitas degradasi terbesar dibandingkan dengan delapan isolat lain yang diperoleh. Berdasarkan identifikasi molekuler dan uji konfirmasi berdasarkan karakter morfologi diketahui bahwa isolat G memiliki kemiripan/ homolog dengan genus *Bacillus*.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. rer. nat. Anto Budiharjo, S.Si., M.Biotech. dan Dra. MG. Isworo Rukmi, M.Kes selaku dosen pembimbing yang telah memberikan masukan dan bimbingan dalam penyusunan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada segenap keluarga besar Jurusan Biologi Universitas Diponegoro untuk bantuan dan dukungannya.

#### DAFTAR PUSTAKA

de Vos, P., G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer & W.B. Whitman (ed). 2009. *Bergey's Manual of*

*Systematic Bacteriology* Second Edition Volume Three : The Firmicutes. Springer. USA.

Kathiresan, K. 2013. Polythene and Plastics Degrading Microbes from The Mangrove Soil. *Rev. Biol. Trop.*, 51(3) : 629-634

Sharma, A & S. Amitab. 2004. Degradation Assesment of Low Density Polyethylene (LDP) and Polyethene (PP) by an Indigenous Isolate of *Pseudomonas stutzeri*. *J Sci. Ind. Res. India*, 63: 293-296.

Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 54 (3): 134-139

Wu, C.S. 2012 Characterization and biodegradability of polyester bioplastic-based green renewable composites from agricultural residues. *Polymer Degradation and Stability* 97: 64-71.

Yin MS, Yau YC, Matlow A, So JS, Zou J, Flemming CA, Schraft H, Leung KT. 2010. A novel selective growth medium-PCR assay to isolate and detect *Sphingomonas* in environmental samples. *J Microbiol Methods.*,82(1):19-27.

Zusfahair, P. Lestari, D.R. Ningsih & S. Widyarningsih. 2007. Biodegradasi Polietilena Menggunakan Bakteri Dari TPA (Tempat Pembuangan Akhir) GunungTugel Kabupaten Banyumas. *Molekul*, 2 (2): p. 98-106.