

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Mei - Juni 2023 di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Sumatera Utara.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Botol steril, cling wrap, cool box, ice pack, aluminium foil, autoclave, incubator, Bunsen, beaker glass, Erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, jarum ose, object glass, pipet tetes, mikroskop, rak tabung reaksi, penjepit tabung, hot plate, neraca analitik, pipet ukur, vortex.

3.2.2 Bahan

Sampel air, larutan NaCl, hydrogen peroksida (H₂O₂) 3%, alcohol, aquadest, gentian violet, iodine, safranin, minyak imersi, media TSB (Triptoy Soy Broth), media SIM (*Sulfid Indol Motility*), media SCA (Simon Citrat Agar), Nutriet agar (NA), Nutrient Borth (NB), TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*).

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode yang bersifat eksperimen laboratorium yang dirancang secara deskriptif melalui beberapa tahap penelitian yaitu pengambilan sampel, isolasi bakteri mikroplastik, uji degradasi, karakterisasi makroskopis dan mikroskopis, uji biokimia.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel air diambil di pinggiran sungai mencirim menggunakan botol steril yang bervolume 150 ml dengan posisi mulut botol steril menghadap keatas yang kemudian dicelupkan kedalam air beberapa saat, lalu ditutup disimpan kedalam coolbox yang berisi ice pax dan dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Universitas

Sumatera Utara. Pemberian ice pack bertujuan untuk menghindari pertumbuhan bakteri selama perjalanan ke laboratorium sehingga sampel dapat memberikan gambaran kondisi mikrobiologis yang sebenarnya.

3.4.2 Isolasi Bakteri Pendegradasi Mikroplastik

Isolasi bakteri dilakukan untuk menumbuhkan bakteri yang terdapat pada sampel sedimen menggunakan media tertentu sehingga berbagai jenis bakteri dengan karakteristik berbeda dapat tumbuh dan berkembang. Cara kerjanya yaitu dengan cara dimasukkan 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml aquadest dan dihomogenkan menggunakan vortex sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} . Diambil 1 ml pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung berikutnya yang telah berisi aquadest homogenkan sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Dilakukan pengenceran selanjutnya hingga didapatkan hasil pengenceran 10^{-6} . Hasil dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-6} diinokulasi ke dalam cawan petri yang telah berisi media NA menggunakan metode cawan sebar dan diratakan dengan *hockey stick*, lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C .

Selanjutnya dilakukan uji degradasi dengan cara plastik ukuran 2cm x 2cm ditimbang berat awalnya, dicuci dengan akuades steril dan disemprot dengan alkohol 70%. Selanjutnya sampel plastik dimasukkan ke dalam botol sampel kaca secara aseptik yang berisi media TSB sebanyak 50 ml. Kemudian diinokulasi sebanyak 2 lup isolat bakteri ke media tersebut, di shaker pada suhu ruang dengan agitasi 130 rpm selama 14 hari. Setelah itu diletakkan di shaker, sampel sampah plastik dicuci dengan akuades steril dan disemprot dengan alkohol 70%. Sampel sampah plastik dikeringkan, kemudian ditimbang berat akhirnya. Potongan plastik ditimbang menggunakan neraca analytical balance, kemudian menentukan persentasi degradasi sampel limbah plastik oleh bakteri yang dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Mardalisa *et al.*, 2021) :

$$\% \text{ degradasi} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100$$

3.4.3 Karakterisasi Morfologi Bakteri

Karakterisasi yang dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, tepian dan warna koloni bakteri yang tumbuh pada media NA (Purwaningsih, 2003).

3.4.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara *object glass* dicuci terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% dan ditetesi aquadest, kemudian difiksasi diatas api bunsen. Diambil 1 ose biakan bakteri secara aseptis diletakkan dan diratakan diatas *object glass*, lalu dikeringkan dengan cara difiksasi diatas api bunsen. Ditetesi kristal violet yang berfungsi sebagai pewarna primer dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan aquades, kemudian ditetesi iodin didiamkan selama 1 menit dan dibilas dengan aquades, selanjutnya ditetesi dengan alkohol selama 30 detik kemudian dibilas dengan aquades dan terakhir ditetesi safranin selama 1 menit. Dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 100x yang telah ditetesi minyak imersi. Pengamatan yang dilihat meliputi warna dan bentuk. Hasil pewarnaan jika berwarna merah maka bakteri gram negatif sedangkan berwarna ungu bakteri gram positif. Pengamatan bentuk dilihat apakah memiliki bentuk coccus, basil, spiral (Pratita & Putra, 2012).

3.4.5 Uji Biokimia

3.4.5.1 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian diletakkan diatas *object glass* dan ditetesi menggunakan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% sebanyak 2-3 tetes. Uji positif ditandai dengan adanya gelembung-gelembung oksigen, sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya gelembung-gelembung oksigen (Suhartanti *et al.*, 2010).

3.4.5.2 Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian ditusukkan ke dalam media SIM, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar disekitar tusukan maka bakteri tersebut dapat bergerak (motil) dan apabila pertumbuhan bakteri tidak menyebar yang hanya berupa garis di sepanjang tusukan menandakan hasil negatif (Yulvizar, 2013).

3.4.5.3 Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memecahkan glukosa, laktosa dan sukrosa. Uji TSIA dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada permukaan media TSIA miring, dan diinkubasi selama 1 x 24 jam, kemudian dilakukan pengamatan terhadap hasil uji. Hasil uji dengan warna medium kuning menandakan asam, warna merah menandakan basa. Hitam menandakan terbentuknya gas H₂S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu memproduksi gas H₂S (Sari *et al.*, 2015).

3.4.5.4 Uji Sitrat

Uji Sitrat dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian digoreskan kedalam media SCA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna pada media menjadi biru sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Kosasi *et al.*, 2019).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil karakterisasi disajikan secara deskriptif meliputi karakterisasi morfologi dan biokimia, kemudian dilakukan identifikasi bakteri pendegradasi limbah mikroplastik menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology 7th Edition*.