



Tesis - SB142502

Kapang Tanah Mangrove Wonorejo Pendegradasi Plastik

ALFIA RAHMA KURNIAWATI

NRP.1515 201 201

DOSEN PEMBIMBING

Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si.

PROGRAM MAGISTER

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS ILMU ALAM

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2018

LEMBAR PENGESAHAN

Kapang Tanah Mangrove Wonorejo Pendegradasi Plastik

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh
Alfia Rahma Kurniawati
NRP : 1515201201

Tanggal Ujian : 26 Januari 2018
Periode Wisuda : Maret 2018

Disetujui oleh :

1. Dr. rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si. (Pembimbing)

NIP : 19690907 199803 2 001

2. Dr. Enny Zulaika, MP. (Penguji I)

NIP: 19600109 198303 2 001

3. Dr. rer.nat. Edwin Setiawan, M.Sc. (Penguji II)

NIP: 19771224 200801 1 006

Fakultas Ilmu Alam

Institut Teknologi Sepuluh Nopember



Prof. Dr. rer. nat. Agus Rubiyanto, M. Eng. Sc.

NIP : 19650619 198903 1 001

KAPANG TANAH MANGROVE WONOREJO PENDEGRADASI PLASTIK

Nama Mahasiswa : Alfia Rahma Kurniawati
ID Mahasiswa : 1515 201 201
Pembimbing : Dr.rer.nat. Maya Shovitri, M.Si

ABSTRAK

Penimbunan sampah plastik menjadi sumber polutan utama karena sifatnya yang inert. Sampah plastik sulit terdegradasi dan membutuhkan penanganan yang serius dari semua pihak. Biodegradasi merupakan solusi paling efektif untuk pengelolaan sampah plastik. Mikroorganisme yang dapat bertindak sebagai agen hayati pendegradasi plastik ini diantaranya adalah kapang. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi kapang tanah mangrove Wonorejo yang dilanjutkan dengan uji biodegradasi dan deteksi enzim. Hasil isolasi didapatkan delapan isolat yakni *Perenniporia* sp. (LM1018), *Trametes polyzona* (LM1020), *Aspergillus terreus* (LM1021), *Aspergillus terreus* (PF1), *Porostereum spadiceum* (PF2), *Leptosphaerulina chartarum* (PF3), *Aspergillus fumigatus* (S2) dan *Hypocreales* sp. (S3), identifikasi tersebut dilakukan berdasarkan morfologi dan molekuler pada area ITS rDNA. Uji biodegradasi dilakukan selama 30 hari dengan metode pengocokan. Parameter hasil biodegradasi diantaranya adalah % efisiensi degradasi, uji FTIR, uji SEM dan AFM. Isolat *A. terreus* LM1021 menunjukkan potensi tertinggi dalam degradasi plastik dengan nilai % ED sebesar 12,5% pada plastik LDPE dan 4,9% pada plastik putih. Dan diikuti oleh LM1018 dengan % ED sebesar 10,6% pada plastik LDPE dan 3,4% pada plastik putih. Kerusakan plastik dari hasil biodegradasi ditunjukkan oleh hasil SEM dan AFM yang menunjukkan erosi pada permukaan plastik. Selanjutnya deteksi enzim dilakukan secara kualitatif pada medium uji lakase, mangan peroksidase, alkana hidroksilase dan lipase. Isolat LM1018 menunjukkan hasil positif pada keempat enzim, isolat LM1020 menunjukkan hasil negatif pada enzim lipase, isolat PF2 negatif pada enzim alkana hidroksilase, isolat LM1021 dan PF1 positif pada enzim lipase dan alkana hidroksilase, dan isolat S2 hanya positif pada enzim lipase. Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh diharapkan dapat menambah keragaman mikroorganisme pendegradasi plastik di Indonesia dan dapat menjadi agen bioremediasi yang potensial untuk menyelesaikan masalah limbah plastik di Indonesia.

Kata kunci : Karakterisasi molekuler, uji biodegradasi dan deteksi enzim

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”.

Plastic Biodegradation Performed by New Isolated Molds from Wonorejo Mangrove Soil

Student name : Alfia Rahma Kurniawati
Student ID : 1515 201 201
Supervisor : Dr.rer.nat. Maya Shovitri, M.Si

ABSTRACT

Dumping plastic waste become a major source of pollutants because of its inert nature. Plastic waste is difficult to degrade and requires serious handling from all parties. Biodegradation is the most effective solution for waste management. Microorganisms that can act as biological agents such as degradation of plastic is mold. In this research, Wonorejo mangrove soil isolation was followed by biodegradation and enzyme detection test. The isolation result obtained eight isolates namely *Perenniporia* sp. (LM1018), *Trametes polyzone* (LM1020), *Aspergillus terreus* (LM1021), *Aspergillus terreus* (PF1), *Porostereum spadiceum* (PF2), *Leptosphaerulina chartarum* (PF3), *Aspergillus fumigatus* (S2) and *Hypocreales* sp. (S3), the identification is done based on morphology and molecular in ITS rDNA region. Biodegradation test was conducted for 30 days with shaking method. Parameters of biodegradation result are % degradation efficiency, FTIR test, SEM and AFM test. Isolate *A. terreus* LM1021 showed the highest potential in plastic degradation with an DE value of 12.5% in LDPE plastics and 4.9% in white plastic. And followed by LM1018 with% DE of 10.6% on LDPE plastic and 3.4% on white plastic. Destruction of plastic from biodegradation results is shown by SEM and AFM results indicating erosion on the surface. Further enzyme detection is carried out qualitatively on lacase test medium, manganese peroxidase, hydroxylase alkane and lipase. LM1018 showed positive results on all four enzymes, whereas LM1020 showed negative results on lipase enzyme, isolate PF2 negative in alkane hydroxylase, LM1021 and PF1 was positive on lipase and alkane hydroxylase and S2 only positive in lipase. Based on the results of the research is expected to increase the diversity of plastic degradation microorganisms in Indonesia and can be a potential bioremediation agent to solve the problem of plastic waste in Indonesia.

Keywords : Isolation of molds, biodegradation tests, and enzyme detection

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”.

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjangkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul **Kapang Tanah Mangrove Wonorejo Pendegradasi Plastik** di Departemen Biologi Fakultas Ilmu Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Proses penyusunan Tugas Akhir ini tidak terlepas dari dorongan dan bimbingan dari pihak-pihak terkait. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu yaitu:

1. Ketua Departemen Biologi ITS atas dukungan dan arahan kepada penulis.
2. Ibu Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si. selaku dosen pembimbing yang selalu memberikan semangat dan waktu serta bimbingannya dalam penyusunan laporan tesis ini.
3. Ibu Dr. Enny Zulaikka, MP. Dan Bapak Dr.rer.nat. Edwin Setiawan, M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penulisan laporan tesis ini supaya menjadi lebih baik.
4. BK21 *plus foundation* dan Prof. Min-Kyu Oh serta tim dari *Korea University* atas beasiswa *Research Collaboration* di *System Biology Engineering Laboratory of Chemical and Biological Engineering Department*.
5. Ibu N.D Kuswytasari, S.Si.,M.Si. yang selalu memberikan semangat, waktu, serta bimbingannya dalam penyusunan laporan tesis ini.
6. Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi ITS yang telah memfasilitasi penggunaan bahan kimia dan alat instrumen dalam penelitian ini.
7. Serta semua pihak yang mendukung lancarnya pelaksanaan penelitian ini.

Dalam penulisan laporan ini penulis menyadari akan adanya kekurangan-kekurangan akibat dari keterbatasan pengetahuan penulis. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran membangun dari semua pihak untuk dapat lebih baik di masa yang akan datang. Dan akhirnya kami mengharapkan semoga laporan ini bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, 31 Januari 2018

Alfia Rahma Kurniawati

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	
2.1 Definisi Plastik.....	7
2.2 Biodegradasi Plastik.....	9
2.3 Analisa Biodegradasi Polimer.....	13
2.3.1 Analisa FTIR	14
2.3.2 Analisa morfologi plastik	16
2.4 Kapang Sebagai Agen Pendegradasi Polimer.....	17
2.5 Karakterisasi Molekuler Kapang	19
2.5.1 Molekuler Genetik Kapang.....	19
2.5.2 Analisa Data Bioinformatika	21
2.6 Enzim Pendegrasi Plastik.....	22
BAB 3 METODA PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Metode yang Digunakan	25
3.2.1 Isolasi dan Purifikasi Kapang Pendegradasi Plastik	25
3.2.2 Karakterisasi Isolat secara Fenotipik.....	26
3.2.3 Karakterisasi Isolat secara Genotipik	26
3.2.3.1 Ekstraksi Genom DNA	26
3.2.3.2 Amplifikasi dan Purifikasi ITS rDNA	27

3.2.3.3 Purifikasi Produk Amplifikasi.....	28
3.2.3.4 Pembacaan Sekuen dan Analisa Bioinformatika	29
3.2.4 Uji Biodegradasi	29
3.2.4.1 Preparasi medium	30
3.2.4.2 Uji Biodegradasi.....	30
3.2.5 Evaluasi Hasil Degradasi Plastik	30
3.2.5.1 Pengukuran Prosentase Efisiensi Degradasi dan Biomassa	30
3.2.5.2 Pengukuran FTIR	31
3.2.5.3 Pengamatan SEM	31
3.2.5.4 Pengamatan AFM.....	31
3.2.6 Deteksi Enzim Pendegradasi Plastik	32
3.2.6.1 Uji Kualitatif Enzim Lakase dan Mangan peroksidase	32
3.2.6.2 Uji Kualitatif Enzim Alkana Hidroksilase	32
3.2.6.3 Uji Kualitatif Enzim Lipase	32
3.3 Analisa Data	32
3.4 Rancangan Pelenelitian	33
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Isolasi Kapang Tanah Mangrove Wonorejo	35
4.1.1 Morfologi isolat kapang tanah mangrove Wonorejo	36
4.1.2 Karakterisasi molekuler isolat kapang tanah mangrove Wonorejo	38
4.2 Biodegradasi Plastik	42
4.3 Deteksi Enzim Yang Terlibat Dalam Proses Biodegradasi	50
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Jenis dan Kegunaan Plastik Sintetik	7
Tabel 2.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Biodegradabilitas.....	9
Tabel 2.3 Spektrum Gugus Fungsional IR	15
Tabel 2.4 Daftar Jamur Pendegradasi Polimer.....	18
Tabel 3.1 Karakterisasi Fenotipik Kapang Pendegradasi Plastik.....	32
Tabel 3.2 Karakterisasi Genotipik Kapang Pendegradasi Plastik.....	32
Tabel 3.3 Ekstraksi dan Potensi Enzim Pendegradasi Plastik.....	33
Tabel 3.3 Analisa Nilai Degradasi	34
Tabel 4.1 Identifikasi Kapang Tanah Mangrove Wonorejo secara Genotipik.....	40
Tabel 4.2 Uji Kualitatif Enzim Pendegradasi Plastik	50

“Halaman ini Sengaja dikosongkan”.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme Biodegradasi Polietilen.....	11
Gambar 2.2 Skema Gambaran Pembentukan Biofilm di Permukaan Polimer	12
Gambar 2.3 Pengamatan Biodegradasi Polimer.....	14
Gambar 2.4 Spektra Inframeran dari Beberapa Polimer yang Umum	15
Gambar 2.5 Prinsip Kerja Instrumen AFM.....	16
Gambar 2.6 Organisasi dan Proses Gen Eukariotik rRNA	20
Gambar 2.7 Diagram Lokasi Primer pada Ribosomal	21
Gambar 2.8 Strategi Pertumbuhan Fungi pada Polimer.....	23
Gambar 4.1 Morfologi Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo.....	37
Gambar 4.2 Hasil Amplifikasi Area ITS rDNA.....	39
Gambar 4.3 Analisa Filogenetik dari Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo	41
Gambar 4.4 Pengamatan Bentukan Hifa	43
Gambar 4.5 Grafik Nilai Degradasi	43
Gambar 4.6 Hasil Uji Plastik LDPE menggunakan FTIR	45
Gambar 4.7 Pengamatan SEM pada Permukaan Plastik.....	47
Gambar 4.8 Pengamatan Permukaan Plastik LDPE menggunakan SEM &AFM	49
Gambar 4.9 Uji Kualitatif Lipase	51
Gambar 4.10 Uji Kualitatif Alkana Hidroksilase.....	52
Gambar 4.11 Uji Kualitatif Lakase dan Mangan Peroksidase	53

“Halaman ini Sengaja dikosongkan”.

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema Kerja	67
Lampiran 2 Komposisi Medium	68
Lampiran 3 Sekuen Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo.....	69
Lampiran 4 Hasil Uji Biodegradasi.....	71
Lampiran 5 Hasil Analisa Data	72
Lampiran 6 Penampakan Biofilm	74
Lampiran 7 Hasil FTIR	75
Lampiran 8 Hasil Deteksi Enzim	83

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sampah plastik menjadi sumber polutan utama karena plastik memiliki berat molekul tinggi, struktur kompleks, bersifat hidrofobik dan inert sehingga sulit terdegradasi. Perkiranya umum timbunan sampah plastik di seluruh dunia setiap tahunnya meningkat sekitar 25 juta ton per tahun (Kaseem *et al.*, 2012). Degradasi plastik secara alami membutuhkan waktu ratusan tahun bahkan ribuan tahun (Sanjaya, 2013). Keadaan ini akan menimbulkan masalah dan dibutuhkan penanganan yang serius dari semua pihak.

Beberapa cara penanganan sampah plastik terus diupayakan, salah satunya adalah dengan optimalisasi biodegradasi. Biodegradasi memecah polimer menjadi karbondioksida, air dan biomassa sebagai akibat dari tindakan mikroorganisme hidup yang mengkonsumsi materi tersebut sebagai sumber karbon (Ursa *et al.*, 2003). Organisme yang dapat bertindak sebagai agen hayati pendegradasi plastik ini diantaranya adalah kapang.

Kapang merupakan dekomposer utama di alam yang mampu membentuk koloni pada berbagai kondisi lingkungan. Kemampuan bertahan lama pada kondisi tercekam dan sifatnya yang saprotropik menyebabkan kapang mampu menghasilkan beberapa enzim pendegradasi senyawa rekalsitran (Atiq *et al.*, 2011). Beberapa enzim yang terlibat dalam biodegradasi plastik meliputi enzim ligninolitik (mangan peroksidase, lignin peroksidase dan lakase) pada degradasi salah satu jenis plastik yakni polietilen (Ehara *et al.*, 2000; Premraj and Mukesh, 2005; Ameen *et al.*, 2015; Sowmya *et al.*, 2015), alkana hidroksilase pada degradasi salah satu komponen plastik yakni senyawa hidrokarbon (Fish *et al.*, 1983; Van Beilen *et al.*, 2003; Van Beilen *and* Funhoff, 2007; Mishrah *and* Singh, 2012) dan enzim lipase dalam degradasi plastik (Skariyachan, 2015; Eberl *et al.*, 2009; Bhardwaj *et al.*, 2012) serta

enzim pendegradasi plastik lainnya yang masing masing enzim mengkatalis spesifik pada substratnya.

Kapang telah diketahui memiliki kemampuan sebagai agen pendegradasi plastik (Kathireshan, 2003; Okoh dan Atauanya 2014; Albertsson and Karlsson, 1990; Manzur *et al*, 2004). Kathiresan (2003) melaporkan kapang *Aspergillus glaucus* dan *Aspergillus niger* yang didapatkan dari tanah mangrove mampu mendegradasi plastik sebesar 28,8% dan 17,35%. Okoh *and* Atauanya (2014) juga melaporkan kapang indigenus dari tanah peternakan, yaitu *Aspergillus* sp dan *Penicillium* sp. yang mampu mendegradasi plastik sebesar 25,5% dan 25,3%. Perbedaan potensi isolat dalam mendegradasi dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (suhu, pH, salinitas) dari daerah isolasi yang berbeda.

Kawasan mangrove merupakan perbatasan antara lingkungan daratan dengan lingkungan laut yang di dalamnya terdapat hutan bakau. Kondisi tersebut menyebabkan kawasan mangrove menanggung beban terkumpulnya sampah plastik buangan dari daratan. Keberadaan sampah plastik di daerah mangrove memungkinkan ditemukannya mikroorganisme terutama kapang yang dapat mendegradasi plastik. Seperti pada penelitian pada kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi ITS berhasil mengisolasi kapang pendegradasi plastik (Nathania dan Kuswytasari, 2013; Jamila, 2014).

Nathania dan Kuswytasari (2013) melaporkan potensi kapang pendegradasi bioplastik *Poly Hydroxy Butyrate* yang dilakukan pada medium cair dengan masa inkubasi 25 hari diantaranya isolat dengan kode LM 1031 (98,32%), LM 1018 (97,92%), LM 1015 (87,95%), LM 1021 (44,92%) dan LM 1020 (23,46%). Jamila (2014) juga melaporkan potensi kapang pendegradasi kantong plastik pada medium cair selama 35 hari masa inkubasi dengan pengocokan yaitu isolat dengan kode LM 1020 (5,09%), LM 1018 (4,82%) dan LM 1021 (3,26%).

Keberhasilan dari biodegradasi sangat tergantung pada kemampuan mikroorganisme yang dipengaruhi oleh genetik dan kondisi lingkungan. Sehingga

perlu dilakukan karakterisasi agen pendegradasi baik secara fenotipik maupun genotipik. Karakterisasi kapang umumnya dilakukan secara fenotipik berdasarkan pada struktur makroskopik dan mikroskopik (Larone, 2002; Watanabe, 2002), namun karakteristik ini dapat berubah tergantung pada kondisi lingkungan. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi secara genotipik.

Karakterisasi genotipik kapang secara molekuler dapat dilakukan berdasarkan 18S rDNA dan area *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Fragmen 18S rDNA dianggap sebagai marker yang praktis dalam analisis genotipe molekul (Duong *et al.*, 2006). Namun identifikasi 18S rDNA mengalami pergeseran, saat ini telah banyak area ITS rDNA yang telah di sekuen untuk sistematika molekuler fungi, seperti pada identifikasi kelompok Ascomycota, Basidiomycota dan Zygomycota (Gardes and Bruns, 1993; Dickie *et al.*, 2002; Klamer *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003a,b; Izzo *et al.*, 2005). Karakterisasi berdasarkan area ITS rDNA lebih cepat dan tepat untuk analisis fungi daripada 18S rDNA (Liu *et al.*, 2015), karena derajat variasi area ITS lebih tinggi dari area gen lainnya pada rDNA (SSU dan LSU). Diantara berbagai macam primer standar ITS rDNA, primer standar ITS1 dan ITS4 dipilih karena memungkinkan amplifikasi selektif pada sekuensi kapang (Gardes and Bruns, 1993).

Dalam penelitian ini, akan dilakukan isolasi dan identifikasi kapang tanah mangrove Wonorejo dan dilanjutkan dengan uji kualitatif enzim pendegradasi plastik, serta uji biodegradasi plastik. Uji biodegradasi plastik dilakukan pada tiga isolat uji dengan metode pengocokan pada medium cair. Plastik uji yang digunakan adalah kantong plastik putih dan plastik LDPE. Pemilihan dua jenis plastik berdasarkan pada komposisi penyusunnya dimana kantong plastik putih dibuat dengan beberapa campuran zat additif dan polimer polietilen, sedangkan plastik LDPE dibuat dari polimer polietilen murni dengan densitas rendah.

1.2 Perumusan Masalah

Potensi isolat kapang pendegradasi plastik dari penelitian sebelumnya perlu dilakukan pengujian lanjutan, khususnya untuk mengetahui karakter genotipik

kapang dan potensinya dalam mendegradasi plastik. Berdasarkan informasi yang telah disampaikan diatas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana hasil identifikasi dari kapang tanah Mangrove Wonorejo mendegradasi plastik berdasarkan karakteristik morfologi dan molekulernya?
2. Bagaimana kemampuan isolat kapang tanah mangrove Wonorejo dalam mendegradasi plastik?
3. Apakah isolat kapang tanah mangrove Wonorejo mampu menghasilkan enzim mangan peroksidase, lakase, lipase dan alkana hidroksilase yang berperan dalam proses biodegradasi plastik secara kualitatif?

1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tanah uji yang digunakan adalah tanah mangrove diambil dari kawasan mangrove Wonorejo Surabaya
2. Plastik uji yang digunakan adalah plastik “kresek” sintetik berwarna putih (non biodegradable) yang tidak diketahui komponen penyusunnya. Dan plastik LDPE yang murni.
3. Uji potensi kemampuan isolat dalam memproduksi enzim mendegradasi plastik dibatasi pada deteksi enzim lipase, lakase, mangan pereoksidase dan alkana hidroksilase secara kualitatif
4. Pengamatan morfologi plastik menggunakan SEM dan AFM dilakukan pada plastik LDPE

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui hasil identifikasi dari kapang tanah Mangrove Wonorejo mendegradasi plastik berdasarkan karakteristik morfologi dan molekulernya.
2. Mengetahui kemampuan isolat kapang tanah mangrove Wonorejo dalam mendegradasi plastik

3. Mengetahui isolat kapang tanah mangrove Wonorejo yang mampu menghasilkan enzim mangan peroksidase, lakase, lipase dan alkana hidroksilase yang berperan dalam proses biodegradasi plastik secara kualitatif

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil yang diperoleh dapat memberikan informasi tentang jenis kapang tanah mangrove Wonorejo yang berpotensi dalam mendegradasi plastik, untuk menambah data dan infomasi keragaman mikroorganisme di Surabaya, Jawa Timur dan Indonesia dan diharapkan dapat menjadi agen biodegradasi yang potensial untuk menyelesaikan masalah limbah plastik di Indonesia.

“Halaman ini sengaja dikosongkan“

BAB 2

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1. Definisi Plastik

Plastik merupakan salah satu polimer sintetik yang dibuat oleh manusia. Plastik pertama kali ditemukan oleh seorang peneliti dari Amerika Serikat pada tahun 1968 yang bernama Jhon Wasley, Hyatt, hingga saat ini plastik menjadi primadona bagi dunia industri. Produksi plastik diseluruh negara lebih dari 100 juta ton per tahunnya. Plastik terdiri dari bahan berbasis minyak bumi yang disebut resin. Sifat resistensi plastik menyebabkan sampah plastik tetap dalam bentuk aslinya dalam waktu yang sangat lama (Kumar *et al.*, 2007).

Plastik dibagi menjadi dua kelompok: termoplastik dan termoset plastik. Termoplastik adalah produk dari reaksi adisi atau reaksi rantai. Termoplastik dapat berulang kali melunak dan mengeras dengan pemanasan dan pendinginan. Dalam termoplastik, atom dan molekul bergabung *end-to-end* menjadi serangkaian panjang. Rantai karbon panjang ini independen dari yang lain. Struktur *backbone* dibangun dari atom karbon membuat termoplastik tahan terhadap degradasi atau pembelahan hidrolitik dari ikatan kimia. Akibatnya, termoplastik dianggap plastik non-biodegradable. Sedangkan termoset plastik disintesis dari kedua jenis reaksi umum. Plastik dipadatkan setelah meleleh dengan pemanasan. Proses perubahan dari keadaan cair ke padat adalah *irreversible* (Alauddin *et al.*, 2005). Berbagai jenis plastik dan penggunaannya dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Jenis Dan Kegunaan Plastik Sintetik.

Plastik	Kegunaan
Polyethylene (PE)	Kantong plastik, susu dan botol air, lapisan pembungkus makanan, mainan, irigasi dan pipa drainase, botol oli motor
Polystyrene (PS)	Cangkir sekali pakai, bahan kemasan, perlengkapan laboratorium, penggunaan elektronik tertentu

Polyurethane (PU)	Roda mobil, gasket, <i>bumper</i> , karet kulkas, spons, bantalan furnitur, dan jaket
Polyvinyl chloride (PVC)	Cover kursi mobil, tirai mandi, jas hujan, botol, visor, sol sepatu, selang taman, dan pipa listrik
Polypropylene (PP)	tutup botol, sedotan minuman, botol obat, kursi mobil, baterai mobil, bumper, jarum suntik sekali pakai, karpet
Polyethylene terephthalate (PET)	Digunakan untuk botol minuman ringan berkarbonasi, pembungkus daging olahan, wadah selai kacang, pengisi bantal dan serat tekstil
Nylon	Poliamida atau Nylon digunakan dalam bantalan kecil, gigi speedometer, wiper kaca depan, selang air nozel, sepatu kuda pacu, tinta, kain parasut dan jas hujan
Polycarbonate (PC)	Digunakan untuk membuat nozel pada pembuatan mesin kertas, penerangan jalan, visor keamanan, lampu belakang mobil, botol bayi dan peralatan rumah tangga. Hal ini juga digunakan dalam atap rumah kaca. Salah satu penggunaan penting adalah untuk membuat lensa
Polytetraflouoroethylene (PTFE)	PTFE digunakan dalam berbagai aplikasi industri pabrik kimia khusus seperti, elektronik dan bantalan. Juga digunakan sebagai lapisan pada peralatan dapur, seperti panci dan wajan

Sumber : Vona *et al.*, 1965

Mekanisme reaksi polimerisasi dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu mekanisme polimerisasi *step reaction* (kondensasi) dan *chain reaction* (adisi). Polietilen merupakan hasil polimerisasi dengan mekanisme adisi. Pada polimerisasi adisi tidak dihasilkan molekul kecil. Berbeda dengan mekanisme kondensasi dimana hasil reaksi juga dihasilkan reaksi samping dengan ukuran molekul yang kecil (Malcolm, 2001).

Polietilen merupakan polimer sintetis dengan unit perulangan $-\text{CH}_2\text{-CH}_2$ dalam tulang punggung polimer. Polimer ini tahan terhadap biodegradasi, dimana hasil dari ikatan kovalen C-C dan C-H sangat stabil dan memiliki berat molekul tinggi (Leja, 2010). PE dapat terdegradasi di lingkungan oleh aksi sinergis foto-degradasi , thermo-oksidatif dan aktivitas biologis (yaitu, mikroorganisme). Ketika PE terpapar thermo dan foto oksidasi, akan melepaskan berbagai produk seperti alkana, alkena, keton, aldehid, alkohol, karboksilat asam, asam keto, asam dikarboksilat, lakton, dan ester (Ghosh, 2012).

2.2. Biodegradasi Plastik

Degradasi secara umum terdiri atas 3 (tiga) jenis, yakni : (1) degradasi kimia, yaitu degradasi oleh zat kimia; (2) degradasi fisik yang meliputi degradasi termal, mekanik, radiasi dan fotoksidasi; (3) biodegradasi oleh mikroorganisme seperti jamur, bakteri dan actinomycetes (Stacy *et al.*, 1989). Biodegradasi adalah penyederhanaan sebagian atau penghancuran seluruh bagian struktur molekul senyawa oleh reaksi-reaksi fisiologis yang dikatalisis oleh mikroorganisme. Biodegradasi senyawa akan menghasilkan karbondioksida dan atau metan, air dan biomassa (Kaplan *di dalam* Ching *et al.*, 1993). CO₂ terlepas di dalam proses respirasi, dimana karbohidrat (gula) dioksidasi dan terbentuklah energi. CO₂ terlepas juga di dalam proses fermentasi dan di dalam proses penguraian lainnya yang dilakukan oleh mikroorganisme.

Menurut Andrade (2000), faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat biodegradabilitas senyawa polimer antara lain adalah panjang rantai molekul polimer, kompleksitas struktur polimer dan hidrofilitas polimer. Faktor lain yang mempengaruhi tingkat biodegradabilitas suatu polimer adalah faktor fisikokimia ekosistem, mikrobiologi ekosistem, sifat primer bahan dan proses pembuatan bahan (Lihat tabel 2.2).

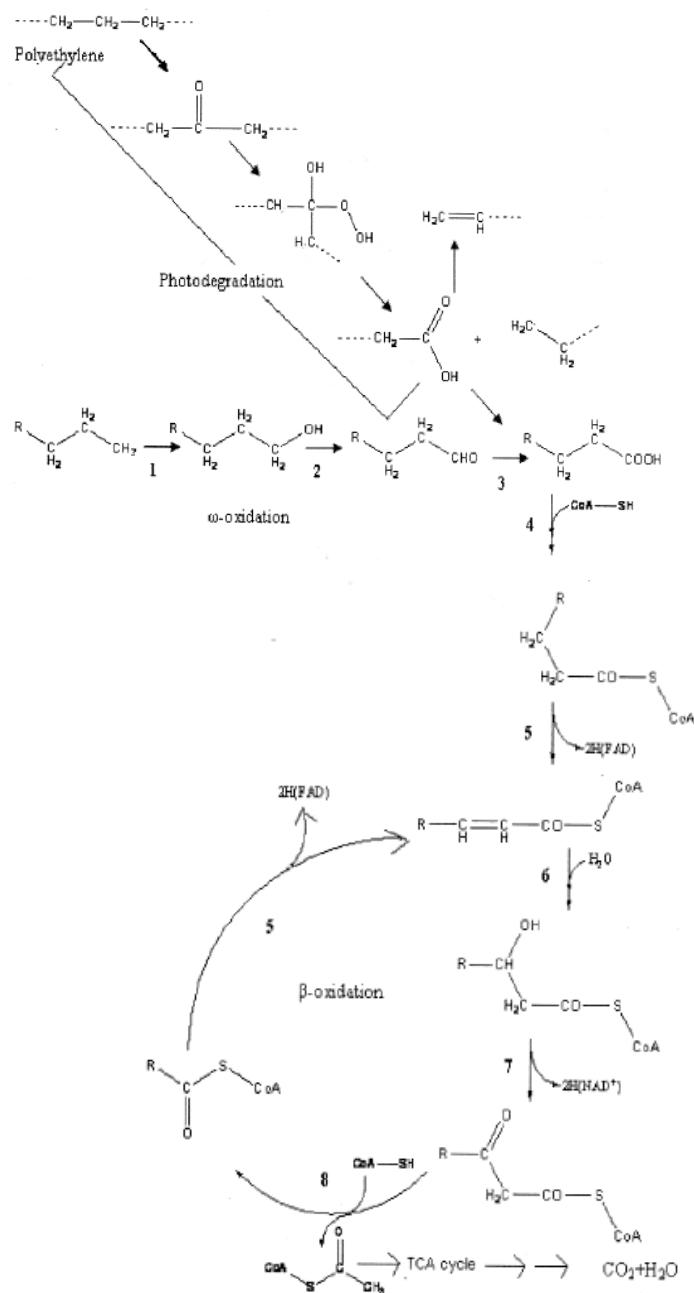
Tabel 2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi biodegradabilitas.

Parameter	Faktor
Fisiko – kimia ekosistem	Suhu, pH, kadar air, potensi redoks, ketersediaan nutrisi, keberadaan inhibitor.
Mikrobiologi ekosistem	Kepadatan populasi, diversitas mikroba, aktivitas mikroba, distribusi spatial mikroorganisme, kemampuan beradaptasi.
Sifat-sifat primer bahan	Komposisi polimer, berat molekul, distribusi berat molekul, suhu transisi gelas (Tg), porositas, hidrofobisitas dan jenis ikatan antar monomer.
Proses pembuatan bahan	Jenis pembuatan, karakteristik permukaan, ketebalan bahan dan zat aditif dan pengisi yang digunakan.

Sumber : Andrade, 2000

Biodegradasi polimer sintetis adalah solusi yang berharga untuk masalah lingkungan. Mekanisme mikroorganisme dalam melakukan biodegradasi meliputi beberapa tahap. Pada tahap pertama, mikroorganisme menempel pada permukaan polimer. Karena polietilen dan polipropilen hanya memiliki grup CH_2 (dimana permukaannya hidrofobik), maka dilakukan inisisasi degradasi fisik dan kimia untuk menjadikan permukaan lebih hidrofilik. Mikroorganisme mulai tumbuh dan memanfaatkan polimer sebagai sumber karbon. Saat degradasi awal, rantai utama membelah membentuk formasi dengan fragmen dengan BM rendah oligomer, dimer atau monomer. Degradasi berhubungan dengan enzim ekstraseluler yang disekresikan oleh organisme. Produk dari degradasi pada kondisi aerob meliputi CO_2 , H_2O , CH_4 , dan biomassa. Kondisi lingkungan menentukan kelompok mikroorganisme dan jalur degradasi. Penambahan zat additif, antioksidan dan stabilizer dapat bersifat toksik pada mikroorganisme dan menurunkan tingkat biodegradasi (Arutchelvi *et al*, 2008).

Pretreatmen seperti fotooksidasi pada polietilen diperlukan untuk memicu degradasi oksidatif. Radiasi UV menginisiasi formasi radikal, diikuti absorpsi oksigen dan menghasilkan grup karbonil. Paparan UV menyebabkan pembelahan ikatan C-C dan terbentuknya fragmen dengan berat molekul rendah sehingga meningkatkan hidrofilitas polimer (lihat gambar 2.1). Hasil asam karboksilat dan ω oksidasi dari rantai panjang hidrokarbon kemudian masuk ke jalur β oksidasi. Kemudian dua karbon asetil CoA masuk ke siklus TCA dan diubah menjadi karbondioksida dan air (Arutchelvi *et al*, 2008).



Gambar 2.1 Mekanisme biodegradasi polietilen (Vasile, 1993)

Degradasi polietilen selanjutnya adalah dengan pembentukan biofilm yang merupakan koloni kapang pada permukaan polietilen. Hal ini dijelaskan dalam penelitian Arthur, *et al.* (2008) dimana deteriorasi permukaan polimer adalah proses

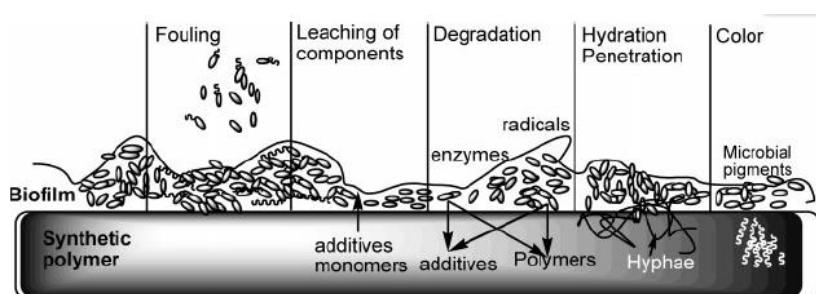
antarmuka dan dikendalikan oleh kondisi yang berlaku langsung di permukaan. Jika mikroorganisme terlibat dalam proses ini, pada awalnya mereka akan menempel dan kemudian berkoloni pada permukaan dalam bentuk biofilm. Flemming, 1990 telah menunjukkan lima cara utama dimana struktur dan fungsi bahan polimer sintetis dapat rusak oleh biofilm, yang mengarah ke konsekuensi sebagai tercantum di bawah (Gambar 2.2).

Tahapan degradasi polimer sebagai berikut:

- 1) Pelapisan permukaan polimer dengan lapisan biofilm;
- 2) Peningkatan pencucian aditif dan monomer dari matriks polimer selama degradasi mikroba;
- 3) Serangan oleh enzim atau radikal asal biologis yang menyebabkan hilangnya stabilitas mekanik;
- 4) Akumulasi dan penetrasi air dan filamen mikroba ke dalam matriks polimer, menyebabkan pembengkakan dan peningkatan konduktivitas, dan
- 5) Ekskresi pigmen mikroba lipofilik yang mengarah ke warna yang tidak diinginkan dalam polimer

(Arthatam, 2008)

Eksoenzim dari mikroorganisme akan memecah polimer kompleks yang menghasilkan molekul rantai pendek yang lebih kecil misalnya, oligomer, dimer, dan monomer, kemudian digunakan sebagai sumber karbon dan energi, proses ini disebut depolimerisasi. Apabila produk akhirnya adalah CO_2 , H_2O , atau CH_4 , degradasi disebut mineralisasi (Frazer, 1994; Hamilton *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 2008).

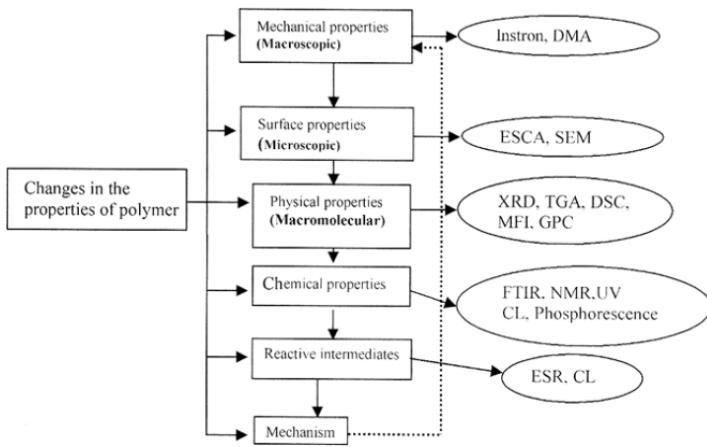


Gambar 2.2. Skema gambaran pembentukan biofilm di permukaan polimer (Arthatam, 2008).

Degradabilitas polimer dapat menentukan toksisitas senyawa tersebut bagi lingkungan. Senyawa yang tidak terdegradasi akan bertahan dalam lingkungan, sehingga menyebabkan efek beracun bagi biota dalam jangka waktu panjang. Senyawa yang dapat didegradasi dapat dihilangkan dalam saluran pembuangan unit pengolahan limbah ataupun dalam lingkungan tanpa mempengaruhi keseimbangan lingkungan. Tingkat degradasi sebuah senyawa tidak hanya bergantung dari daya tahan melokul senyawa tersebut, tetapi juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan sekitar, seperti pH, suhu, potensial redoks, ketersediaan nutrisi, kelimpahan mikroorganisme, dan konsentrasi substrat lain (Kristanto, 2002).

2.3 Analisa Biodegradasi Plastik

Beberapa teknik analisis telah digunakan dalam mengamati biodegradasi (gambar 2.3). Teknik karakterisasi secara mekanik, fisik dan kimiawi dilakukan saat sebelum dan sesudah degradasi untuk memahami mekanisme degradasi. Pengamatan secara mekanik terdiri atas pengukuran *tensile strength*, elongasi dan modulus polimer dengan menggunakan instron. Pengamatan secara fisika meliputi pengamatan morfologi (menggunakan mikroskop SEM, AFM dan TEM), hidrofobisitas, viskositas, distribusi berat molekul (menggunakan GPC) dan perubahan area kristallin dan amorforus (menggunakan difraksi X-ray, SAXS, WAXS). Pengamatan secara kimiawi dapat diukur berdasarkan gugus fungsional menggunakan FTIR. Pengukuran biofilm dapat menggunakan acridine orange, untuk aktivitas sel pada kultur di biofilm dapat menggunakan *ATP assay*, analisis protein dan analisis FDA .



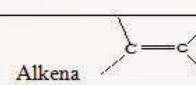
Gambar 2.3 Pengamatan biodegradasi polimer pada beberapa level informasi (tengah) dan teknik analisa (kanan) (Arutchelvi *et al.*, 2008).

2.3.1 Analisa FTIR

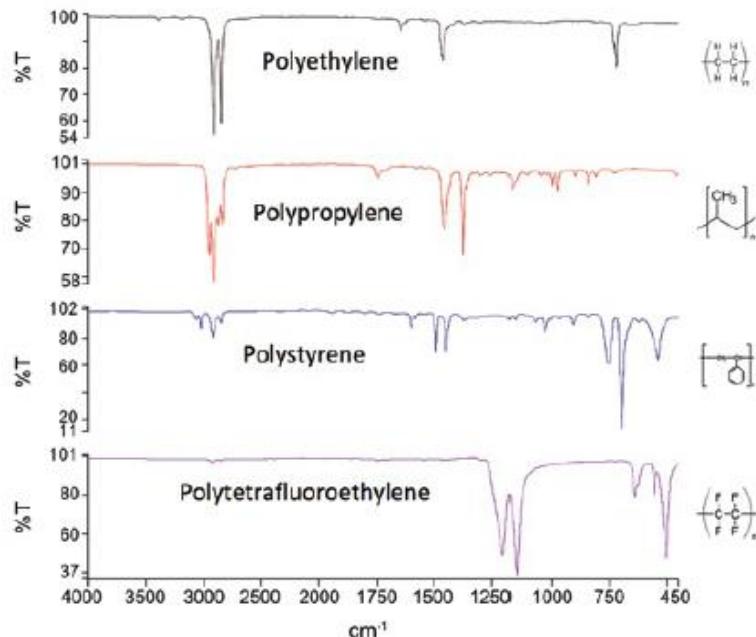
Fourier Transform InfraRed (FTIR) merupakan suatu metode spektroskopi inframerah (IR) dimana radiasi IR dilewatkan memalui sampel. Beberapa radiasi IR diserap (absorban) oleh sampel dan beberapa diantaranya dilewatkan (transmitan)(Ferraro and Basile, 1979) . FTIR dapat digunakan untuk analisis kualitatif perubahan struktur gugus fungsional dari bahan polimer. Panjang gelombang dari absorpsi oleh suatu tipe ikatan tertentu bergantung pada jenis getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu untuk tipe ikatan yang berbeda (seperti C-H, C-C, O-H) menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang berbeda yang khas (Tabel 2.3) (Sari, 2010).

Dengan teknik ini, komponen campuran polimer dapat diukur dan sampel dapat dianalisis. Spektra IR dari sejumlah polimer standar, seperti polytetrafluoroethylene (PTFE), polistiren (PS), polipropilena (PP), dan polietilen (PE), ditunjukkan pada Gambar 2.4. Analisis visual dari variasi yang jelas antara spektrum membuatnya mudah untuk membedakan bahan (PerkinElmer, 2015).

Tabel 2.3 Spektrum Gugus Fungsional IR

Ikatan	Tipe Senyawa	Daerah frekuensi (cm^{-1})	Intensitas
C - H	Alkana	2850 – 2970 1340 - 1470	Kuat Kuat
C - H	Alkena 	3010 – 3095 675 - 995	Sedang Kuat
C - H	Alkuna $\text{—C}\equiv\text{C—}$	3300	Kuat
C - H	Cincin Aromatik	3010 – 3100 690 - 900	Sedang Kuat
O - H	Fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hidrogen, fenol	3590 – 3650 3200 – 3600	Berubah-ubah Berubah-ubah, terkadang melebar
	monomer asam karboksilat, ikatan hidrogen asam karboksilat	3500 – 3650 2500 - 2700	Sedang Melebar
N - H	Amina, Amida	3300 – 3500	Sedang
C = C	Alkena	1610 – 1680	Berubah-ubah
C = C	Cincin Aromatik	1500 – 1600	Berubah-ubah
C = C	Alkuna	2100 – 2260	Berubah-ubah
C - N	Amina, Amida	1180 – 1360	Kuat
C ≡ N	Nitril	2210 – 2280	Kuat
C - O	Alkohol, Eter, Asam Karborsilat, Ester	1050 – 1300	Kuat
C = O	Aldehid, Keton, Asam Karboksilat, Ester	1690 – 1760	Kuat
NO ₂	Senyawa Nitro	1500 – 1570 1300 - 1370	Kuat Kuat

Sumber : Skoog *et al.*, 1998.



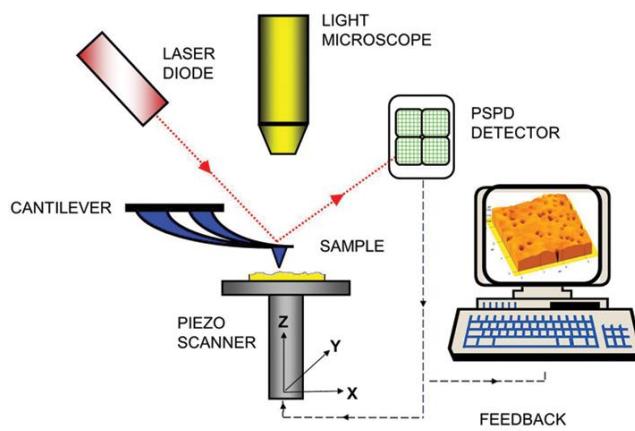
Gambar 2.4 Spektra Inframerah dari beberapa polimer yang umum (PerkinElmer, 2015).

2.3.2 Analisa Morfologi Plastik

Perubahan struktur morfologi plastik berupa lubang dan erosi dari hasil biodegradasi dapat diamati melalui *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Atomic Force Microscopy* (AFM) (Shah, 2008).

AFM mulai berkembang pada tahun 1980-an, menggunakan tip tajam pada kantilever yang men-scan sepanjang permukaan. Hal ini dapat dianggap sebagai semacam fonograf, yang mampu mendeteksi variasi terkecil pada permukaan material. Saat pemeriksaan probe AFM, laser yang ditujukan ke sisi nonkontak kantilever untuk mengukur jumlah interaksi antara ujung dan sampel (Gambar 2.5). Dengan konfigurasi ini, AFM mampu menentukan topografi permukaan material pada skala atom secara vertikal, dan skala nanometer secara horisontal (Smith, 2015).

Tip tajam dan kecil yang tertahan di ujung kantilever secara sistematis memindai permukaan untuk menghasilkan gambar topografi. Ujung tip diletakkan dalam kontak intim pada permukaan, dan puncaknya memiliki radius kelengkungan di kisaran nanometer, yang menentukan resolusi gambar. Karena ujungnya memindai secara sistematis di permukaan yang dapat menyebabkan kantilever dibelokkan. Lendutan kantilever dipantau dengan perpindahan sinar laser yang dipantulkan dan digunakan untuk membuat citra topografi. (Sean *et al.*, 2016).



Gambar 2.5. Prinsip Kerja Instrumen *Atomic Force Microscopy* (AFM) (Sean *et al.*, 2016).

Sedangkan SEM telah berkembang lebih awal yakni pada tahun 1960-an. SEM menggunakan sinar elektron yang terfokus, dan bukan sinar laser, untuk menghasilkan gambar. Sebuah senapan elektron di bagian atas mikroskop menghasilkan berkas elektron, yang bergerak turun melalui ruang hampa udara. Saat bergerak menuju sampel, berkas elektron difokuskan oleh serangkaian lensa dan medan elektromagnetik. Ketika sinar tersebut sampai pada sampel, ia melepaskan X-ray dan elektron, yang terdeteksi dan diubah menjadi gambar tiga dimensi (Smith 2015). SEM, terkadang sulit untuk menentukan kemir

Saat memindai film tipis, seperti polirite, SEM dan AFM bisa menghasilkan hasil yang sangat mirip. Namun, dengan gambar yang dihasilkan igan permukaan. Sebaliknya, AFM memberikan informasi tinggi, sehingga mudah untuk menentukan apakah fitur permukaan pada film tipis naik atau turun. Bila digunakan berdampingan, di sisi lain, SEM dan AFM bisa saling melengkapi dengan baik dan memberikan banyak informasi tentang sebuah (Sean *et al.*, 2016)

2.4 Kapang sebagai Agen Pendegradasi Polimer

Kapang adalah dekomposer utama di alam yang mampu membentuk koloni pada berbagai kondisi lingkungan. Kemampuannya membentuk koloni menyebabkan kapang dapat melanjutkan fungsi mereka pada berbagai substrat, mampu mengatur aliran nutrisi dan energi melalui jaringan miseliumnya. Kemampuan bertahan lama pada kondisi tercekam dan sifatnya yang saprotropik menyebabkan kapang mampu menghasilkan beberapa enzim yang mampu mendegradasi senyawa rekalsitran (Atiq, 2011). Hal inilah yang menyebabkan jamur menjadi kandidat agen bioremediasi yang potensial dibandingkan bakteri.

Mikroorganisme kapang menghasilkan dua kelompok enzim, ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler cenderung mendepolimerisasi rantai panjang polimer untuk menyerapnya melalui membran sel dan mengasimilasi produk degradasi lebih lanjut di dalam sel oleh enzim intraseluler. Oleh karena itu berat molekul, kristalinitas

dan bentuk fisik adalah hal yang paling penting bagi polimer untuk menentukan degradabilitasnya (Motta *et al.*, 2009).

Tabel 2.4 Daftar Jamur Pendegradasi Polimer

Strain Jamur	Jenis Polimer	Kelompok	Referensi
<i>Fusarium moniliforme</i>	PCL, cutin	Deuteromycota	Murphy <i>et al.</i> (1996)
<i>Fusarium oxysporum</i> F1-3	Poly[3HB-co-(12 mol%) 3HV]	Deuteromycota	Sang <i>et al.</i> (2002)
<i>Fusarium solani</i> LAR 11	PHB	Deuteromycota	Kim <i>et al.</i> (2000)
<i>Fusarium solani</i> strain 77-2-3	PCL, cutin	Deuteromycota	Murphy <i>et al.</i> (1996)
<i>Fusarium solani</i> ATCC 38136	PCL, cutin	Deuteromycota	Murphy <i>et al.</i> (1996)
<i>Mucor</i> sp.	PHB	Zygomycota	Matavulj <i>and</i> Molitoris (1992)
<i>Paecilomyces farinosus</i> F4-7	Poly[3HB-co-(12 mol%) 3HV]	Deuteromycota	Sang <i>et al.</i> (2002)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> IFO 31910	PHB, PCL, PBS	Ascomycota	Sanchez <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium simplicissimum</i> YK	PE	Ascomycota	Yamada <i>et al.</i> (2001)
<i>Mortierella</i> sp. LM 1021	PHB dan kantong plastik	Zygomycota	Nathania dan Kuswytasari (2013)
<i>Fusarium</i> sp. LM 1018	PHB dan kantong plastik	Deuteromycota	Nathania dan Kuswytasari (2013)
<i>Gliomastix</i> sp.2 LM 1020	PHB dan kantong plastik	Ascomycota	Nathania dan Kuswytasari (2013)
<i>Paecilomyces</i> sp.4 LM 1034	PHB	Ascomycota	Nathania dan Kuswytasari (2013)
<i>Chaetomium</i> sp. LM 1010	PHB	Ascomycota	Nathania dan Kuswytasari (2013)

Sumber : Ghosh *et al.*, 2012; Nathania dan Kuswytasari, 2013.

Kapang merupakan mikroorganisme heterotrof karena tidak memiliki kemampuan untuk mengoksidasi senyawa karbon anorganik. Pada umumnya, kapang mengekskresikan enzim ekstraselular ke lingkungan untuk mengurai komponen-komponen kompleks pada substrat menjadi komponen-komponen sederhana yang

dapat dengan mudah diserap kapang untuk mensintesis berbagai bagian sel dan sebagai sumber energinya.

2.5 Karakterisasi Molekuler Kapang

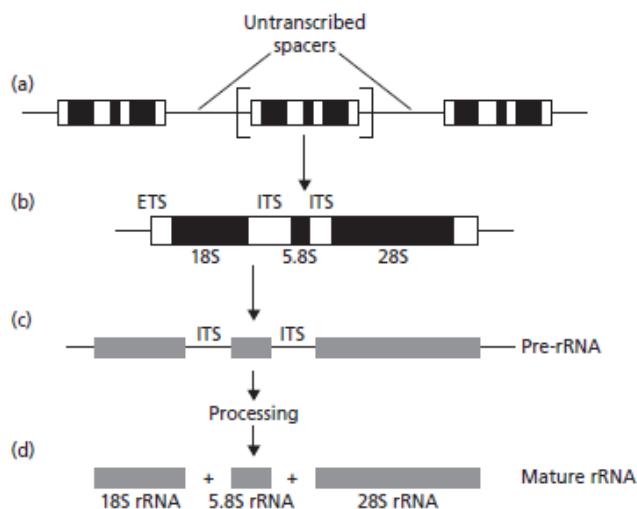
Identifikasi jamur dapat dilakukan secara morfologi maupun molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan dengan memisahkan koloni yang berbeda pada media baru, seperti berbeda pada warna koloni, tekstur dan rata-rata waktu tumbuh koloni (Frohlich *et al.*, 2000). Akan tetapi susunan dari taksonomi morfospesies tidak dapat menggambarkan filogeni hingga tingkat spesies dan oleh karena itu diperlukan pendekatan identifikasi alternatif.

Salah satu alternatif identifikasi dapat dipelajari dalam biologi molekuler yang merupakan cabang ilmu pengetahuan yang mempelajari hubungan antara struktur dan fungsi molekul-molekul hayati serta kontribusi hubungan tersebut terhadap pelaksanaan dan pengendalian berbagai proses biokimia. Dengan penemuan mengenai struktur DNA, dikembangkanlah teknik identifikasi secara molekuler yang dilakukan untuk mengatasi masalah taksonomi jamur (Takamatsu, 1998) dan beberapa penelitian juga menggunakan teknik ini untuk identifikasi jamur. Perbandingan sekuen pada gen penyandi ribosomal DNA dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme karena gen ini memiliki sekuen yang terkonservasi maupun variabel (Kurtzman and Blanz, 1998).

2.5.1 Molekuler Genetik Kapang

Ribosomal DNA adalah suatu daerah dalam nuklear DNA yang mengkode ribosom. Ribosom merupakan organel sel yang berperan dalam sintesis protein dan terdiri dari subunit kecil (18S) dan subunit besar (28S). Urutan nukleotida rDNA berisi dua daerah non-coding (ITS1 dan ITS2) dan gen 5,8S rDNA. Urutan nukleotida pada gen 5,8S rDNA sangat *conserved*, tetapi dua daerah ITS lainnya tidak ditranslasi menjadi protein dan sangat bervariasi (Lafontaine and Tollervey, 2001).

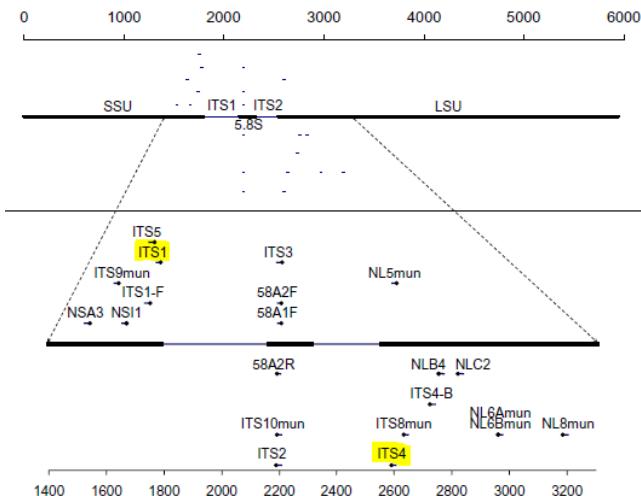
Struktur organisasi dan proses gen eukariotik rRNA dapat dilihat pada gambar 2.4. Ribosom RNA (rRNA) dibutuhkan dalam jumlah besar seperti untuk menghasilkan ribosom sel dengan beberapa salinan gen rRNA, sering diatur dalam tandem tapi dipisahkan satu sama lain oleh spacer untranscribed (Gambar. 2.4a). Setiap gen rRNA tunggal (Gambar. 2.4b) telah mengkoding informasi untuk tiga jenis rRNA ditemukan di ribosom eukariotik (18S, 5.8S dan 28S), tetapi juga berisi informasi berharga lainnya, terutama di internal transcription spacer (ITS) dan eksternal transcription spacer (ETS). Gen rRNA awalnya menghasilkan prerRNA (Gambar. 2.4c), yang kemudian mengalami pengolahan, termasuk eksisi daerah spacer, untuk menghasilkan tiga rRNA "dewasa" (Gambar. 2.4d). 18S rRNA telah cukup berubah dari waktu ke waktu untuk digunakan sebagai semacam "jam molekuler." Tapi daerah ITS bahkan lebih bervariasi dan terdiri dari daerah yang evolusioner, sehingga daerah ITS sering dapat digunakan untuk membedakan spesies yang berbeda (Deacon, 2006).



Gambar 2.6 Organisasi dan proses gen eukariotik rRNA (Deacon, 2006)

Karakterisasi molekuler berdasarkan area ITS rDNA dapat menggunakan beberapa jenis primer (lihat gambar 2.5). Setiap primer memiliki spesifitas daerah amplifikasi masing-masing. Primer universal yang digunakan dalam identifikasi molekuler kapang yakni ITS1 dan ITS4, dikarenakan kedua primer sangat bervariasi

pada sekuen ITS1 dan ITS2 dan sekitar sekuen 5.8S. Primer ini dapat mengamplifikasi dengan area yang luas dari organisme seperti jamur, tanaman dan hewan (Martin and Rygiewicz, 2005).



Gambar 2.7 Diagram Lokasi primer pada ribosomal yang terdiri dari SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, and LSU rDNA. (Martin and Rygiewicz, 2005).

2.5.2 Analisa Data Bioinformatika

Analisa similaritas sekuen merupakan komponen penting dari karakterisasi molekuler. Hal ini memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi homolog, struktur yang dilestarikan dan membantu menetapkan fungsi dari gen *unannotated* di genom de novo. Selama 15 tahun terakhir ini telah terjadi peningkatan eksponensial dalam jumlah data genetik yang tersedia dalam database umum (GenBank) seperti *The National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Terdapat 2 GenBank lain yang juga menyediakan database skala dunia yakni *The DNA Database of Japan* (DDBJ) dan EMBL Data Library di Eropa. Kelimpahan data genetik sangat penting dalam teknik pencarian similaritas. Metode yang paling umum digunakan untuk mengetahui homologi sekuen adalah dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). BLAST sangat sensitif dan efisien pada lokasi daerah similaritas sekuen baik pada sekuen nukleotida atau protein. FASTA juga merupakan program yang digunakan untuk *alignment* cepat dari sekuen protein atau DNA.

FASTA menjadi algoritma pertama yang banyak digunakan untuk pencarian similaritas database (Kavanagh, 2005).

Data bioinformatika dapat digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Tujuan dari filogenetik adalah untuk susunan suatu set populasi, spesies, individu atau gen ke dalam susunan logis yang menyimpulkan hubungan evolusi di antara mereka. Hubungan evolusi menyimpulkan sejarah perkembangan spesies dan biasanya disajikan sebagai pohon evolusi. Data sekuen jamur (RNA, DNA dan protein) dapat digunakan untuk menyimpulkan hubungan evolusi di antara spesies. Dalam banyak kasus, sekuen yang telah *dialignment* diproses sebagai jarak matriks. Spesies yang paling erat terkait akan memiliki jarak kecil, sementara spesies jauh terkait akan memiliki ukuran jarak yang lebih besar. Algoritma filogenetik yang dapat digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik diantaranya seperti UPGMA dan CLUSTAL W (Kavanagh, 2005).

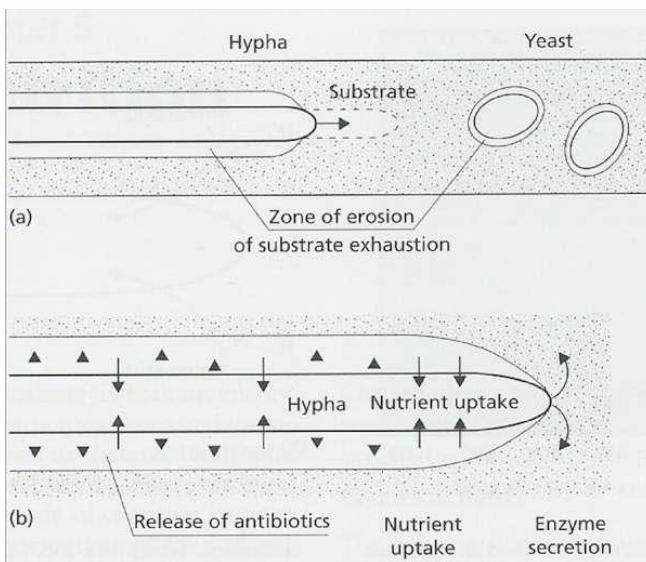
2.6 Enzim Pendegradasi Plastik

Enzim berfungsi sebagai katalis untuk reaksi tertentu atau serangkaian reaksi, seperti oksidasi, reduksi, hidrolisis, esterifikasi, sintesis dan konversi- molekul. Polimer hidrofobik tanpa ikatan menghidrolisis seperti PE, PP, PMMA dan PS diharapkan untuk menjadi yang paling stabil (Singh *et al.*, 2008). Wol *et al.* (2000) telah mempelajari degradasi 'difusi enzim komposit pati PE, yang menghasilkan difusi kembali molekul kecil ke permukaan untuk asimilasi lebih lanjut oleh mikroorganisme. Degradasi enzimatik dari polimer alam tertentu mengikuti mekanisme degradasi rantai akhir, seperti β -amilase mendegradasi pati untuk maltosa, dimulai dengan rantai ujung (Gowariker *et al.*, 2000).

Enzim yang terlibat dalam biodegradasi plastik adalah oksidatif enzim yang meliputi peroxidase, monoooksigenase, mangan peroksidase dan dehidrogenase yang bekerja mengoksidasi grup etilenik . Enzim ekstraseluler dan intraseluler akan merubah polimer menjadi monomer, dimer atau oligomer yang akan masuk ke dalam sel sebagai sumber energi sel. Strategi sel dalam pertumbuhan dan pertahanan hifa

dapat dilihat pada gambar 2.5. Mikroorganisme dapat menggunakan berbagai macam sumber karbon dalam katabolismenya. Perbedaan sumber karbon menyebabkan perbedaan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Ada kelompok enzim yang selalu disintesis dan ada yang perlu diaktivasi sintesisnya. Enzim pendegradasi lignin manganese peroxidase dari *Phanerochaete chrysosporium* dilaporkan berperan dalam mendegradasi polyethylene dengan berat molekul tinggi (Shimao, 2001; Liyoshi *et.al.*, 1998).

Mekanisme biodegradasi polimer termasuk perubahan dengan penambahan suatu gugus karbonil ($C=O$) dalam tulang punggung polimer. Molekul polimer yang diubah mengalami oksidasi. Dalam proses biodegradasi, molekul seperti PE yang mengandung gugus karbonil pertama kali akan diubah menjadi alkohol oleh enzim monooxygenase. Selanjutnya alkohol akan dioksidasi menjadi aldehida oleh enzim dehidrogenase, dan enzim aldehida dehidrogenase akan mengkonversi aldehida ke asam lemak. Asam lemak mengalami β oksidasi di dalam sel-sel (Leja, 2010).



Gambar 2.8 Strategi pertumbuhan fungi pada polimer (a) perpanjangan hifa pada sisi apex (b) pertahanan hifa dengan degradasi polimer, enzim di sekresi pada apex dan nutrien terlarut di lepaskan di absorpsi pada sub apikal (Shimao, 2001)

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”.

BAB 3

METODA PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Maret – Desember 2017 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi departemen Biologi FIA ITS Surabaya dan *System Biology Engineering Laboratory, Chemical and Biological Engineering Department of Korea University, Seoul.*

3.2. Metode yang Digunakan

3.2.1. Isolasi dan Purifikasi Kapang Pendegradasi Plastik

Kapang diisolasi dari permukaan plastik yang telah dipendam dalam tanah mangrove. Proses isolasi dilakukan secara aseptis dengan mengambil plastik menggunakan pinset steril. Plastik dimasukkan ke dalam 10 ml aquadest steril dan dihomogenkan dengan cara divortex selama 1 menit, larutan disebut pengenceran ke-0. Larutan dari pengenceran ke-0 diambil sebanyak 1 ml dan dilarutkan ke dalam 9 ml akuades steril, yang kemudian suspensi ini disebut sebagai pengenceran 10^{-1} . Larutan dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dilarutkan ke dalam 9 ml akuades steril, suspensi ini disebut sebagai pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga diperoleh pengenceran 10^{-4} . Suspensi dari masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml dan diinokulasikan ke bagian tengah cawan Petri berisi \pm 15 ml medium PDA steril yang sudah memadat, dengan metode sebar (*spread plate*). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 3-7 hari (Ilyas, 2007).

Koloni kapang yang tumbuh dimurnikan dengan propagasi koloni, yaitu memotong dan memindahkan secara aseptik sebagian miselium kapang ke dalam medium biakan padat baru (Alexopoulos *et al.*, 1996) dan diinkubasi pada suhu ruang hingga tumbuh koloni. Pemindahan koloni dilakukan secara bertingkat sebanyak 3

kali hingga diperoleh isolat murni. Koloni murni diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi medium PDA miring.

3.2.2. Karakterisasi Isolat secara Fenotipik

Identifikasi kapang dilakukan berdasarkan morfologi makroskopik dan mikroskopik.

Pengamatan makroskopik : menurut Gandjar dkk., (1999), pengamatan karakteristik koloni isolat jamur meliputi a) warna koloni dan warna sebalik koloni (*reverse side*), b) permukaan koloni: berupa granular, seperti tepung, menggunung, licin. c) Ada atau tidaknya tetes-tetes eksudat, d) Ada atau tidaknya garis-garis radial (*radial furrow*) dari pusat koloni ke arah tepi, e) ada atau tidaknya lingkaran-lingkaran konsentris.

Pengamatan mikroskopik : Pertumbuhan koloni diamati dari awal inokulasi hingga saat akan dibuat preparat mikroskop. Morfologi mikroskopik dilihat di bawah mikroskop tidak dan dengan pewarnaan *laktofenol blue*. Pengamatan mikroskopik meliputi bentuk hifa atau miselium, bentuk spora, dan ada atau tidaknya sekat pada hifa.

Data identifikasi fenotipik selanjutnya dibandingkan dengan buku-buku kunci identifikasi seperti kunci identifikasi Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar dkk., 1999), *Illustrated Genera of Imperfecti Fungi* (Barnett, 1969) dan *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (Watanabe, 2002), dan *Fungi and Food Spoilage* (Pitt and Hocking, 2009).

3.2.3. Karakterisasi Isolat secara Genotipik

3.2.3.1 Ekstraksi Genom DNA

Genomik DNA diekstraksi dari koloni miselium kapang Kit Promega. Miselium kapang (usia kultur 7 hari) diambil dari permukaan PDA dengan tusuk gigi steril sebanyak 0,1 - 1 mg dan ditempatkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml. Miselium disuspensi dengan 300 μ l larutan *nuclei lysis* dan 300 μ l *glass bead*. Campuran tersebut divortex pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, kemudian

ditambahkan dengan 100 μ l larutan pengendap protein. Campuran dihomogenkan dengan cara membalik tabung sebanyak ±10 kali, kemudian diinkubasi pada es selama 5 menit. Campuran disentrifus pada kecepatan 13500 g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus yang baru dengan cara dipipet perlahan kemudian ditambahkan dengan isopropanol dengan perbandingan 1 : 1, kemudian mikrosentrifus dibolak-balik hingga terlihat untaian massa DNA. Tabung tersebut disentrifus kembali pada kecepatan 13500 g selama 2 menit untuk mengendapkan DNA. Supernatan dibuang menggunakan pipet secara perlahan sedangkan pelet ditambahkan dengan etanol 70% kemudian tabung diaduk dengan cara dibalik secara perlahan dan disentrifus kembali selama 1 menit. Etanol dibuang dan dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 65 °C selama 10 menit. Pelet ditambahkan dengan 100 μ l larutan *DNA rehydration* dan 1 μ l RNase kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan Nano drop pada 260/280 nm. DNA yang tidak digunakan disimpan pada suhu -20°C.

3.2.3.2 Amplifikasi dan Purifikasi ITS rDNA

Isolat diidentifikasi dengan metode Webb *et al.*, (2000) berdasarkan area *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari DNA (rDNA). Amplifikasi menggunakan primer universal ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3') dan ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White and Lee, 1990). Volume total campuran reaksi sebanyak 50 μ l terdiri dari 10 μ l penyanga reaksi amplifikasi 10x, 1.5 μ l dNTP (dTTP, dCTP, dATP dan dGTP), masing-masing 2.5 μ l primer (konsentrasi 100 pmol) *forward* dan *reverse*, 1 μ l genom DNA, 0.5 μ l enzim polimerase Q5 dan ditambahkan H₂O hingga mencapai volume akhir.

PCR terdiri dari denaturasi inisiasi pada suhu 98°C selama 30 detik, dilanjutkan selama 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 98°C selama 15 detik, penempelan pada suhu 63°C selama 30 detik dan perpanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dengan perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 2 menit. Temperatur penempelan pada siklus tersebut ditentukan dengan menggunakan

program online tmcalculator.neb.com. Variasi amplikon PCR antara 500 hingga 575 bp tergantung pada jenis spesies. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan gel elektroforesis 0,8%.

Pembuatan gel elektroforesis 0,8 % dilakukan dengan menimbang 0,8 gram agarosa dan dilarutkan dalam 98 mL aquades dan ditambahkan dengan 2 ml larutan penyanga *Triethanolamine* (TEA) 50x. Campuran selanjutnya dipanaskan dalam microwave hingga larutan homogen (bening). Selanjutnya, larutan agarosa dituangkan kedalam alat pencetak gel agarosa kemudian sisir pencetak sumur diletakkan ke dalam gel agarosa. Larutan didiamkan hingga membeku. Setelah membeku, gel agarosa siap digunakan. Gel yang tidak digunakan disimpan dalam larutan penyanga TEA 10x.

Proses elektroforesis dilakukan dengan meletakkan gel elektroforesis ke dalam tray, kemudian masing-masing sampel dan *ladder* dimasukkan sebanyak 5 μ l ke dalam sumur gel. Sampel yang dimasukkan adalah 5 μ l produk PCR yang ditambahkan satu tetes *loading dye*. Selanjutnya proses elektroforesis dijalankan dengan tegangan 135 Volt selama 15 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel agarosa direndam dalam etidium bromida (EtBr) selama 15 menit. Lalu gel agarosa diamati menggunakan lampu UV transiluminator. Pendaran yang benar akan menunjukkan produk amplifikasi dengan ukuran \pm 500 bp.

3.2.3.3 Purifikasi Produk Amplifikasi

Purifikasi produk amplifikasi dilakukan menggunakan metode dari NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up. Produk amplifikasi yang telah dikonfirmasi menggunakan elektroforesis selanjutnya ditambahkan dengan larutan penyanga NT1 sebanyak 2x volume produk. Campuran tersebut dipindahkan ke tabung filter yang telah dilengkapi tabung pengumpul kemudian disentrifus pada kecepatan 13500 g selama 30 detik. Filtrat dibuang sedangkan residu ditambahkan dengan penyanga NT3 sebanyak 700 μ l kemudian disentrifus pada kecepatan 13500 g selama 30 detik. Tahapan ini diulangi hingga dua kali untuk mendapatkan DNA yang bersih. Filtrat

dibuang kembali kemudian disentrifus pada 13500 g selama 1 menit untuk menghilangkan sisa penyangga. Filtrat beserta tabung pengumpul dibuang sedangkan tabung filter dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 1.5 ml yang baru. Residu ditambahkan dengan larutan penyangga NE *elution* sebanyak 30 µl dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifus kembali pada 13500 g selama 1 menit. DNA murni selanjutnya akan disekuen menggunakan primer yang sama dengan primer amplifikasi. Sekuensi dilakukan oleh perusahaan Cosmo Genetech Co., Ltd, Korea Selatan.

3.2.3.4 Pembacaan Sekuen dan Analisa Bioinformatika

Sekuen DNA dari primer *forward* dan *reverse* dikompilasi menggunakan program Bioedit. Hasil sekuen selanjutnya diidentifikasi sampai tingkat taksa spesies menggunakan metode bioinformatika *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) secara online di alamat website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Selanjutnya sekuen dilakukan *multiple alignment* menggunakan program Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) dengan metode CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) dan dikonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-joining tree* (Saitou dan Nei, 1987) dengan nilai *bootstrap* sebanyak 500 .

3.2.4. Uji Biodegradasi

3.2.7.1 Preparasi Sampel Plastik

Plastik uji yang digunakan adalah kantong plastik (tas kresek) transparan, hitam dan putih yang beredar di pasaran. Plastik uji dipotong dengan ukuran 2 x 2 cm. Masing-masing plastik ditimbang dengan menggunakan neraca analitik sebagai berat awal sebelum dilakukan uji degradasi. Selanjutnya potongan plastik disterilisasi dengan cara merendamnya dalam etil alkohol 70% selama 30 menit, dibilas dengan aquades steril selama 20 menit. Kemudian plastik uji disinari dengan UV pada LAF selama 30 menit (Pramila, 2011).

3.2.7.2 Preparasi Medium

Medium mineral salt (MS) dibuat berdasarkan Chrisnayanti, E. *et al.* (2000), yaitu dengan komposisi dalam satu liter aquades yang terdiri dari 100 mg ekstrak yeast, 1 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg NaCl, 20 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg MnSO₄, 1,6 gr K₂HPO₄, dan 200 mg KH₂PO₄. Derajat keasaman (pH) dari media adalah 7. Medium sebanyak 90 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, 1,5 atm selama 15 menit dan didinginkan.

3.2.7.3 Uji Biodegradasi

Uji biodegradasi dilakukan dengan metode pengocokan pada suhu ruang. Potongan plastik dimasukkan ke Erlenmeyer berisi medium, kemudian di inkubasi selama 24 jam dan dipastikan medium tidak terkontaminasi. Selanjutnya medium MS + plastik diinokulasi dengan suspensi spora jamur sebanyak 10%. Suspensi spora didapatkan dari spora yang telah ditumbuhkan pada medium PDB selama 7 hari. Selanjutnya diinkubasi selama 35 hari menggunakan *aerator* pada suhu ruang. Setelah masa inkubasi selesai, plastik dikumpulkan dan dicuci menggunakan air steril, kemudian dioven pada suhu 80°C selama 24 jam.

3.2.5. Evaluasi Hasil Degradasi Plastik

3.2.5.1. Pengukuran Prosensi Efisiensi Degradasi dan Biomassa

Plastik dikeluarkan dari tanah atau media, disikat lembut, dicuci dengan aquadest beberapa kali untuk membersihkan partikel tanah dan miselia kapang (Kleeberg *et al.*, 1998). Plastik dan miselia kapang dioven terpisah pada suhu 80°C selama 24. Hasil pengovenan ditimbang berat keringnya menggunakan neraca analitik. Nilai % Efisiensi Defradasi (ED) dapat dihitung dengan persamaan (Hosseini *et al.*, 2010). Berikut merupakan rumus untuk menghitung % Efisiensi Defradasi (ED):

$$\%ED = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

% ED = prosentase efisiensi degradasi

W_0 = Berat kering plastik sebelum degradasi

W_1 = Berat kering plastik setelah degradasi

3.2.5.2. Pengukuran FTIR

Produk degradasi dalam sampel uji dianalisa perubahan kimiawinya menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Pengamatan dilakukan di departemen teknik material dan metallurgi FTI ITS menggunakan FTIR spektrofotometer (Thermoscientific Nicolet Is50). Spektra diambil sebagai rata-rata 16 scan dengan resolusi 2 cm^{-1} dengan wavenumber $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$.

3.2.5.3. Pengamatan SEM

Kerusakan morfologi dari hasil uji degradasi polimer diamati dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (Carl Zeiss (Evo Ma 10), Inggris) dengan perbesaran hingga 10.000 X. Pengujian dilakukan di Laboratorium Energi LPPM ITS Surabaya.

3.2.5.4. Pengamatan AFM

Kerusakan plastik juga diamati berdasarkan topologinya yang didapatkan dari hasil uji degradasi polimer dengan menggunakan *Atomic Force Microscopy* (AFM) (BRUKER tipe N8 NEOS, Jerman). Pengujian dilakukan di Laboratorium Energi LPPM ITS Surabaya.

3.2.6. Deteksi Enzim Pendegradasi Plastik

3.2.6.1. Uji Kualitatif Enzim Lakase dan Mangan peroksidase

Deteksi lakase dilakukan pada medium PDA yang mengandung 0.02% Guaiacol. Sedangkan deteksi manganese peroksidase dilakukan dengan menggunakan medium uji lakase yang ditambahkan hidrogen peroksidase (H_2O_2). Selanjutnya diinkubasi pada suhu

ruang selama 7 hari. Pembentukan halo coklat kemerahan di medium menunjukkan hasil yang positif (Vantamuri *and* Kaliwal, 2015).

3.2.6.2. Uji Kualitatif Enzim Alkana hidroksilase

Uji kualitatif enzim alkane hidroksilase dilakukan pada medium agar basal yang di lapisi dengan n-hexadecane. Medium basal terdiri dari K_2HPO_4 3.815 g, KH_2PO_4 0.5 g, $(NH_4)2HPO_4$ 0.825 g, KNO_3 1.2625 g, Na_2SO_4 0.2 g, $CaCl_2$ 0.02 g, $FeCl_3$ 0.002 g, $MgCl_2$ 0.02 g dan agar 15g/L). Selanjutnya kapang diinokulasi ke medium basal + n-hexadecane, dan diamati pertumbuhan koloninya (Liu *et al*, 2014). Kontrol positif yang digunakan adalah isolat yang ditumbuhkan pada medium PDA.

3.2.6.3. Uji Kualitatif Enzim Lipase

Uji kualitatif enzim lipase dilakukan berdasarkan metode Gupta and Shrivastava, (2011) dengan menggunakan Tween 80 sebagai substrat. Medium terdiri dari pepton 10 g/L, 0,5 g NaCl, $CaCl_2 \cdot 5H_2O$ 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 7 g/L, KH_2PO_4 7 g/L, agar 20g/L dan tween 80 ml/L . Selanjutnya kapang diinokulasi pada medium dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya daerah presipitasi melingkar yang jelas di sekitar koloni.

3.3 Analisa Data

Data uji biodegradasi selanjutnya diuji dengan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh isolat dalam mendegradasi polimer plastik sintetik, dengan hipotesa:

H_0 : tidak ada pengaruh isolat kapang tanah dalam mendegradasi plastik.

H_1 : minimal ada satu pengaruh isolat kapang tanah dalam mendegradasi plastik .

Jika tolak H_0 , maka dilanjutkan dengan uji Dunnet pada taraf kepercayaan 95%.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan analisis deskriptif secara kualitatif untuk uji degradasi plastik, yakni menggambarkan karakter dari masing-masing koloni kapang, menggambarkan hasil pohon filogenetik dan menggambarkan hasil uji FT-IR, SEM dan AFM. Selain itu juga analisis deskriptif secara kuantitatif yakni % efisiensi degradasi dan biomassa selama masa biodegradasi.

“Halaman Ini Sengaja Dokosongkan”.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Kapang dari Tanah Mangrove Wonorejo

Kawasan mangrove Wonorejo yang terletak pada kawasan pantai timur Surabaya, dipilih sebagai lokasi isolasi kapang tanah pendegradasi plastik. Wardhana (2004) mengemukakan bahwa kondisi pesisir sebagai tempat muara sungai dari daratan menyebabkan kawasan mangrove dapat tercemar oleh sampah terutama plastik. Keberadaan sampah plastik di kawasan mangrove menjadi dasar pemilihan lokasi isolasi kapang, sehingga memungkinkan ditemukannya mikroorganisme yang dapat mendegradasi plastik.

Isolasi dilakukan pada tanah mangrove Wonorejo dengan dan tanpa plastik. Tanah mangrove Wonorejo dengan plastik yang maksud adalah tanah yang ditambahkan pendaman potongan plastik dan diinkubasi selama 1 tahun. Hal ini bertujuan untuk memicu kapang indigenous dalam memanfaatkan plastik sebagai sumber karbon. Isolasi kapang tanah mangrove Wonorejo tanpa plastik telah dilaporkan oleh Kuswytasari *et al.*, (2011) dan didapatkan sebanyak 37 isolat murni. Dalam penelitian ini dipilih tiga isolat potensial dari hasil isolasi yakni LM1018, LM1020 dan LM1021. Ketiga isolat tersebut telah dilaporkan mampu mendegradasi plastik *Poly Hydroxy Butyrate* (PHB) (Nathania dan Kuswytasari, 2013) dan plastik *oxo-biodegradable* (Jamila, 2014). Sedangkan hasil isolasi dari tanah dengan plastik didapatkan 5 isolat murni dominan yakni PF1, PF2, PF3, S2, dan S3.

Identifikasi kapang secara konvensional umumnya dilakukan secara fenotipik yakni berdasarkan karakteristik morfologinya (Burdsall, 1990). Morfologi kapang baik makroskopis maupun mikroskopis ditunjukkan pada Gambar 4.1. Identifikasi juga dapat dilakukan secara genotipik dengan karakterisasi molekulernya (Iwen *et al.*, 2002). Target molekuler yang digunakan adalah area yang lestari dan variatif seperti DNA ribosom dapat digunakan untuk identifikasi hingga tingkat spesies (Schwarz *et al.*, 2006).

4.1.1. Morfologi isolat kapang tanah mangrove Wonorejo

Koloni isolat kapang tanah mangrove Wonorejo menunjukkan keragaman yaitu warna koloni putih, coklat, hijau dan kuning. Miselia dari berbagai macam kapang ini selanjutnya diamati secara makroskopis dan mikroskopis pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Selanjutnya morfologi ini dicocokkan dengan buku identifikasi kapang (Gandjar dkk., 1999; Barnett, 1969; Watanabe, 2002; Pitt and Hocking, 2009).

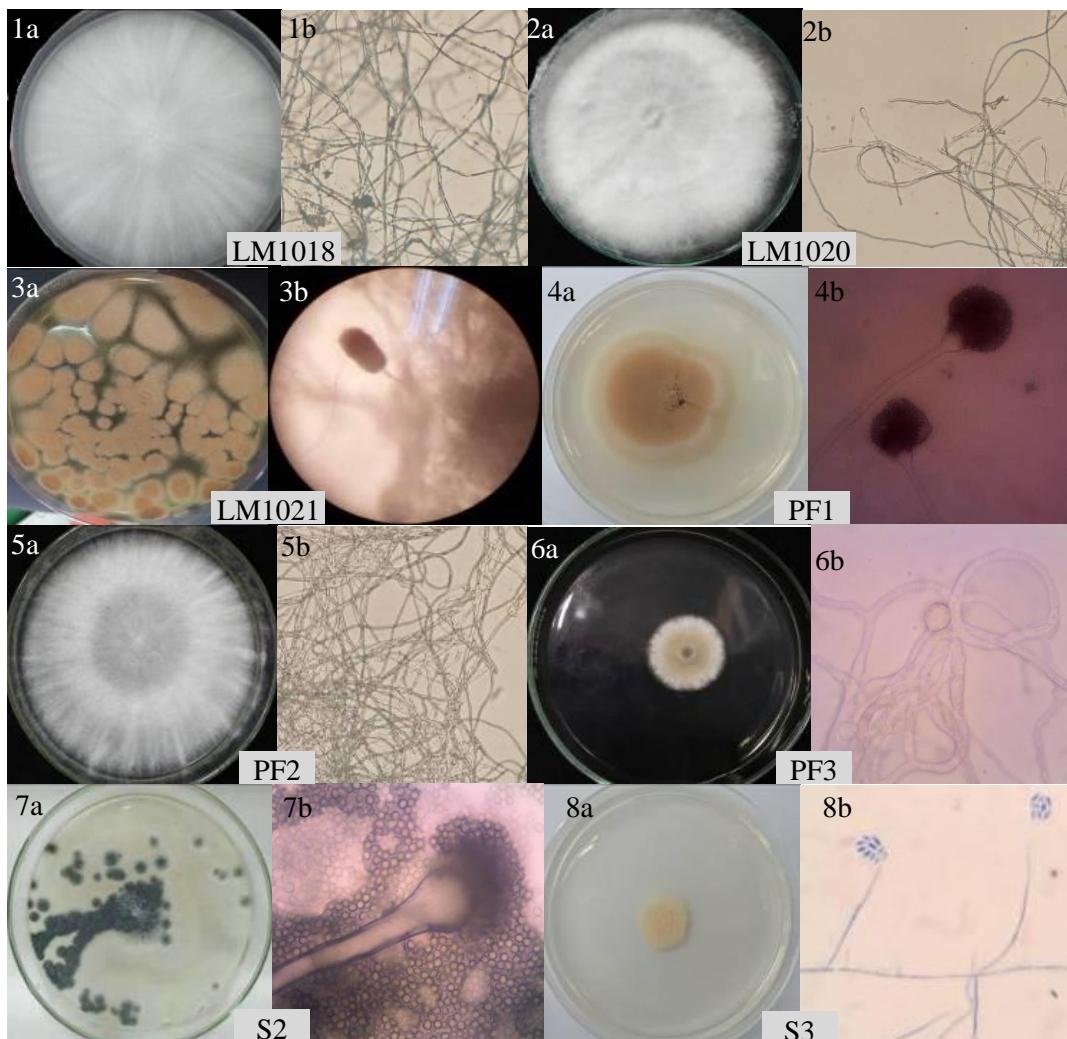
Koloni berwarna coklat tua dan berbentuk granular sempurna ditunjukkan pada isolat dengan kode LM1021 dan PF1 (Gambar 3a dan 4a). Karakteristik mikroskopis diantara kedua isolat memiliki hifa berseptat, kepala konidium memiliki warna coklat kekuningan, tampak kompak, dan berbentuk kolumnar (Gambar 3b dan 4b). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Gandjar dkk, (2006) bahwa karakteristik dari isolat kode PF1 dan LM1021 dimungkinkan termasuk ke dalam genus *Aspergillus*.

Koloni lainnya yakni isolat dengan kode S2 yang berbentuk granular dan berwarna hijau muda hingga tua (Gambar 7a). Isolat kode S2 memiliki karakteristik mikroskopis yang sama yakni hifa berseptat, konidiofor berbentuk bulat dengan fialid berwarna dan tumbuh rantai konidia yang memanjang (Gambar 7b). Berdasarkan morfologi ini, maka isolat S2 dimungkinkan tergolong dalam genus *Aspergillus*.

Permukaan koloni berwarna abu-abu kecoklatan dengan sebalik koloni berwarna coklat ditunjukkan oleh isolat dengan kode PF3 (Gambar 6a). Secara mikroskopis, miselium tampak transparan dan bercabang dengan hifa berseptat. Konidium berbentuk bulat hingga elips (Gambar 6b). Berdasarkan karakteristik tersebut, dimungkinkan kode PF3 termasuk ke dalam genus *Leptosphaerulina*, dimana hal ini sesuai dengan dilaporkan oleh Wu *et al.*, (2013).

Koloni dengan bentuk datar dengan tekstur basah dan berwarna kuning pucat ditunjukkan oleh isolat dengan kode S3 (Gambar 8a). Secara mikroskopis miselia berwarna kuning bening, tidak berseptat dan konidia berbentuk silindris atau elipsoidal. Konidiospore membentuk bola *pin-head* (Gambar 8b). Berdasarkan

karakteristik morfologi tersebut, isolat kode S3 dimungkinkan termasuk dalam genus Hypocreales, dimana hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Campbell and Jhonshon, (2013).



Gambar 4.1 Morfologi Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo dari tanah tanpa plastik (1-3) dan Tanah dengan plastik (4-8), Morfologi secara makroskopis (a), secara mikroskopis (b).

Koloni berwarna putih dan menyebar ke seluruh permukaan cawan Petri dengan permukaan seperti kapas ditunjukkan oleh isolat kode LM1018, LM1020 dan PF2 (Gambar 1a, 2a dan 5a). Morfologi mikroskopis dari ketiga isolat tersebut hanya terlihat bentuk hifa tidak berseptat dan bercabang (Gambar 1b, 2b, dan 5B). Karakter

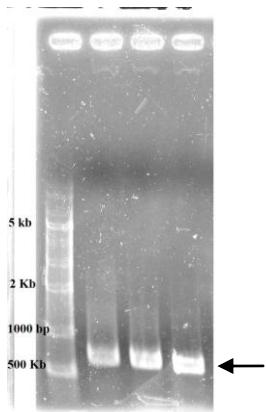
morfologi ini hampir sama dengan filum Basidiomycota. Identifikasi tingkat lanjut dari filum Basidiomycota dapat dilakukan secara genotipik berdasarkan area ITS rDNA.

Identifikasi spesies dengan hanya menggunakan kriteria morfologi saja cukup sulit, hal ini dikemukakan oleh Sierra *and* Henricot, (2002) bahwa terdapat beberapa kasus memerlukan informasi biokimia dan ekologi kultur, dan persamaan karakter miselium yang sangat mirip antara spesies yang berbeda. Untuk itu diperlukan identifikasi berdasarkan karakter molekuler. Identifikasi molekuler telah dievaluasi pada beberapa kelompok kapang hingga tingkat spesies (Iwen *et al.*, 2002).

4.1.2. Karakterisasi molekuler isolat kapang tanah mangrove Wonorejo

Karakterisasi molekuler dalam penelitian ini bertujuan untuk identifikasi isolat kapang secara genotipik. Seperti yang dikemukakan oleh Gherbawy *and* Voigt (2010), bahwa penggabungan identifikasi berbasis morfologi dan molekuler dapat membantu taksonomi kapang dalam diferensiasi tingkat spesies bahkan varietas.

Karakterisasi molekuler dilakukan pada area *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Saat ini telah ada lebih dari 90.000 sekuens jamur pada area ITS, dimana area ini paling banyak digunakan sebagai area *barcoding* pada jamur (Hibbett *et al.*, 2011). Hasil produk PCR dengan menggunakan sepasang primer universal yakni ITS1 untuk primer *forward* dan ITS4 untuk primer *reverse*. Hasil amplifikasi dari area ITS rDNA bervariasi $\pm 500\text{bp}$ (Gambar 4.2). Hasil pembacaan sekuen dari masing-masing primer *forward* dan *reverse* diolah dengan memotong ujung sekuen yang memiliki *peak* rendah menggunakan program Bioedit. Selanjutnya sekuen di *allignment* sehingga didapatkan sekuen kompilasi dari primer *forward* dan *reverse* dari area ITS rDNA.



Gambar 4.2 Hasil Amplifikasi area *Internal Transcribes Spacer* (ITS) rDNA dengan menggunakan primer ITS1 /ITS4. M= marker; 1=LM1018, 2= LM1020; 3= LM1021

Sekuen dari area ITS rDNA selanjutnya dianalisa similaritas intraspesies dengan data yang ada pada Genbank NCBI menggunakan algoritma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil analisa sekuen terdapat pada Tabel 4.1. Keseluruhan similaritas *query* dengan data pada genbank menunjukkan hasil 99% dan 100%. Hasil ini selanjutnya dapat digunakan untuk identifikasi hingga tingkat spesies dengan mencocokkan kembali dari hasil pengamatan fenotipik isolat kapang.

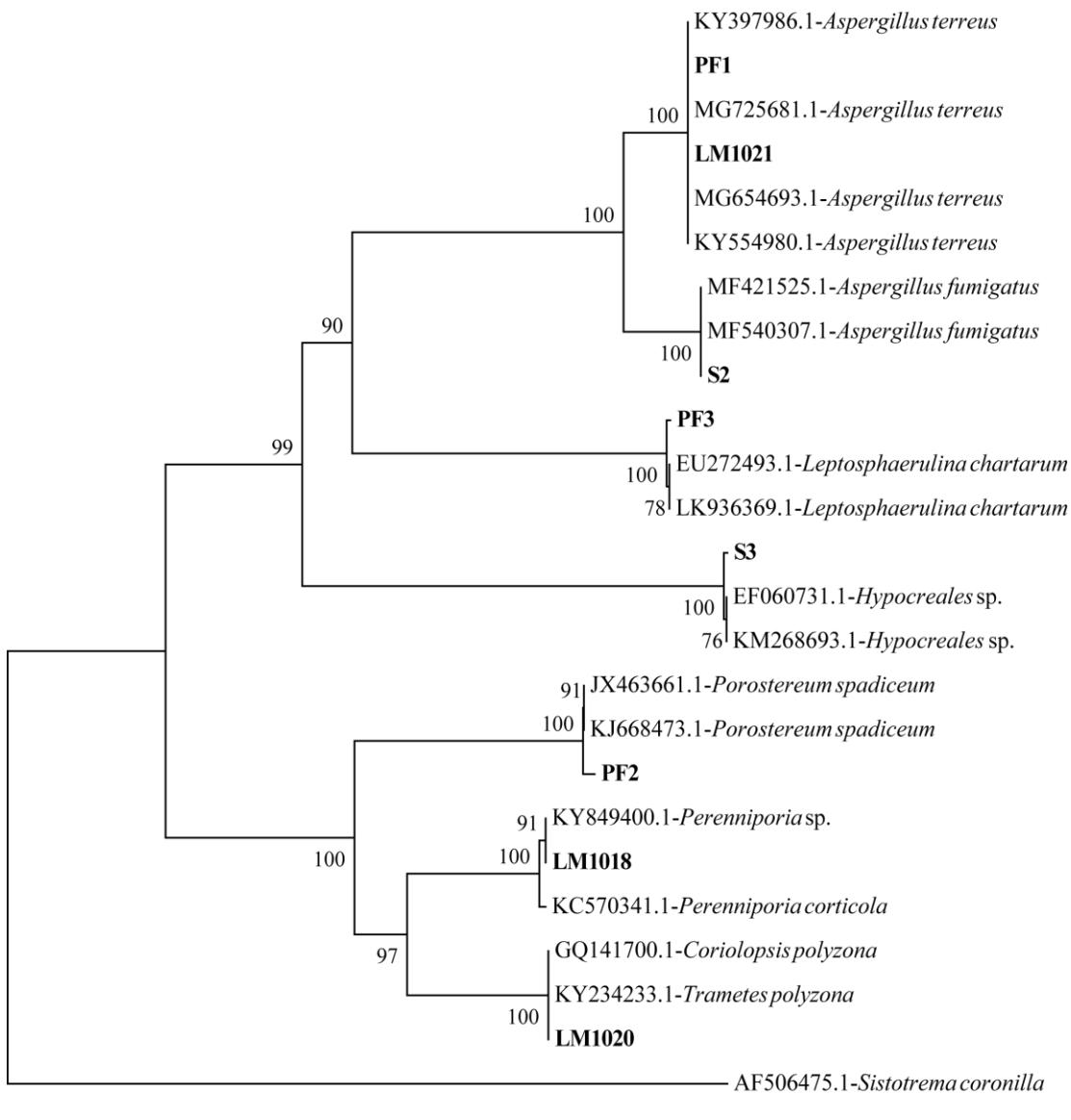
Tiga isolat yang dimungkinkan tergolong dalam genus *Aspergillus* yakni LM1021, PF1 dan S2, menunjukkan hasil identik 100% dengan *Aspergillus terreus* pada isolat kode LM1021 dan PF1 dan identik 100% dengan *Aspergillus fumigatus* pada isolat kode S2. Selanjutnya isolat kode PF3 yang dimungkinkan termasuk dalam genus *Leptosphaerulina*, menunjukkan hasil identik 99% dengan *Leptosphaerulina chartarum*. Sedangkan isolat kode PF3 identik 99% dengan *Hypocreales* sp. Dan tiga isolat yang termasuk dalam filum Basidiomycota yakni LM1020, LM1018 dan PF2 secara berturut-turut identik sebesar 100% dengan *Trametes polystroma*, 99% dengan *Perenniporia* sp. dan *Porostereum spadiceum*.

Tabel 4.1 Identifikasi Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo secara Genotipik

Kode	Panjang Query	Data NCBI terdekat	No. Accession	Max Score	% Similaritas	Referensi
Isolat dari tanah Mangrove Wonorejo tanpa plastik						
LM 1018	603 bp	<i>Perenniporia</i> sp.	KY849400.1	1107	99	Lien <i>et al.</i> , 2017
LM 1020	557 bp	<i>Trametes polyzona</i>	GQ141700.1	1029	100	Lapmak <i>et al.</i> , 2009
LM 1021	546 bp	<i>Aspergillus terreus</i>	MG654693.1	1009	100	Machado <i>et al.</i> , 2017
Isolat dari tanah Mangrove Wonorejo dengan plastik						
PF1	463 bp	<i>Aspergillus terreus</i>	MG725681.1	856	100	Lotfy <i>et al.</i> , 2017
PF2	620 bp	<i>Porostereum spadiceum</i>	KJ668473.1	1129	99	Jang & Kim, 2014
PF3	567 bp	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	LK936369.1	1024	99	Da Cunha, 2014
S2	480 bp	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF540307.1	887	100	Talbot, 2017
S3	462 bp	<i>Hypocreales</i> sp.	KM268693.1	846	99	Wang <i>et al.</i> , 2014

Similaritas maupun kekerabatan antar sekuen antar isolat kapang tanah mangrove Wonorejo dapat diamati melalui kontruksi pohon filogenik. Kontruksi pohon filogeni dari isolat kapang tanah mangrove Wonorejo menggunakan metode perhitungan jarak yakni *neighbor-joining phylogenetic tree*. Tujuan dari penggunaan metode ini adalah untuk mengetahui posisi sekuen isolat terhadap sekuen terdekat (sekuen yang memiliki perbedaan pasangan basa yang kecil) sehingga terlihat jarak kedekatan antar masing-masing sekuen (Dharmayanti, 2011). Hasil kontruksi pohon filogeni dari isolat tanah mangrove Wonorejo dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Kumpulan sekuen dilakukan allignment menggunakan CLUSTAL W pada program MEGA6, dan dilakukan kontruksi pohon filogenetik (Gambar 4.3). Nilai *bootstrap* yang terletak pada percabangan menunjukkan signifikansi set data yang telah diacak dalam memprediksi cabang-cabang yang sama (Dharmayanti, 2011). Hasil pohon filogenetik dari isolat kapang tanah mangrove Wonorejo memiliki nilai >70% sehingga prediksi kekerabatan berbeda signifikan dan dapat dipercaya.



Gambar 4.3 Analisa Filogenetik dari Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo. Kontruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining*. Isolat kapang tanah mangrove Wonorejo ditunjukkan oleh tanda bintang [*] sebagai subjek analisis filogenetik dengan spesies yang terkait menggunakan *neighbor-joining phylogenetic tree* (nilai bootstrap = 500). Sekuen didapatkan dari hasil BLAST. Nilai pada percabangan menunjukkan nilai bootstrap (prosentase dari 500 x replikasi) dan skala bar menunjukkan panjang cabang.

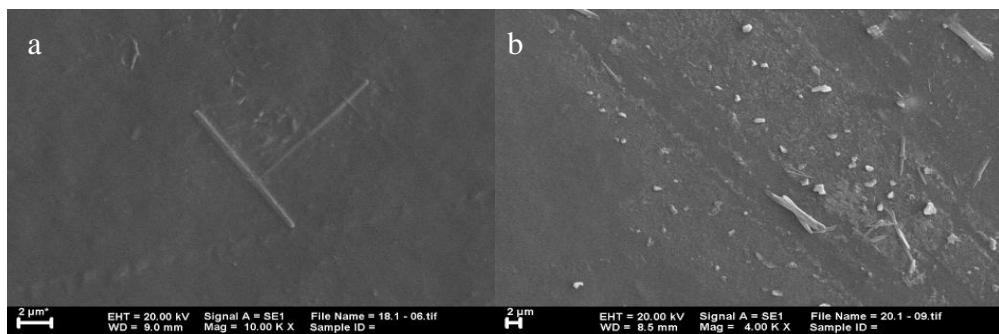
Percabangan utama setelah *outgroup* (*Sistotrema coronilla*) menunjukkan tingkat filum dimana sisi atas adalah filum Ascomycota dan cabang di bawahnya adalah filum Basidiomycota. Pada filum Ascomycota, terdapat tiga percabangan yang

menunjukkan tingkat kelas, yakni kelas Eurotiomycetes (isolat kode LM1021, PF1, dan S2), kelas Dothidiomycetes (isolat kode PF3) dan kelas Sordariomycetes (S3). Sedangkan pada filum Basidiomycota, sekuen menunjukkan kelas dan ordo yang sama yakni Agaricomycetes dan Polyporales. Selanjutnya terdapat tiga percabangan yang menunjukkan famili yang berbeda, yakni famili Phanerochaetaceae (isolat kode PF2) dan famili Polyporaceae (isolat kode LM1018 dan LM1020).

4.2. Biodegradasi Plastik

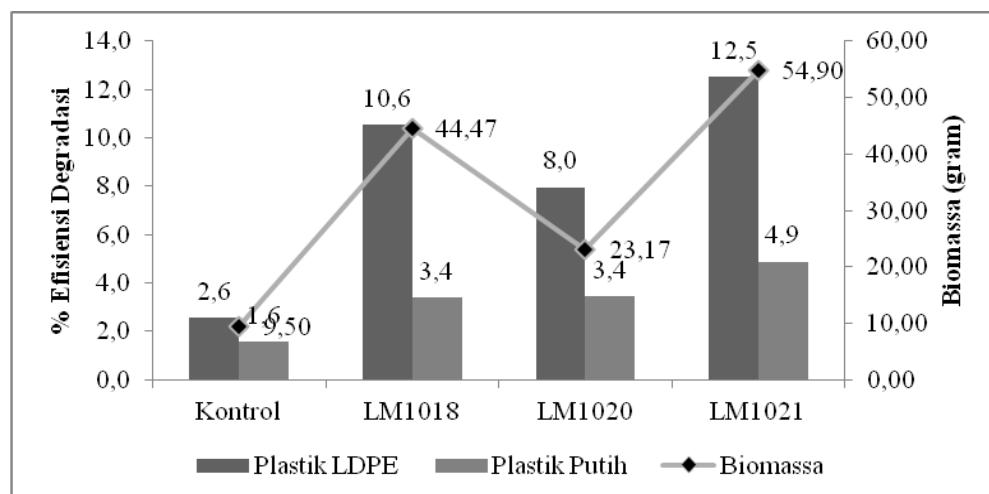
Uji biodegradasi dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat kapang tanah mangrove Wonorejo dalam mendegradasi plastik. Plastik yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua jenis, yakni kantong plastik berwarna putih dan plastik murni LDPE. Agen pendegradasi yang digunakan dalam uji biodegradasi plastik berasal dari isolat kapang tanah mangrove Wonorejo tanpa plastik, yakni isolat *Perenniporia* sp. (LM1018), *T. polyzona* (LM1020) dan *A. terreus* (LM1021). Ketiga isolat uji telah dilaporkan potensinya, sebagai kapang pendegradasi plastik, dalam penelitian Nathania & Kuswytasari (2013) dan Jamila (2016).

Biodegradasi plastik dapat diketahui dari hasil pengamatan beberapa parameter seperti terbentuknya % efisiensi degradasi (ED), analisa FTIR, analisa SEM dan AFM. Proses biodegradasi dimulai dengan pembentukan biofilm dan penetrasi hifa ke polimer plastik. Berdasarkan hasil pengamatan plastik LDPE menggunakan SEM, terlihat adanya bentukan batang yang menancap pada substrat (Gambar 4.4). Hal ini mengindikasikan terjadinya penetrasi hifa pada plastik yang merupakan awal terjadinya proses degradasi.



Gambar 4.4. Pengamatan bentukan hifa pada plastik LDPE menggunakan SEM pada isolat LM1018 (a) dan LM1020 (b).

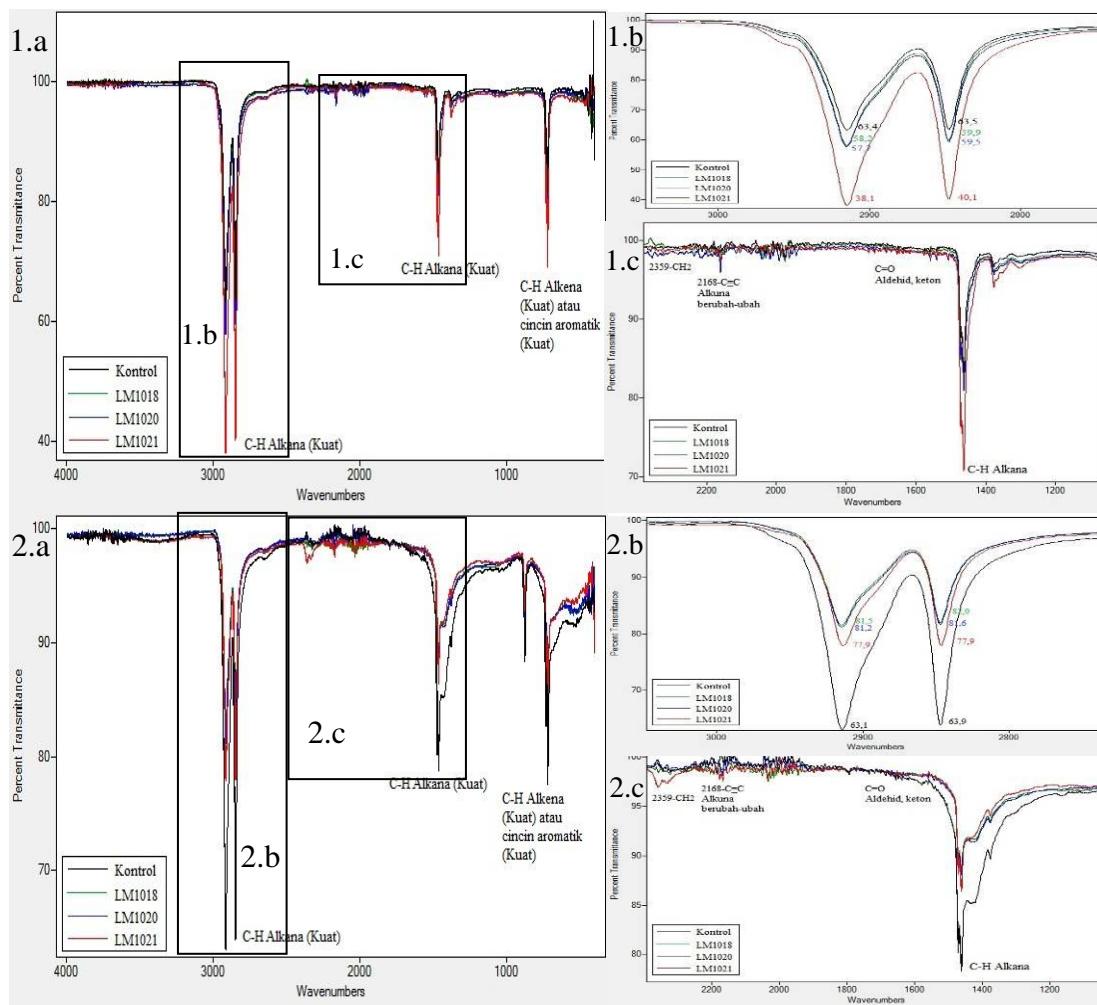
Parameter yang menunjukkan terjadinya biodegradasi selanjutnya adalah prosentase efisiensi degradasi yang didapatkan dari penurunan berat kering plastik. Hasil % efisiensi degradasi (% ED) dari keseluruhan ditunjukkan pada Gambar 4,5. Berdasarkan uji Anova, pada plastik LDPE menunjukkan nilai $p = 0.000$. Sedangkan pada plastik putih nilai $p=0.065$. Nilai ini berarti bahwa pada plastik LDPE terima H0 dan ketiga isolat memberikan pengaruh secara nyata terhadap nilai degradasi, namun pada plastik biasa hanya isolat LM1021 yang berpengaruh nyata terhadap nilai degradasi. Data % ED menunjukkan nilai lebih tinggi pada plastik LDPE dibandingkan pada plastik putih. Hal ini dimungkinkan karena plastik LDPE mengandung komposisi lebih murni dibandingkan dengan plastik putih yang terdapat zat additif.



Gambar 4.5. Grafik Nilai Degradasi Plastik Setelah 30 Hari Inkubasi Pada Medium MS

Aspergillus terreus LM1021 memiliki nilai % ED tertinggi sebesar 12,2% pada plastik LDPE dan 4,9% pada plastik putih dengan masa inkubasi 30 hari. Hal ini berkorelasi positif dengan biomassa yang dihasilkan paling tinggi diantara dua isolat lain, yakni sebesar 45,7 gr. Semakin banyak biomassa yang dihasilkan maka semakin tinggi enzim yang dikeluarkan, sehingga nilai degradasi juga meningkat. Potensi *A. terreus* LM1021 dalam mendegradasi plastik juga telah dilaporkan oleh Raaman *et al.* (2012), Ibrahim *et al.* (2011) dan Singh *et al.* (2012). Isolat potensial selanjutnya adalah *Perenniporia* sp. LM1018 yang menunjukkan nilai %ED sebesar 10,8% pada plastik LDPE dan 3,4% pada plastik putih, sedangkan isolat *T. Polyzona* LM1020 menunjukkan % ED sebesar 8,1% pada plastik LDPE dan 3,4% pada plastik putih. Informasi tentang potensi dari kedua isolat (LM1018 dan LM1020) dalam mendegradasi plastik belum banyak dilaporkan, namun kedua isolat dikenal memiliki potensi sebagai jamur pendegradasi lignin (Arantes *et al.*, 2011; Dashtban *et al.*, 2010; Vasina *et al.*, 2017; Knežević *et al.*, 2013).

Analisa FTIR pada plastik uji dilakukan untuk mengetahui perubahan struktur dilihat dari gugus fungsionalnya. Sensitivitas FTIR terhadap lingkungan molekul lokal telah banyak digunakan untuk menganalisa interaksi antar molekul. Hasil uji FTIR terhadap plastik LDPE dan plastik putih menunjukkan bahwa terjadi terjadi peregangan pada kelompok alkana C-H pada *wavenumber* 2914.94, 2847.38 dan 1471 cm⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa isolat kapang memecah polimer pada rantai polietilenya. Peregangan juga terjadi pada kelompok C-C=C simetris dari cincin aromatik pada 1462.43 cm⁻¹ dan peregangan C=C dari kelompok alkyne pada 2159.93 cm⁻¹. Peregangan tertinggi ditunjukkan oleh isolat LM1021, dimana hal ini seiring dengan tingginya nilai efisiensi degradasi. Perubahan pola struktur LDPE ini dari hasil degradasi memiliki kesamaan dengan hasil yang dilaporkan oleh Ojha *et al.*, (2016). Deteksi adanya pembentukan atau penghilangan dari gugus karbonil dan ikatan rangkap menggunakan FTIR menandakan adanya proses biodegradasi (Esmaili *et al.*, 2013).



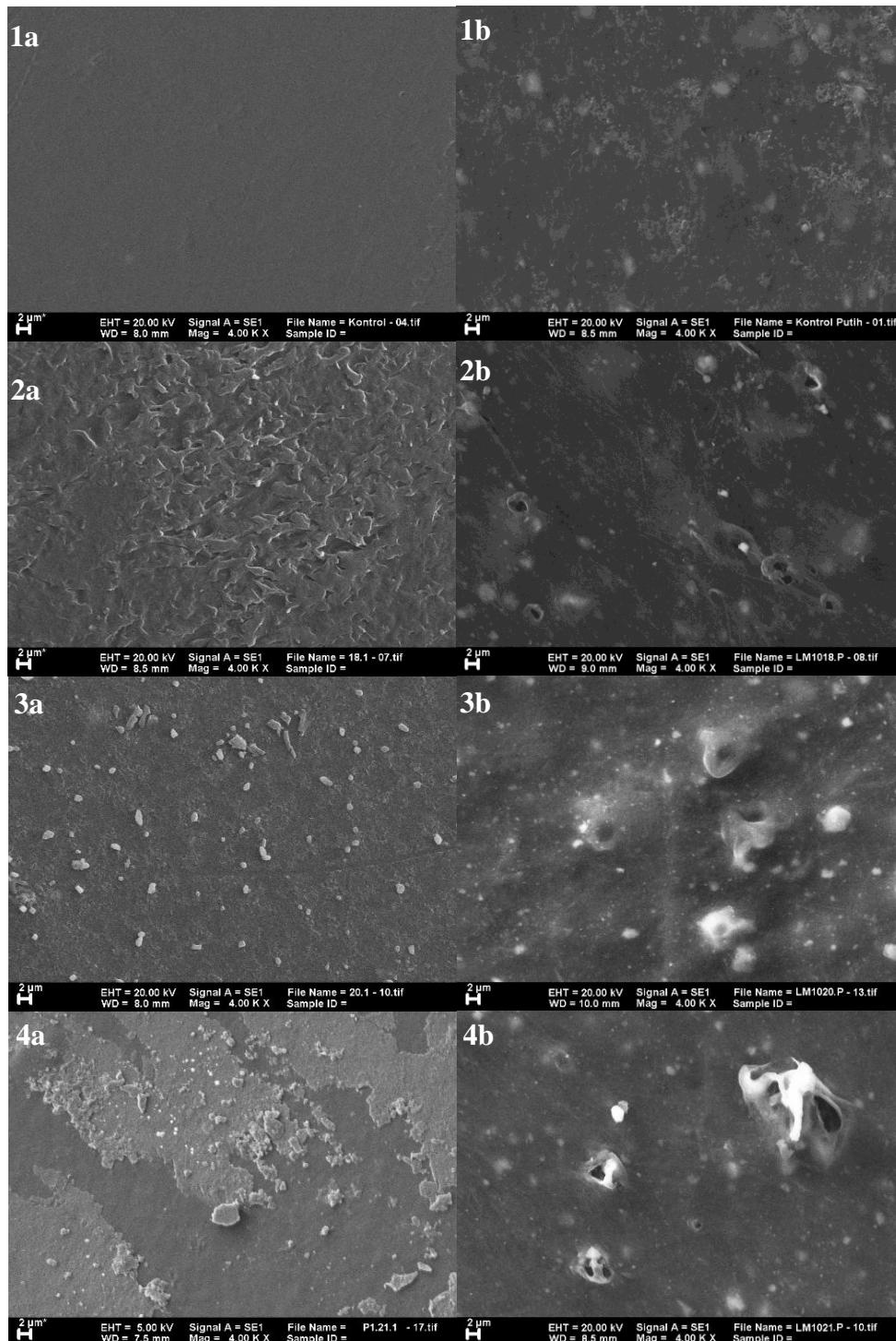
Gambar 4.6. Hasil uji plastik LDPE menggunakan FTIR pada plastik LDPE (1) dan pada plastik putih (2). Spektrum dengan kisaran wavenumber $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (a), $1500\text{-}3500\text{cm}^{-1}$ (b) dan $1000\text{-}2500\text{cm}^{-1}$ (c)

Hasil uji FTIR terhadap plastik putih yang telah didegradasi ditunjukkan pada Gambar 4.6(b) memberikan Gambaran yang cukup berbeda dari hasil FTIR plastik LDPE. Intensitas transmitan kelompok alkana C-H pada plastik LDPE setelah biodegradasi lebih rendah dibandingkan kontrol, sedangkan pada plastik putih intensitas transmitan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini dimungkinkan karena jenis plastik yang berbeda sehingga mekanisme degradasinya berbeda pula. Bonhomme *et al.*, (2003) menyatakan bahwa biodegradasi polimer terbagi menjadi dua jalur, yakni biodegradasi hydro dan atau oxo.

Peregangan ditunjukkan pada cincin aromatik C=C pada 1461.30 dan 1471.67 cm^{-1} dan kelompok alkana C-H pada 2913.70 dan 2846.60 cm^{-1} . Hal ini seperti yang dilaporkan Bonhomme *et al.*, (2003) bahwa seiring dengan laju degradasi, puncak menjadi lebih luas karena dihasilkannya beberapa bentuk monomer dan hasil oksidatif dari polietilen.

Inisiasi dari pemecahan rantai polietilen adalah langkah terpanjang dan paling sulit dalam proses degradasi, sehingga dibutuhkan waktu inkubasi yang lama untuk menghasilkan jumlah yang cukup dari gugus karbonil untuk melanjutkan proses dekomposisi. Albertsson *et al.*, (2004) melaporkan bahwa hanya sedikit rantai polietilena teroksidasi secara biologis yang digunakan oleh enzim intraselular dalam β -oksidasi dan pemotongan unit metilena.

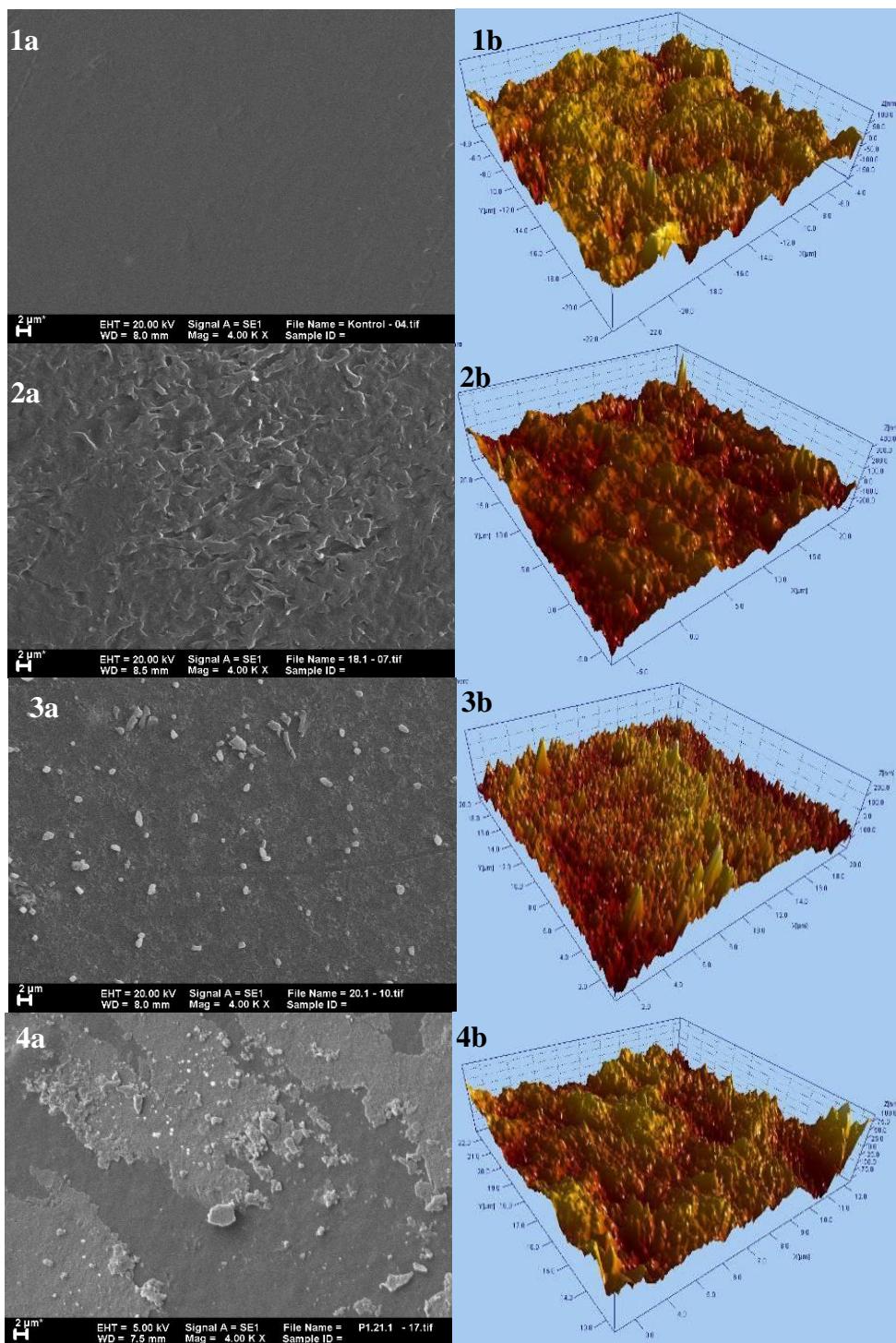
Analisa *Scanning Microscope Electron* (SEM) menunjukkan perubahan permukaan plastik setelah proses biodegradasi. Gambar 4.7 menunjukkan perubahan morfologi permukaan plastik setelah 30 hari masa inkubasi. Hasil SEM menunjukkan perubahan yang nyata pada semua film dengan pola pengrusakan yang berbeda. Permukaan plastik LDPE setelah biodegradasi menunjukkan penggerusan dan terlihat mengelupas, sedangkan pada plastik putih menunjukkan adanya lubang (Gambar 4.7). Perubahan pada permukaan plastik LDPE dan plastik putih oleh isolat *Perenniporia* sp LM1018 (Gambar 4.7.2) menunjukkan kerusakan plastik secara merata. Bentuk kerusakan serupa juga ditunjukkan oleh Zahra *et al.*, (2010) dan Das *et al.*, (2014). Dan perubahan struktur pada *Trametes polyzona* LM1020 (Gambar 4.7.3) terdapat serpihan batang yang melekat pada permukaan yang dimungkinkan bentukan penetrasi hifa, dan terlihat tahap awal pengelupasan plastik yang ditandai dengan lekukan pada permukaan plastik. Perubahan permukaan plastik terlihat jelas pada isolat *A. terreus* LM1021(Gambar 4.7.4) yang menggambarkan terjadinya erosi dengan pengelupasan secara acak. Bentuk kerusakan serupa juga ditunjukkan oleh Esmaeili *et al.*, (2013).



Gambar 4.7.Pengamatan SEM pada permukaan plastik LDPE (a) dan plastik putih (b) setelah proses biodegradasi 30 hari pada plastik LDPE oleh kontrol (1), isolat LM1018 (2), isolat LM1020 (3) dan isolat LM1021 (4).

Kerusakan morfologi berupa lekukan maupun erosi yang muncul pada hasil biodegradasi dimungkinkan karena tidak adanya distribusi seragam dari matriks polimer. Perubahan morfologi mengkonfirmasi kerapuhan plastik yang disebabkan oleh kultur kapang. Hal ini diperkuat dengan morfologi permukaan plastik kontrol (Gambar 4.7.1) yang tampak mulus dan tidak terdapat kerusakan.

Perubahan morfologi plastik setelah biodegradasi juga dapat dilihat dari kekasaran permukaan plastik menggunakan *Atomic Force Microscopic* (AFM). Gambaran topografi plastik LDPE secara 3 dimensi ditunjukkan pada Gambar 4.8(b). Topografi permukaan plastik diamati dari perubahan warna dimana semakin terang maka permukaan semakin tinggi, dan sebaliknya. Keseluruhan hasil uji AFM menunjukkan bahwa topografi dari plastik LDPE hasil uji biodegradasi (Gambar 4.8. 2b,3b,4b) menggambarkan banyak area lembah yang berwarna gelap dibandingkan dengan plastik LDPE kontrol (Gambar 4.8.1a) yang lebih banyak area terang. Hasil pengamatan AFM dari plastik LDPE yang dilaporkan oleh Ojha *et al.*, (2016) juga menunjukkan hasil yang serupa. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Bonhomme *dkk.*, (2003) bahwa analisis AFM pada lembaran plastik dapat mengungkapkan perubahan morfologi pada plastik yang disebabkan karena degradasi oleh isolat kapang.



Gambar 4.8.Pengamatan permukaan plastik LDPE menggunakan SEM (a) dan AFM (b) setelah proses biodegradasi 30 hari pada plastik LDPE oleh kontrol (1), isolat LM1018 (2), isolat LM1020 (3) dan isolat LM1021 (4).

4.3. Deteksi Enzim yang terlibat dalam Proses Biodegradasi

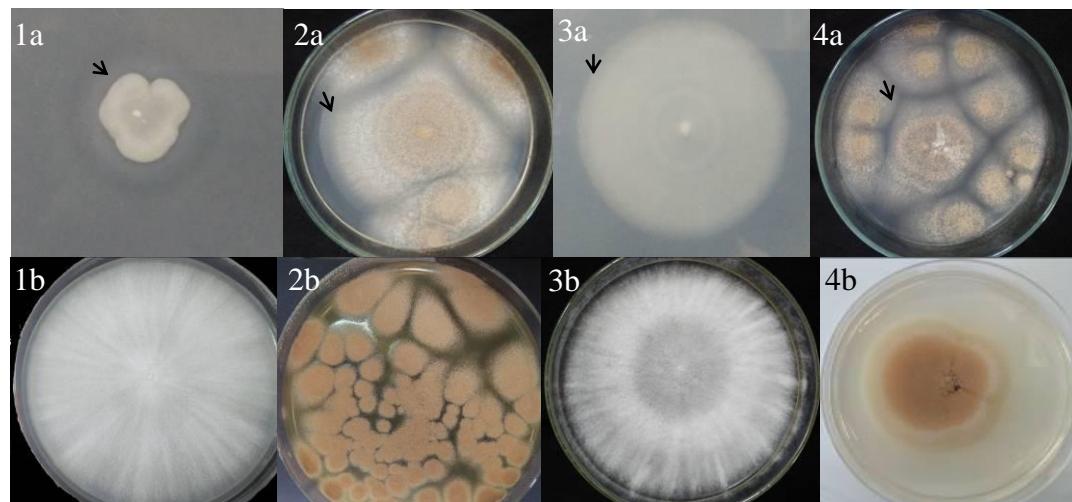
Deteksi enzim dilakukan untuk mengetahui potensi isolat kapang dalam memproduksi enzim yang terlibat dalam proses biodegradasi. Deteksi enzim pada penelitian ini dibatasi pada empat jenis enzim, yakni lakase, mangan peroksidase, lipase dan alkana hidroksilase. Empat enzim tersebut representatif dari enzim hidrolase dan oksidoreduktase yang umumnya terlibat dalam proses degradasi plastik itu sendiri maupun komponen penyusunnya (Ehara *et al.*, 2000; Premraj *and* Mukesh, 2005; Ameen *et al.*, 2015; Sowmya *et al.*, 2015; Fish *et al.*, 1983; Van Beilen *et al.*, 2003; Van Beilen *and* Funhoff, 2007; Mishrah *and* Singh, 2012; Skariyachan, 2015; Eberl *et al.*, 2009; Bhardwaj *et al.*, 2012). Hasil uji kualitatif dari enzim pendegradasi plastik ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Uji Kualitatif Enzim Pendegradasi Plastik

Kode Isolat	Lakase	Mangan Peroksidase	Lipase	Alkana hidroksilase
Tanah mangrove Wonorejo dengan plastik				
PF1	-	-	+	+
PF2	+	+	+	-
PF3	-	-	-	+
S2	-	-	-	+
S3	-	-	-	-
Tanah mangrove Wonorejo dengan tanpa plastik				
LM1018	+	+	+	+
LM1020	+	+	-	+
LM1021	-	-	+	+

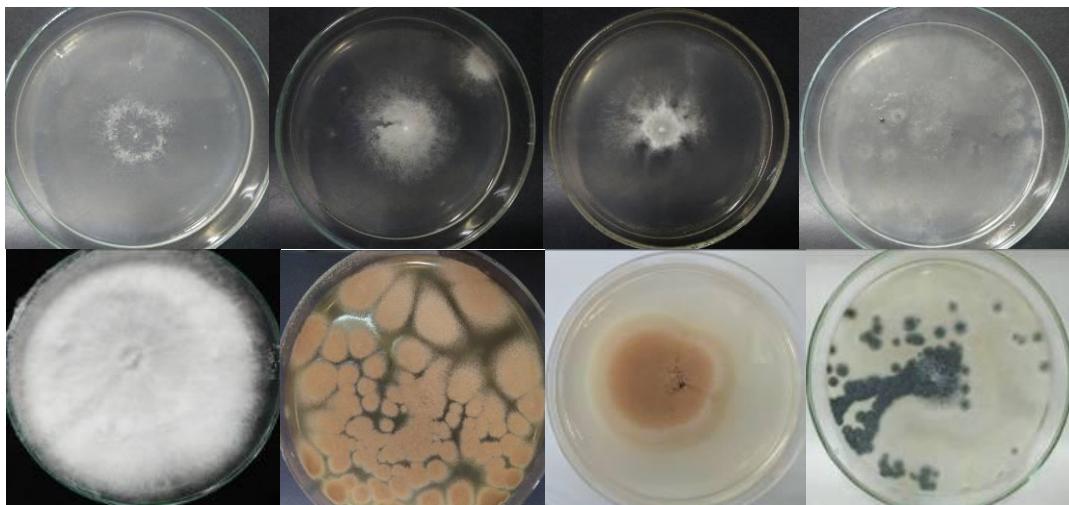
Lipase merupakan salah satu enzim hidrolase yang bertanggung jawab dalam degradasi hidrokarbon (Skariyachan, 2015; Eberl *et al.*, 2009; Bhardwaj *et al.*, 2012). Lipase mampu mengkatalisis pembelahan hidrolitik yang menyebabkan penurunan hidrofobisitas pada permukaan polimer (Tribedi *and* Si, 2013). Hasil deteksi enzim lipase dilakukan dengan menggunakan Tween 80. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona presipitasi disekitar mikroorganisme yang menghasilkan lipase pada media agar. Zona presipitasi yang terbentuk merupakan kristalisasi garam kalsium dengan asam lemak yang dihasilkan dari hidrolisis Tween (Gupta *et al.*, 2012). Isolat

tanah mangrove Wonorejo yang mampu menghasilkan lipase diantaranya adalah *Perenniporia* sp. (LM1018), *A. terreus* (LM1021 dan PF1), *P. spadiceum* (PF2) dan *A. fumigatus* (S2)(Gambar. 4.9). Kontrol negatif yang digunakan adalah isolat kapang yang ditumbuhkan pada medium PDA.



Gambar 4.9. Uji kualitatif lipase. Tanda panah (\downarrow) menunjukkan zona presipitasi *Perenniporia* sp LM1018 (1), *A. terreus* LM1021 (2), *P. spadiceum* PF2 (3) dan *A. terreus* PF1(4) pada medium uji lipase (a) dan pada medium PDA (b) dengan usia kultur 7 hari

Deteksi enzim alkana hidroksilase dilakukan berdasarkan metode Liu *et al.*, (2014) dengan menumbuhkan isolat kapang pada medium agar BS (*Basal Salt*) yang dilapisi dengan n-hexadekan. Hal ini bertujuan agar kapang tumbuh dengan memanfaatkan n-hexadekan sebagai sumber karbon. Hasil positif ditunjukkan dengan pertumbuhan pada medium uji. Kontrol positif yang digunakan adalah isolat kapang yang ditumbuhkan pada medium PDA. Hasil uji menunjukkan enam isolat kapang mangrove Wonorejo yang mampu tumbuh pada medium uji, yakni LM1018, LM1020, PF1, PF3 dan S2 (Gambar 4.10). Namun isolat kode PF2 dan S3 tidak mampu tumbuh pada medium uji. Keterlibatan alkane hidroksilase dalam proses degradasi plastik khususnya polietilen telah dilaporkan oleh Jeon *and* Kim (2015). Proses degradasi terjadi melalui sistem alkana hidroksilase yang dapat menurunkan rantai alkana dengan alkana monooksigenase yang berpartisipasi dalam tahap pertama dalam jalur dengan hidroksilasi karbon terminal alkana (Rojo 2009).



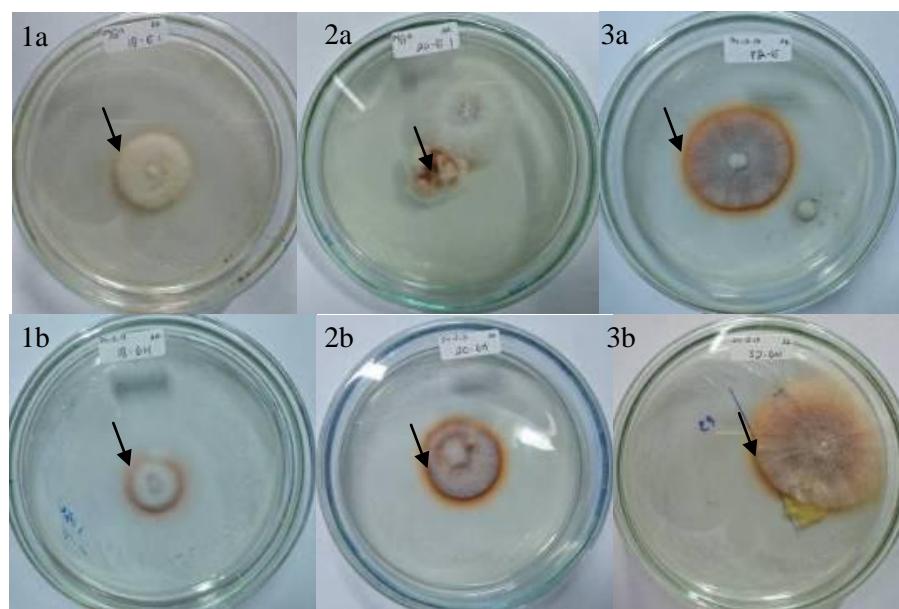
Gambar 4.10 Uji kualitatif alkana hidroksilase. Medium uji dengan isolat *T. polyzona* LM1020 (a), *A. terreus* LM1021 (b), *A. terreus* PF1 (c) dan *A. fumigatus* S2 (d). pada medium uji lipase (a) dan pada medium PDA (b) dengan usia kultur 7 hari

Isolat kapang tanah mangrove Wonorejo yang termasuk dalam kapang White rot diantaranya *Perenniporia* sp. (LM1018), *T. polyzona* (LM1020) dan *P. spadiceum* (PF2). Ketiga isolat memiliki potensi dalam ekskresi enzim lignin peroksidase yang ditunjukkan dari hasil positif pada uji kualitatif lakase dan mangan peroksidase (Gambar 4.11). Hasil uji kualitatif lakase dan mangan peroksidase pada isolat yang mampu menghasilkan enzim ligninolitik memberikan zona berwarna coklat pada sekitar mikroorganisme. Hal ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi pada substrat guaiacol (pada uji kualitatif lakase, Gambar 4.11 a-c) dan substrat guaiacol+H₂O₂ (pada uji kualitatif mangan peroksidase, Gambar 4.11 d-f).

Lignin merupakan polimer aromatik alami dari biomassa kayu dan bersifat rekalsitran. Kapang pelapuk putih adalah mikroorganisme pendegradasi lignin yang paling efektif dan banyak dipelajari untuk degradasi plastik (Kale *et al.*, 2015). Tiga enzim utama yang terlibat dalam sistem ligninolitik adalah Lignin peroksidase (LiP), Mangan peroksidase (MnP) dan lakase (Bahrdwaj, 2012). Telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa degradasi polietilen dilakukan oleh enzim ligninolitik.

Lakase merupakan enzim utama yang disekresikan oleh kapang pendegradasi lignin, dimana enzim akan mengkatalisis secara oksidasi berbagai

senyawa poliaromatik. Lakase juga mampu bertindak pada substrat non-aromatik. Menurut Mayer *and* Staple (2002), oksidasi rantai hidrokarbon dari polietilen dilakukan oleh lakase. Selanjutnya mangan peroksidase merupakan enzim pendegradasi lignin yang menggunakan mangan sebagai kofaktor penting, terutama sebagai pengatur produksi MnP dan mediator aktif dalam siklus katalitik MnP. Mangan memainkan peran penting dalam sistem degradasi polietilena, dan MnP dapat dilibatkan dalam degradasi oleh kapang pendegradasi lignin dalam suatu kultur yang mengandung mangan yang cukup (Iiyoshio *et al.*, 1998).



Gambar 4.11 Uji Kualitatif Enzim Ligninolitik dengan pembentukan zona coklat (↓) medium uji lakase (a) dan medium uji mangan peroksidase (b) pada isolat *Perenniporia* sp. LM1018 (1) , *T. polyzona* LM1020 (2) dan *P. spadiceum* PF2 (3) pada usia kultur 4 hari

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, maka dapat disimpulkan beberapa hal di bawah ini:

1. Isolat kapang tanah mangrove Wonorejo yang telah diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan molekulernya didapatkan delapan isolat, yakni *Perenniporia* sp. (LM1018), *Trametes polyzona* (LM1020), *Aspergillus terreus* (LM1021), *Aspergillus terreus* (PF1), *Porostereum spadiceum* (PF2), *Leptosphaerulina chartarum* (PF3), *Aspergillus fumigatus* (S2) dan *Hypocreales* sp. (S3).
2. Isolat *A. terreus* LM1021 menunjukkan potensi tertinggi dalam degradasi plastik dengan nilai % ED sebesar 12,5% pada plastik LDPE dan 4,9% pada plastik putih. Diikuti oleh isolat *Perenniporia* sp. LM1018 dengan % ED sebesar 10,6% pada plastik LDPE dan 3,4% pada plastik putih. Dan oleh isolat *T. Polyzona* LM1020 dengan % ED sebesar 8% pada plastik LDPE dan 3,4% pada plastik putih
3. Isolat kapang tanah mangrove Wonorejo yang mampu memproduksi enzim lakase dan mangan peroksidase adalah isolat LM1018, 1020 dan PF2 pada; enzim lipase diantaranya adalah isolat LM1018, LM1021, PF1, PF2 pada; enzim alkana hidroksilase adalah isolat LM1018, LM1020, LM1021, PF1, PF3, dan S2.

5.2 Saran

Adapun saran dalam penelitian ini yaitu perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui kemampuan isolat lebih mendalam dengan purifikasi enzim yang dihasilkan dan menggunakan metode uji biodegradasi yang aplikatif sehingga didapatkan potensi degradasi yang lebih optimal.

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”.

DAFTAR PUSTAKA

- Alauddin, M., Choudkury, I. A., Baradie, M. A., Hashmi, M. S. J. (2005), "Plastics and their machining: a review", *Materials Processing Technology*, Vol. 54, Hal. 40–46.
- Albertsson, A., Karlsson, S., (2004), "The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene", *Progress Polymer Science*, Vol. 15, hal. 177-192.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell., (1996), "Introductory Mycology ^{4th} ed", John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Ameen, Fuad, Moslem M. Hadi S. and Ahmed E. A., (2015), "Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Mangrove Fungi from the Red Sea Coast", *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, Vol. 31 (2), Hal. 125- 143.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I., (2003a), "Diversity of fungi in organic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient", *Environmental Microbiology*, Vol. 5, Hal. 1121–1132.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I., (2003b), "Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer PCR primers or estimating fungal biodiversity in soil", *Environmental Microbiology*, Vol. 5, Hal 36–47.
- Anderson, M.J., Gull, K., Denning, D.W., (1996), "Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 34, Hal. 87–93.
- Andrade, A. L. (2000), "Assesment of Biodegradability in Organic Polymer". In : Hamid, S. H. (Eds), Handbook of Polymer Degradation. Marcel Dekker, Inc., New York
- Arantes V, Milagres AM, Filley TR, Goodell B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal Ind Microbiology Biotechnology*. Vol 38(4): Hal 541-55
- Artham, Trishul. Mukesh Doble, (2008), "Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates". *Macromolecular Bioscience*, Vol. 9, Hal. 14-24.
- Arutchelvi J., M. Sudhakar, Arkatkar A., Doble M. (2008), "Biodegradation of Polyethylene and Polypropylene" *Indian Journal of Biotechnology*, Vol. 7, Hal. 9-22.

- Atiq, N., Safia A., M.Ishfaq A., Saadja A., Bashir A., and Geoffery R., (2011), “Isolation and Identification of Polystyrene Biodegrading Bacteria from Soil”, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 4, Hal. 1537-1541.
- Barnett, H. L. (1969), “*Illustrated Genera of Imperfect Fungi*”, Burgess Publishing Company, Virginia.
- Bhardwaj, H., Gupta R., Tiwari A., (2012), “Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics”, *Journal Polymer Environmental*, Vol 1:272, issue 5
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.M., Lemaire, J., Sancelme, M., Scott, C., (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* Vol 81, page 441-452.
- Burdsall, H. H. & Banik, M. (1990). Serological differentiation of three species of Armillaria and Lentinula erodes by enzyme-linked immunosorbent assay using immunized chickens as a source of antibodies. *Mycologia* 82: 415-423
- Campbell, C.K; Johnson, E.M. (2013). *Identification of Pathogenic Fungi*. John Wiley & Sons. pp. 178–179. ISBN 1118520041.
- Ching, C., D.L. Kaplan and E. L. Thomas. (1993), “*Biodegradable Polymer and Packaging*”, Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania, USA
- Cosgrove L., P.L. McGeehan, G. D. Robson and P.S. Handley. (2007). Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil”, *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 73: Hal 5817-5824.
- Da Cunha,K.C., Sutton,D.A., Gene,J., Cano,J., Madrid,H., Decock,C., Wiederhold,N. and Guarro,J. (2014). New Pithomyces species from clinical specimens. JOURNAL Submitted (29-MAY-2014) URV, Microbiology, Carrer Alt de Carme 33-35, 2,2, Reus, Tarragona, 43201, SPAIN
- Das Merina P., Santosh Kumar . (2014). Microbial Deterioration of Low Density Polyethylene by Aspergillus and Fusarium sp. *International Journal Chemical Technology Research*. Vol 6(1),pp 299-305.
- Dashtban Mehdi , Schraft Heidi, Syed T. A., Qin W. (2010). Review Article Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin . *International Journal Biochemica Molecular Biology* Vol 1(1): Hal 36-50
- Deacon, J.W. (2006), “*Fungal biology 4th edition* Chapter 9: Fungal genetics, molecular genetics, and genomics”, Blackwell Publishing. USA
- Dharyamanti I.N.L.P.(2011). *Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. Makalah. Balai Besar Penelitian Veteriner

- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., (2002), “Vertical distribution of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis”, *New Phytologist*, Vol. 156, Hal. 527–535.
- Duong LM, Jeewon R, Lumyong S, Hyde KD. (2006), “DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes”, *Fungal Diversity*, Vol. 23, Hal. 121–138.
- Eberl, A., S. Heumann, T. Brückner, R. Araujo, A. Cavaco-Paulo, F. Kaufmann, W. Kroutil, G.M. Guebitz. (2009), “Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 143 (3), Hal. 207-212.
- Ehara K., Y. Iiyoshi, Y. Tsutsumi, T. Nishida, (2000), “Polyethylene degradation by manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide”, *Journal of Wood Science*, Vol. 46 (2), Hal. 180–183.
- Esmaeili A., Pourbabae A. A., Alikhani H. A., Shabani F., Esmaeili E. (2013). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *Plos One*. Vol 8(9) e 71720
- Ferraro, J.R. and Basile, L.J. (1979). Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Applications to Chemical Systems, Vol. 2 Academic Press, New York, NY, 1979, Ch. 2, p.79
- Fish, Neville M. Stuart Harbron, David J. Allenby, and Malcolm D. Lilly., (1983), “Oxidation of n-Alkanes: Isolation of Alkane Hydroxylase from *Pseudomonas putida*”, *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 17, Hal. 57-63.
- Frazer AC. (1994). “*O-methylation and other transformations of aromatic compounds by acetogenic bacteria*”. In: Drake HL, editor. Acetogenesis. New York: Chapman & Hall;: p. 445–483.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. and Petrini, O. (2000), “Endophytic fungi associated with palms”, *Mycological Research*, Vol. 104, Hal. 1202-1212.
- Gandjar, I., R. A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari dan I. Santoso. (1999), “*Pengenalan Kapang Tropik Umum*”, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gardes, M., and T. D. Bruns. (1993), “ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts”, *Molecular Ecology*, Vol. 2, Hal. 113-118.

- Ghosh, S. K., Pal, S., & Ray, S. (2013), "Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics", *Environmental Science and Pollution Research International*, Vol. 20(7), Hal. 4339-55.
- Gowariker VR, Viswanathan NV, Sreedhar. (2000), "Polymer science ; page 263-290", New Age International (P) Limited Publishers, New Delhi, India
- Gupta, P. U., and Shrivastava, R. (2011). Lipase Catalyzed Transesterification Of Vegetable Oil by Lipolytic Bacteria. *Research Journal of Microbiology*. Vol 6; page 81-288.
- Hamilton JD, Reinert KH, Hogan JV, Lord WV. (1995). Polymers as solid waste in municipal landfills. *Journal Air Waste Management Association*. Vol 4, Hal 247–251.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, et al. (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*. Vol 25: Hal 38–47.
- Hosseini S, Salari M, Jamalizadeh E, Khezripoor S, Seifi M., (2010), "Inhibition of Mild Steel Corrosion in Sulfuric Acid by Some Newly Synthesized Organic Compounds", *Material Chemistry Physics*, Vol. 119, Hal. 100–105.
- Ilyas, M., (2007), "Isolasi dan Identifikasi Mikoflora Kapang pada Sampel Serasah Daun Tumbuhan di Kawasan Gunung Lawu, Surakarta, Jawa Tengah", *Pusat Penelitian Biologi Bidang Mikrobiologi LIPI*, Cibinong
- Iwen, P. C., S. H. Hinrichs, and M. E. Rupp. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medicine Mycology*. 40:87–109.
- Izzo, A., Agbowo, J., Bruns, T.D., (2005). "Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest". *New Phytologist*, Vol. 166, Hal. 619–630.
- Jamila, Nurul (2014) *Studi Potensi Isolat Kapang Tanah Dalam Mendegradasi Polimer Plastik*. Undergraduate Thesis, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Jamila, Nurul (2014), "Studi Potensi Isolat Kapang Tanah Dalam Mendegradasi Polimer Plastik", *Undergraduate thesis*, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Jang, Y. and Kim, J.-J. (2014). Diversity of wood inhabiting polyporoid and corticioid fungi in Odaesan National Park. Submitted (04-APR-2014) Division of Environmental Sciences & Ecological Engineering, Korea University, 5-1 Anam-dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-701, Korea

- Jeon, H.J., Kim, M.N., (2015). Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation. *International Biodegradation and Biodegradation* Vol 103, Hal 141-146.
- Kaseem M, Hamad K, Deri F (2012), "Thermoplastic starch blends: A review of recent works", *Polymer Science Serial A Chemistry Material Science*. Vol. 54, Hal. 165-176
- Kathiresan K., (2003), "Polyethene and plastic-degrading microbes in an Indian Mangrove Soil", *Revista de Biología Tropical*, Vol. 51 (3-4), Hal. 629-633.
- Kavanagh, K., (2011), "FUNGI: Biology and Application", Wiley Press, USA
- Kim Meju, Ji Yeun, Soo-Hwan Yeo, Sung Yeol Baek, and Hye Sun Choi. (2011). Molecular and Morphological Identification of Fungal Species Isolated from Bealmijang. *Journal Microbiology Biotechnology*. Vol 21(12), Hal 1270–1279
- Klamer, M., Roberts, M.S., Levine, L.H., Drake, B.G., Garland, J.L., (2002), "Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal restriction fragment length polymorphism analysis", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 68, Hal. 4370–4376.
- Knezevic A., Ivan Milovanovic, Mirjana Stajic, Jelena Vukojevic (2013). Potential of *Trametes* species to degrade lignin. *International Biodegradation and Biodegradation*. Vol 85, Hal 52-56
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., Lemaire, J., (2006), "Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives", *Polymer Degradation Stability*, Vol. 91, Hal. 1495-1503.
- Kristanto, P. (2002). "Ekologi Industri". Penerbit Yudhistira. Jakarta
- Kumar S, Das, PM, Rebecca L J, Sharmila S. (2013). Isolation and identification of LDPE degrading fungi from municipal solid waste. *Journal Chemical Pharmateucal Research*. Vol 5(3): Hal 78-81.
- Kumar, S., Hatha, A.A.M. and Christi, K.S. (2007), "Diversity And Effectiveness of Tropical Mangrove Soil Micro Flora on the Degradation of Polythene Carry Bags." *Revista de Biología Tropical*, Vol. 55 (3-4), Hal. 777-786.
- Kurtzman, C.P. P.A. Blanz. (1998), "Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationship" In *The Yeasts – a Taxonomic Study*, 4th revised edn, pp. 69–74. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell, Elsevier, Amsterdam
- Kuswytasari, N. D., Shovitri, M., and Andriyadi, R. D. 2011. *Soil Molds Diversity in The Coastal Wonorejo Surabaya*. Proceeding International Conference on mathematics and Science (ICOMS). Surabaya

- Lafontaine, D. L. J. Tollervey, D., (2001), "The function and synthesis of ribosomes", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 2, (7), Hal. 514-520
- Lapmak,K. and Sardsud,U.(2009). Submitted (08-MAY-2009)Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, 239 Huay Kaew Road, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
- Larone, D. (2002). *"Medically Important Fungi: A Guide to Identification.* Ed. (4)", ASM Press, Washington DC.
- Leja, K. and G. Lewandowicz. (2010), "Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review", *Polish Journal of Environment Study*, Vol. 19(2), Hal. 255-266.
- Lien,N.T.H., Thao,P.T.H., Son,D.V. and Hieu,N.V. (2009).Submitted (29-MAR-2017) Soil Microbiology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi, Viet Nam
- Liu, Huan, Xu J., Liang R., Jianhua Liu. 2015. Characterization of the Medium- and Long-Chain n- Alkanes Degrading Pseudomonas aeruginosa Strain SJTD-1 and Its Alkane Hydroxylase Genes . *PLoS ONE*. Vol9(8): e105506.
- Liu, J., Yu, Y., Cai, Z. (2015), "Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE", *World Journal Microbiology and Biotechnology*. Vol 31, Hal. 1387-1395.
- Liyoshi, Y., Y. Tsutsumi, and T. Nishida, (1998), "Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase", *Journal of Wood Science*, Vol. 44, Hal. 222-229.
- Lotfy,W.A., Alkersh,B.M., Ghozlan,H.A. and Sabry,S.A.(2017). submitted (26-DEC-2017) Microbiology, Pharos University, Canal El Mahmoudia Street, Alexandria 21646, Egypt
- Machado,S.E.F., Lima,G.M.S. and Alves,H.S. (2017). Submitted (10-DEC-2017) Departamento de Antibioticos, Universidade Federal de Pernambuco, Carlos Pereira Falcao, 826/2701, Recife, Pernambuco 51021-350, Brazil
- Malcolm P. Stevens (2001) *"Polymer Chemistry: An Introduction"* 2nd edition, Oxford university press, New York.
- Manzur, A., Limón-González, M., Favela-Torres, E., (2004), "Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi". *Journal Applied Polymer Science*, Vol. 92, Hal 265-271.
- Martin KJ, Rygiewicz PT., (2005), "Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts", *BMC Microbiology*, Vol. 5, Hal. 28-39.
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemical* Vol 60: Hal 561-565.

- Mishra Shweta , S.N. Singh. (2012), "Microbial degradation of *n*-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes". *Bioresource Technology*. Vol. 111, Hal. 148–154.
- Mohee, R., Unmar GD, Mudhoo A, Khadoo P., (2008), "Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions", *Waste Management*, Vol. 28(9), Hal. 1624–1629.
- Motta O, Proto A, Carlo F.D, Caro F.D, Santoro E, Brunetti L, Capunzo M., (2009). "Utilization of Chemically Oxidized Polystyrene as Co-substrate by Filamentous Fungi", *International Journal Hygienic Environment Health*, Vol. 212, Hal. 61-66.
- Nathania, T. R., Kuswytasati N. D. (2013), "Studi Potensi Isolat Kapang Wonorejo Surabaya dalam Mendegradasi Polimer Bioplastik Poly Hydroxy Butyrate (PHB)", *Jurnal Sains Dan Seni Pomits ITS*, Vol. 2 (2), Hal. 2337-2352.
- Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Srivastava, A., Khatua, P., Rai, V. & Bose S..(2016). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports* Vol 7: page 395-415.
- Okoh E. B.and Atuanya E. I., (2014), "Impacts of soil composting and poultry manure on biodegradation of polyethylene", *International Journal Applied Microbiology and Biotechnology Research*, Vol. 2, Hal. 18-29
- PerkinElmer . (2015). Identity Verification and Quality Testing of Polymers Using Mid Infrared Spectroscopy
- Pitt, J. I. and A. D. Hocking. (2009), "*Fungi and Food Spoilage*", Springer Science + Business Media, New York.
- Pramila, R. and Ramesh, K.V. (2011), "Biodegradation of Low Density polyethylene (LDPE) by Fungi Isolated from Municipal Landfill Area", *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, Vol. 1(4), Hal. 131-136.
- Premraj, R and Mukesh Doble. (2005). "Biodegradation of polymers". *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 4, Hal. 186-193.
- Raaman N., N. Rajitha, A. Jayshree and R. Jegadeesh. (2012). Biodegradation of plastic by Aspergillus spp. isolated from polythene polluted sites around Chennai. *Journal Academia Industrial Research*. Vol. 1(6) November 2012
- Rathnan, R.K., Nair, P., and Balasaravanan, T. (2012). "Isolation, Identification and Characterization of Efficient Cellulolytic Fungi from Natural Resources." *International Journal Microbial Resource Technology*, Vol. 1(4), Hal. 379-387.
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environment Microbiology*. Vol 11, Hal 2477-2490.

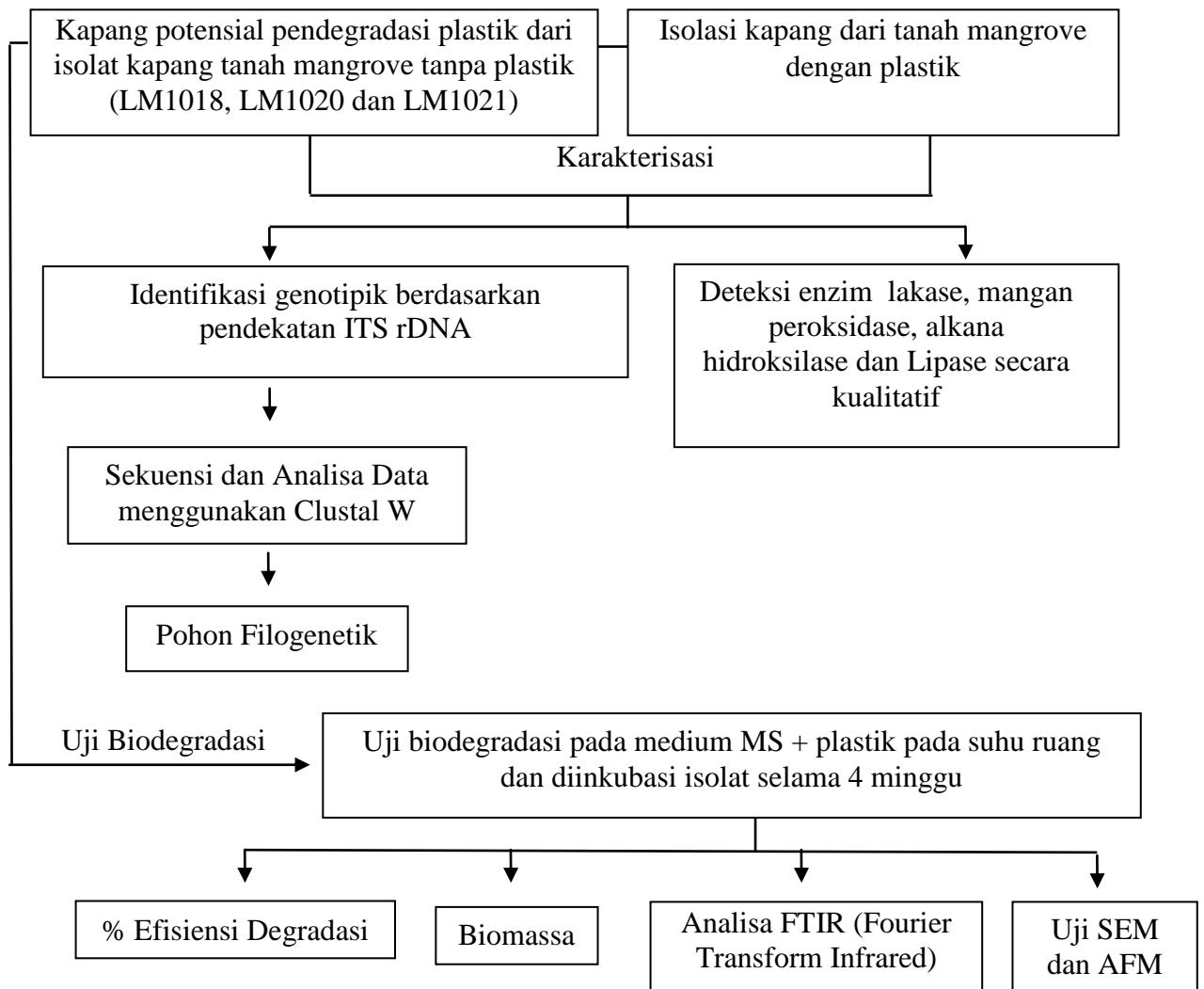
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., *Molecular Biology and Evolution*, Volume 4, Issue 4, Pages 406–425,
- Sanjaya, I.G dan Puspita, T. (2013), “*Pengaruh Penambahan Kitosan dan Plasticizer Gliserol Pada Karakteristik Plastik Biodegradable dari Pati Limbah Kulit Singkong*”. Laboratorium Pengolahan Limbah Industri. Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya
- Sari, Ni Ketut. (2010). “*Analisa instrumentasi*”. Edisi pertama-Klaten: Yayasan Humaniora
- Schwarz P., Bretagne S., Jean-Charles G., Garcia-Hermoso D., Olivier L., Franc oise D and Dannaoui E. (2006). Molecular Identification of Zygomycetes from Culture and Experimentally Infected Tissues. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 44, hal. 340–349
- Sean A. James, Lydia C. Powell and Chris J. Wright. (2016). Chapter 6 : Atomic Force Microscopy of Biofilms—Imaging, Interactions: "*Microbial Biofilms - Importance and Applications*", ISBN 978-953-51-2436-8
- Shah, F. Hasan, A. Hameed and S. Ahmed. (2008). “Biological degradation of plastics: A comprehensive review”, *Biotechnology Advances*, Vol. 26, Hal. 246-265.
- Shimao,M., (2001). “Biodegradation of Plastics”. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 12, Hal. 242-247.
- Sierra Ana Pérez and Henricot Béatrice.(2002). Identification of fungal species beyond morphology. *Mycologist*, Volume 16, Part 2
- Singh, V., Dubey M. and Bhaduria S. (2012). Biodeterioration of Polyethylene High Density by Aspergillus Versicolor and *Aspergillus terreus*. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. Volume III, Issue I, January.
- Skariyachan, S., Megha, M., Kini, M. N., Mukund, K. M., Rizvi, A., & Vasist, K. (2015), “Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of bangalore, india”. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 187(1), Hal. 1-14.
- Skoog, D. A., Holler F. James, Timothy A Nieman. 1998. Principle of Intrumental Analysis. Australia : *Brooks/Cole*
- Smith, Brett. (2015). The Differences Between Atomic Force Microscopy and Scanning Electron Microscopy . www.azom.com ArticleID=11879
- Sowmya, H.V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G ,Thippeswamy, B. Krishnappa,M. (2015), “Polyethylene Degradation by Fungal Consortium”. *International Journal Enviromental Research.*, Vol 9(3), Hal. 823-830.

- Takamatsu, S. (1998), "PCR Application in Fungal Phylogeny", In : Bridge, P. D., Arora, D. K ., Reddy, C. A. And Elander, R. P. (eds) "*Application of PCR in Mycology* page 125-152", CAB International, Wallingford, UK.
- Talbot,J.J., Thompson,P., Vogelnest,L. and Barrs,V.R. (2017). Identification of pathogenic Aspergillus isolates from captive birds in Australia JOURNAL Med. Mycol. (2017) In press PUBMED 29228225
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology Evolution.Vol 30(12): hal 2725–2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Ursa, K., Jozefa F., and Andrej K. (2003), "Polyamide – 6 Fibre Degradation by Lignolytic Fungus". *Polymer Degradation and Stability Journal*, Vol. 97, Hal. 99-104.
- Van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., (2007), "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation", *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol.74, Hal.13–21.
- Van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., Witholt, B., (2003), "Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment", *Oil Gas Science Technology*, Vol. 58, Hal. 427– 440.
- Vantamuri AB, Kaliwal BB. (2015). Isolation, screening and identification of Laccase producing fungi. International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences Vol 6(3): Hal 242-250.
- Vasile C. (1993), "*Degradation and decomposition* , In *handbook of polyolefins synthesis and properties*", Marcel Dekker Inc., New York
- Vasina V., Konstantin V. Moiseenko, Tatiana V. Fedorova, Tatiana V. Tyazhelova (2017). Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta*. Absolute expression quantification of full multigene family Daria. *PLoS ONE* Vol 12(3): e0173813
- Vona IA, Costanza JR, Cantor HA, Roberts WJ. (1965). "*Manufacture of Plastics*, vol. 1", Wiley, New York.
- Wang,M. and Liu,Q.(2014). Isolation and identification of endophytic fungi in tobacco. Submitted (25-JUL-2014) Plant Pathology Lab., Guizhou Academy of Tobacco Science, Yuntan Bei Road, Jinyang, Guiyang, Guizhou 550081,China
- Wardhana A.W. 1999; 2004. "*Dampak Pencemaran Lingkungan*". Yogyakarta: Penerbit Andi. Hal: 459.

- Watanabe, T. (2002), “*Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* 2nd ed”, CRC Press LLC., Florida.
- Webb JS, Nixon M, Eastwood IM, Greenhalgh M, Robson GD, Handley PS. (2000), “Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride”, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 66, Hal. 3194–3200.
- Wu Qiong, Li Yaqian, Li Y, Gao S., Wang M., Zhang T., Chen J. (2013). Identification of a Novel Fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and Characterization of Its Xylanolytic Enzymes. *Plos ONE* Vol 8 issue 9 e 73729
- Yüksel Orhan,^a Jasna Hrenović,^b and Hanife Büyükgüngöra. (2004). “Biodegradation of plastic compost bags under controlled soil conditions”. *Acta Chimica Slovenica*. Vol. 51. Hal. 579–588.
- Zafar, Urooj. Ashley Houlden, Geoffrey D. Robson. (2013), “Fungal Communities Associated with the Biodegradation of Polyester Polyurethane Buried under Compost at Different Temperatures”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 23, Hal. 7313 – 7324.
- Zahra S., Abbas S. S., Mohammad-Taheri Mahsa, Nosrati Mohsen. (2010). Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management*. Vol 30, Hal 396–401
- Zheng Ying and Ernest K. Yanful. (2005), ”A Review of Plastic Waste Biodegradation”, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 25, Hal. 243-250.

Lampiran 1

SKEMA KERJA



Lampiran 2

KOMPOSISI MEDIUM

Medium / Larutan	Bahan	Jumlah
PDA (Potato Dextrose Agar)	Kentang	200 gr
	Dextrosa	20 gr
	Agar	20 gr
	Aquades	1 liter
MSM (Mineral Salt Medium)	K2HPO4	1 gr
	KH2PO4	0.2 gr
	NaCl	1.0 gr
	CaCl2 · 2H2O	0.002 gr
	Boric acid	0.005 gr
	NH4SO4	1.0 gr
	MgSO4 · 7H2O	0.5 gr
	CuSO4	0.001 gr
	ZnSO4 · 7H2O	0.01 gr
	MnSO4	0.001 gr
Buffer 10x TBE (Tris-Borate-EDTA)	FeSO4 · 7H2O	0.01 gr
	89 mM Tris	-
	89 mM Boric acid	-
Buffer MES 10 mM	2 mM EDTA	-
	MES (free acid)	97,6 gr
	ddH2O	800 ml

Lampiran 3

Sekuen Isolat Kapang Tanah Mangrove Wonorejo

	TGTGTTCTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTCTTATTGCGGATAA CGCAACTATACAACACTTCAGCAACGGATCTTGCGCTCTGCATCGATGA AGAACCGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCACTGAATC ATCGAATCTTGAACGCACCTGCGCTCCTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT GTTGAGTCTCATGGAATTCTCAAGCTTACAGTTGTTACTGCAAGCTGGA CTTGGAGGTCGTGTCGGCTCTCGCGACTCGACTCCTCTGAAATGCATTAGT CGGACGTTACCGGTGCGCTTCAGCGTATAATTATCTGCGCTGCCGTCGACTG GTATGTGAAGTACCGCCTCTAACCGCCTCACGGGACAATACGTTGAAAC TCTGAGCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAACGATAT ATTAACCTTCAAATCAGGGTGCCTCGCGCCCCCGAGGGAGCGGAAACAATC CTGGGGAGGTTGCGGGGCTTCGGACCCCCCTAACGCACGCACTGCCA TCCTTACTTACGAGCACCTCTGTTCTCCCTCGCGGGGCAACCTGCCGTTG GAACCGAATAAACTCTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCCGAAACAAACAA TCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAAGATTCACTGAATCATCGAAT CTTGAAACGACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGTGGGATGCCCTGTCAG CGTCATCTACACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTTGGCGTCTGCCCTCGC CGCGTGGACTCGCCCCAAATTCAATTGGCAGCGGTCTGCCTCTCGC AGCACATTGCGCTCTCGAGGGGCTACGGCTCGCTCCAACAAGCACATT CCGTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAACG AGGGCCCTGGGTCCAACCTCCCACCGTGTCTACGTAACCTGTTGCTCG GCGGGCCC GCCGTTCGACGCCGCCGGGAGGGCTTGCGCCCGGGCCCG CGCCCGCCGAAGACCCAAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAG TTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCAACAAACGGATCTCTGGTCCGGCA TCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGATTCA GTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG CATGCCCTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTTGGC CCCCGTCCCCCTCTCCGGGGACGGGCCAAAGGCAGCGGCCACC GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCGGCG GCGCCAGCCGAC TGC GGAGGGATCATTATAGAGTTCTACTCTCAACCCCTGTGAACCTAC TTATCCTCCGGCGGAACGCCCGGTGCCTCGGGGCCAGGCGCCCG CGGGGACCAAACAAACTGTATTGCTCCTGTATACCTCAGAAATTGGCGTA AAGCCGAAATGTAACAACCTTGTACAATGGATCTCTGGCACTGGCATCGAT GAAGAACGCGAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGAGCACAGTGAAT CATCGAATCTTGAACGCACATGGGCCGCCGGTAATCCGGGGCATGCC TGTCCGAGCGTCATTCAACCCCTCAGAACCCCTCTCGGGAGGGCGTTACT GGTGTGGGAACGAGCGCCCCCGCGCGCCGTCCCTAAATCTATTGGC GGCTCCGGAGTCTGCTCCCTCGTAGTATTGCATCTCGTTT
PF3	
S2	
S3	

Lampiran 4

Hasil Uji Biodegradasi

Kode	Minggu ke 4					
	Δ.LDPE (mg)	%DE LDPE	Δ.P Putih (mg)	%DE PP	Biomassa	pH.
Kontrol.1	0,1	2,6	0,1	1,6	9,5	7
Kontrol.2	0,1	2,6	0,1	1,6	7,7	7
Kontrol.3	0,1	2,5	0,1	1,7	6,5	7
LM1018.1	0,4	10,8	0,2	3,4	45,7	6
LM1018.2	0,3	7,7	0,3	5,2	47,2	6
LM1018.3	0,5	13,2	0,1	1,7	40,5	7
LM1020.1	0,3	8,1	0,2	3,4	26,6	5
LM1020.2	0,3	7,9	0,1	1,7	20,1	6
LM1020.3	0,3	7,9	0,3	5,2	22,8	5
LM1021.1	0,4	10,5	0,3	4,8	60,2	6
LM1021.2	0,5	13,9	0,3	4,9	51,9	6
LM1021.3	0,5	13,2	0,3	5,2	52,6	7

Lampiran 5

Hasil Analisa Data

Metode ANOVA One-way: % ED LDPE versus Kode

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Kode	4	1; 2; 3; 4

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Kode	3	167,65	55,882	20,96	0,000
Error	8	21,33	2,666		
Total	11	188,98			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,63287	88,71%	84,48%	74,60%
Dunnett Multiple Comparisons with a Control			
Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence			

Kode	N	Mean	Grouping
1 (control)	3	2,5652	A
4	3	12,52	
2	3	10,55	
3	3	7,9659	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.

Metode ANOVA One-way: %ED Plastik putih versus Kode

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Kode	4	1; 2; 3; 4

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Kode	3	16,73	5,575	3,67	0,063
Error	8	12,16	1,521		
Total	11	28,89			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,23312	57,89%	42,10%	5,26%

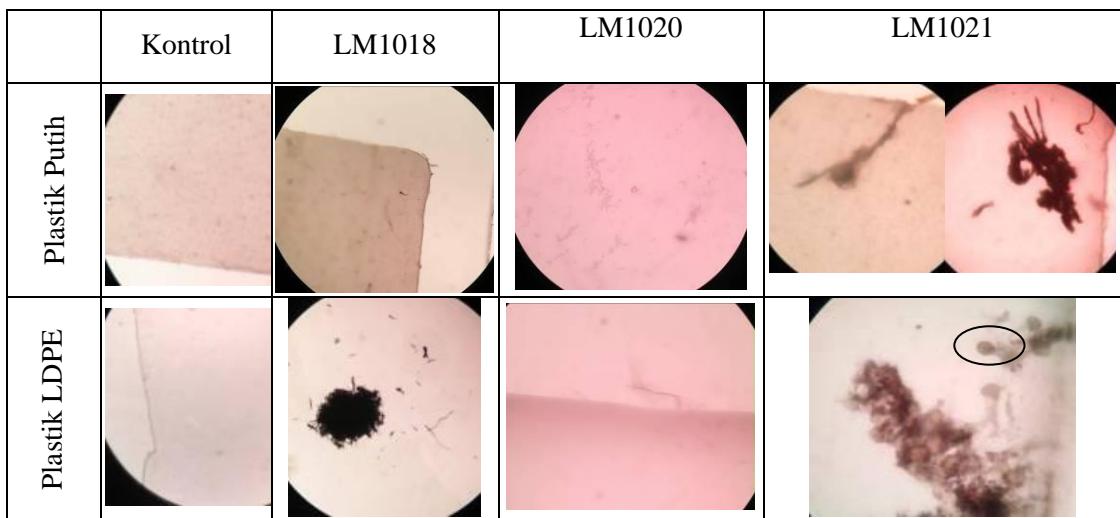
Dunnett Multiple Comparisons with a Control Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

Kode	N	Mean	Grouping
1 (control)	3	1,6414	A
4	3	4,976	
3	3	3,43	A
2	3	3,429	A

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.

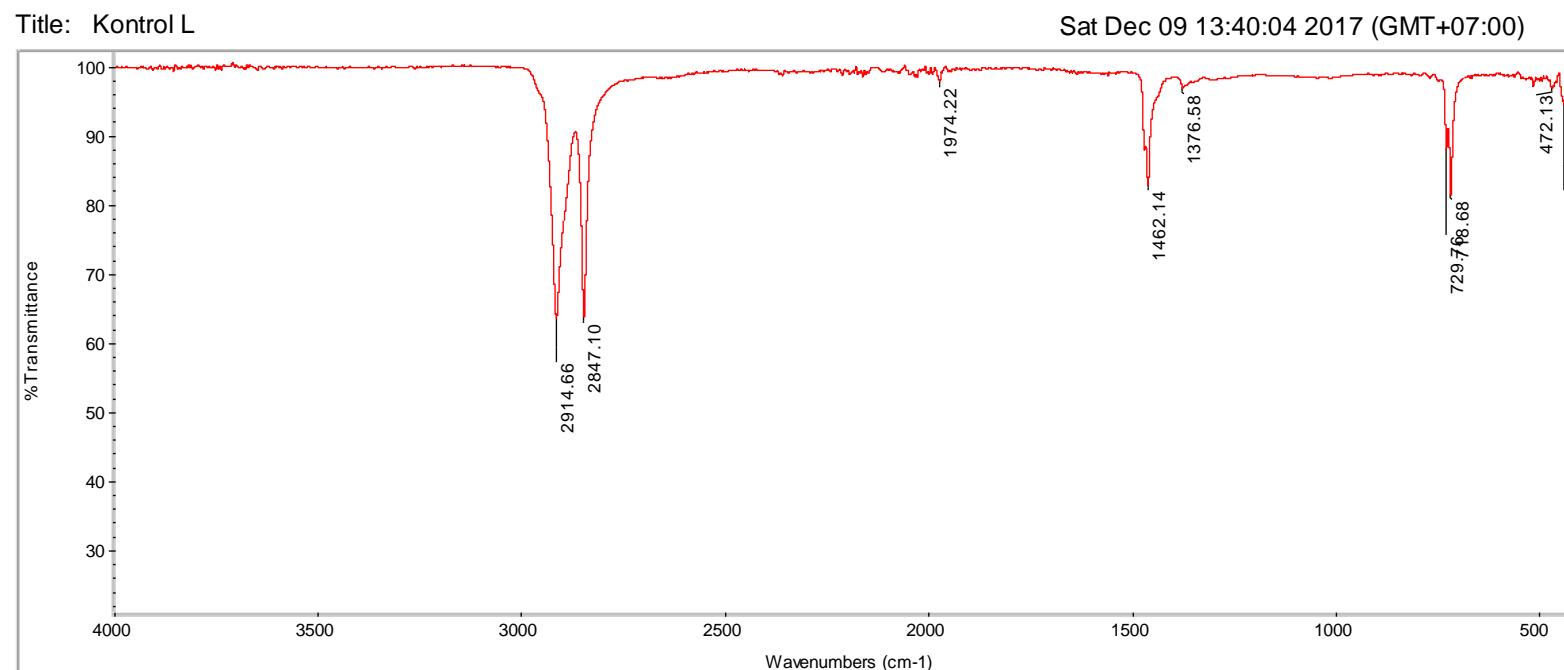
Lampiran 6

Penampakan Biofilm pada Permukaan Plastik



Lampiran 7

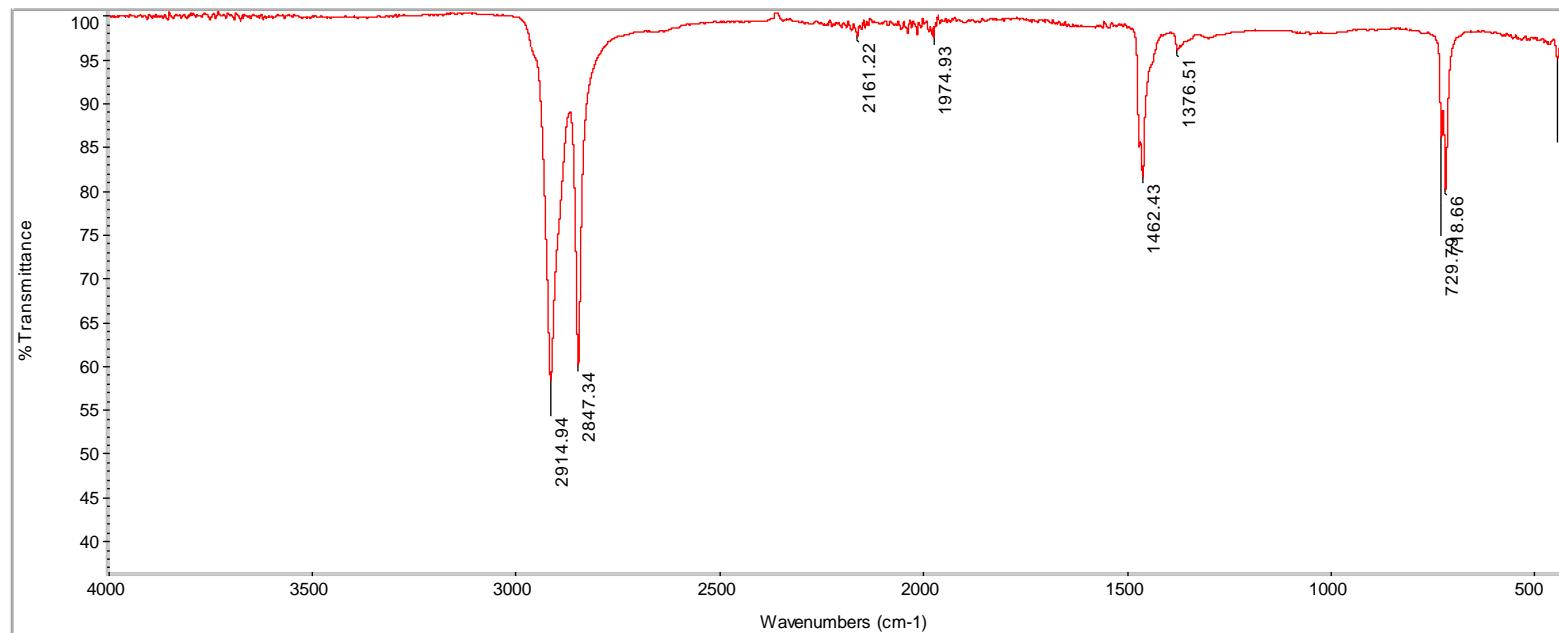
Hasil FTIR



Collection time: Sat Dec 09 13:38:28 2017 (GMT+07:00)	Spectrum: Kontrol L			
Sat Dec 09 13:39:42 2017 (GMT+07:00)	Region: 3495.26-455.13			
FIND PEAKS:	Search type: Correlation			
Spectrum: Kontrol L	Hit List:			
Region: 4000.00 - 400.00	Index	Match	Compound name	Library
Absolute threshold: 109.876	95	88.64	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
Sensitivity: 50	17868	87.91	Polyethylene, low density	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
Peak list:	625	87.91	polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
Position: 418.86 Intensity: 90.493	1	84.00	TRIACONTANE, 99%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
Position: 441.77 Intensity: 94.223	645	83.74	1-Triacanol, 96%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
Position: 472.13 Intensity: 96.688	31	82.33	Triacontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
Position: 718.68 Intensity: 81.315	768	82.27	NATURAL VEGETABLE WAX FROM MEXICAN SHRUE	HR Nicolet Sampler Library
Position: 729.76 Intensity: 87.966	35	81.88	Hexatriacontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
Position: 1376.58 Intensity: 96.689	33	81.73	Trihexacontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
Position: 1462.14 Intensity: 82.687	769	81.14	Natural vegetable wax from Brazilian palm trees	HR Nicolet Sampler Library
Position: 1974.22 Intensity: 97.726				
Position: 2847.10 Intensity: 63.500				
Position: 2914.66 Intensity: 63.359				

Title: 18.1.L

Sat Dec 09 13:25:32 2017 (GMT+07:00)



Collection time: Sat Dec 09 13:21:21 2017 (GMT+07:00)

Sat Dec 09 13:25:19 2017 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: 18.1.L

Region: 4000.00 400.00

Absolute threshold: 97.572

Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	419.14	Intensity:	90.655
Position:	444.38	Intensity:	95.018
Position:	718.66	Intensity:	80.046
Position:	729.79	Intensity:	85.934
Position:	1376.51	Intensity:	95.945
Position:	1462.43	Intensity:	81.424
Position:	1974.93	Intensity:	97.333
Position:	2161.22	Intensity:	97.513
Position:	2847.34	Intensity:	59.926
Position:	2914.94	Intensity:	58.173

Spectrum: 18.1.L

Region: 3495.26-455.13

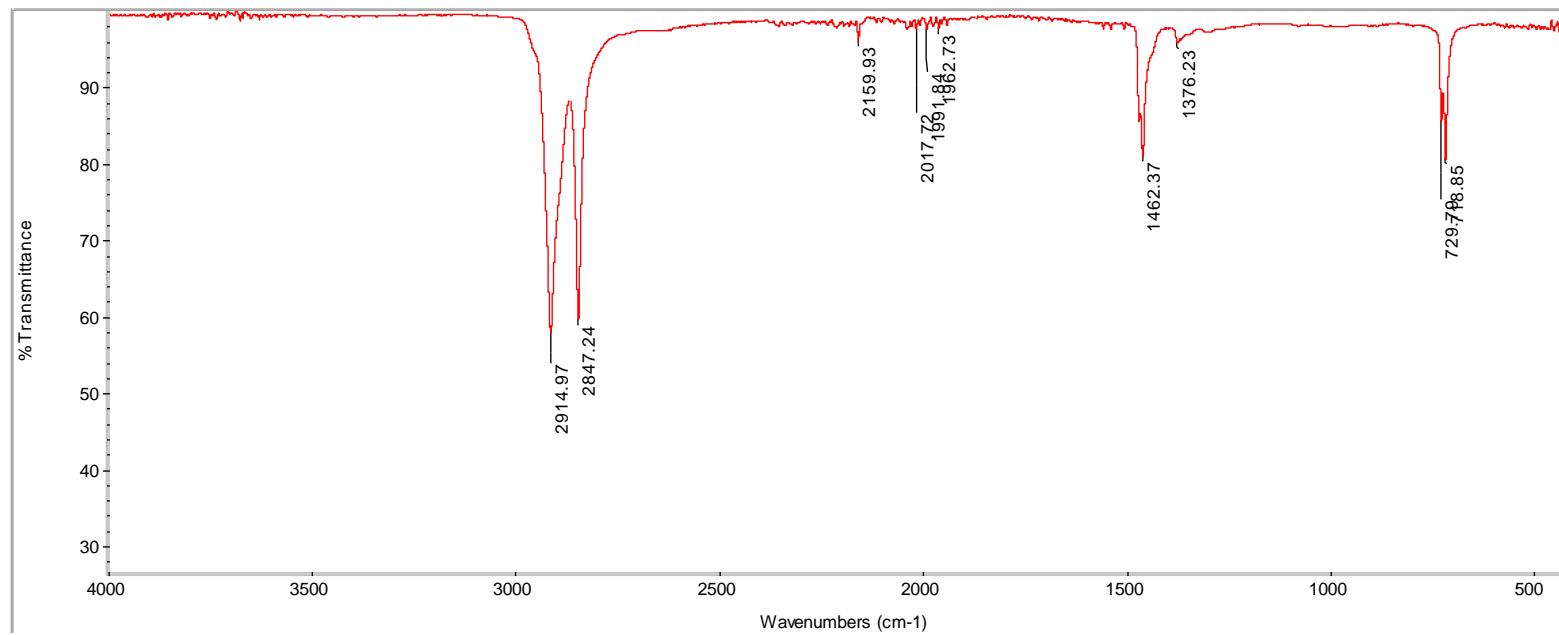
Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
95	90.83	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
625	90.07	Polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
17868	90.06	Polyethylene, low density	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
1	86.60	TRIACONTANE, 99%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
645	84.72	1-Triacanol, 96%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
768	84.18	NATURAL VEGETABLE WAX FROM MEXICAN SHRUE	HR Nicolet Sampler Library
35	84.07	Hexatriaccontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
31	84.03	Triaccontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
33	83.43	Tritriaccontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
769	83.09	Natural vegetable wax from Brazilian pal m trees	HR Nicolet Sampler Library

Title: 20.1.L

Sat Dec 09 13:19:24 2017 (GMT+07:00)



Collection time: Sat Dec 09 13:17:59 2017 (GMT+07:00)

Sat Dec 09 13:19:09 2017 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: 20.1.L
Region: 4000.00 400.00
Absolute threshold: 98.447
Sensitivity: 50
Peak list:
Position: 422.06 Intensity: 94.228
Position: 718.85 Intensity: 80.518
Position: 729.79 Intensity: 85.344
Position: 1376.23 Intensity: 95.696
Position: 1462.37 Intensity: 80.894
Position: 1962.73 Intensity: 97.672
Position: 1991.84 Intensity: 97.455
Position: 2017.72 Intensity: 97.582
Position: 2159.93 Intensity: 95.977
Position: 2847.24 Intensity: 59.490
Position: 2914.97 Intensity: 57.773

Spectrum: 20.1.L

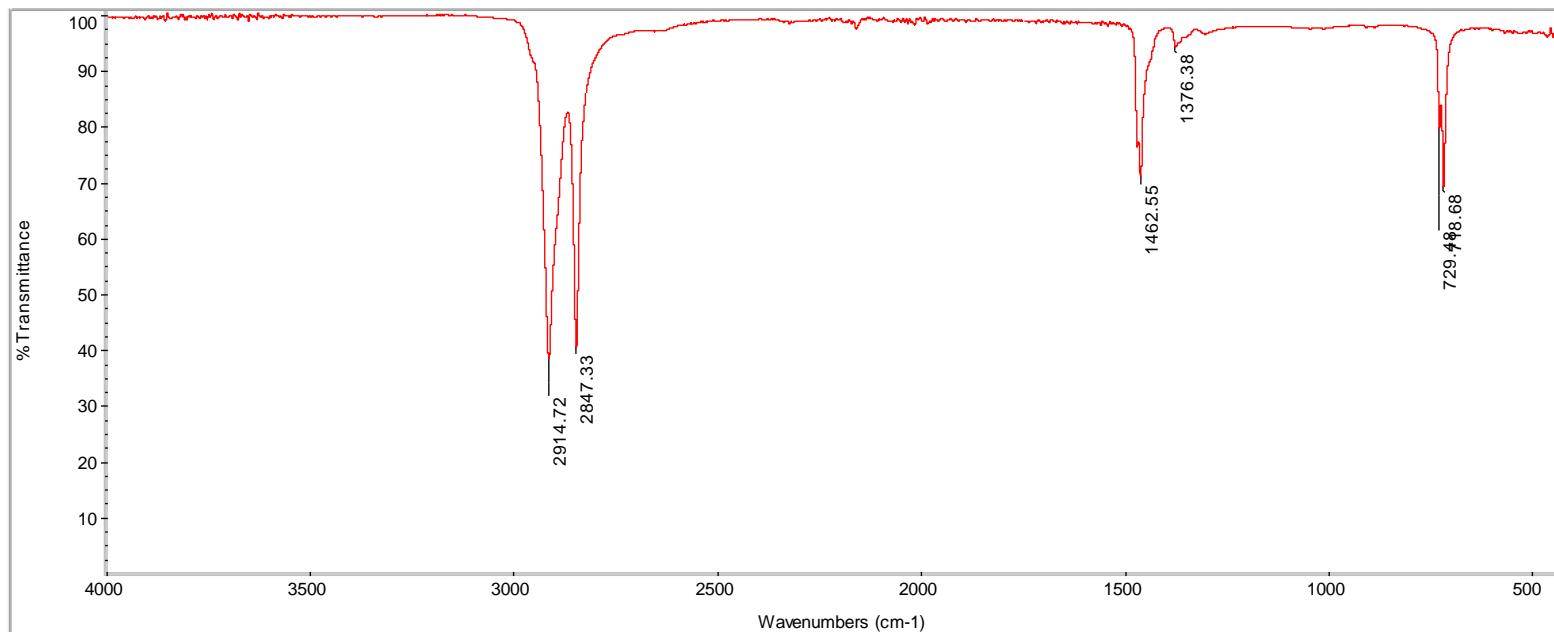
Region: 3495.26-455.13
Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
95	91.05	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
17868	89.81	Polyethylene, low density	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
625	89.78	polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
1	86.46	TRIACONTANE, 99%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
645	85.13	1-Triacontanol, 96%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
768	84.29	NATURAL VEGETABLE WAX FROM MEXICAN SHRUE	HR Nicolet Sampler Library
31	84.17	Triaccontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
35	84.13	Hexatriaccontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
33	83.63	Triteriacacontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
769	83.20	Natural vegetable wax from Brazilian pal m trees	HR Nicolet Sampler Library

Title: 1021.1.L

Wed Jan 10 10:56:32 2018 (GMT+07:00)



Collection time: Wed Jan 10 10:53:37 2018 (GMT+07

Wed Jan 10 10:56:19 2018 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: 1021.1.L

Region: 4000.00 400.00

Absolute threshold: 98.506

Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	413.16	Intensity:	96.107	1355
Position:	423.31	Intensity:	94.855	645
Position:	718.68	Intensity:	68.987	31
Position:	729.48	Intensity:	79.637	35
Position:	1376.38	Intensity:	94.103	33
Position:	1462.55	Intensity:	70.682	768
Position:	2847.33	Intensity:	40.126	
Position:	2914.72	Intensity:	38.119	

Spectrum: 1021.1.L

Region: 3495.26-455.13

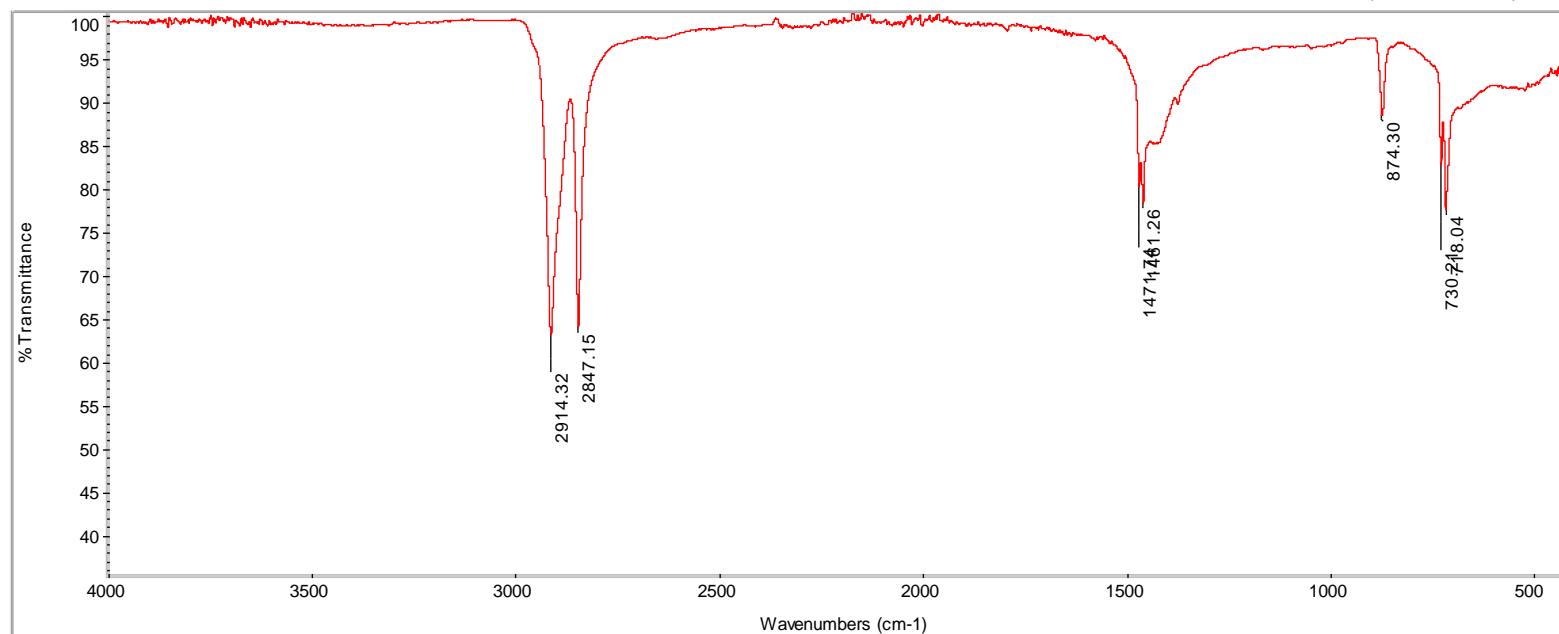
Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
17868	91.03	Polyethylene, low density	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
625	91.02	Polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
95	90.21	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
1	85.26	TRIACONTANE, 99%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
1355	84.71	Octadecanoic acid; Stearic acid	HR Hummel Polymer and Additives
645	84.32	1-Triacanol, 96%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
31	84.02	Triaccontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
35	83.88	Hexatriaccontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
33	83.84	Tritriaccontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
768	83.48	NATURAL VEGETABLE WAX FROM MEXICAN SHRUE	HR Nicolet Sampler Library

Title: Kontrol P

Sat Dec 09 13:36:37 2017 (GMT+07:00)



Collection time: Sat Dec 09 13:32:40 2017 (GMT+07:00)

Sat Dec 09 13:36:25 2017 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: Kontrol P

Region: 4000.00 400.00

Absolute threshold: 95.741

Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	433.42	Intensity:	92.597
Position:	718.04	Intensity:	77.537
Position:	730.21	Intensity:	82.648
Position:	874.30	Intensity:	88.387
Position:	1461.26	Intensity:	78.321
Position:	1471.74	Intensity:	80.117
Position:	2847.15	Intensity:	63.886
Position:	2914.32	Intensity:	63.065

Spectrum: Kontrol P

Region: 3495.26-455.13

Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name
95	85.41	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY
17868	85.06	Polyethylene, low density
625	85.04	Polyethylene
17906	82.02	Polyethylene, oxidized, high molecular w
eight		
604	82.01	oxidized polyethylene
645	80.45	1-Triacontanol, 96%
1	78.89	TRIACONTANE, 99%
33	78.87	Tritriaccontane, 98%
31	78.50	Triacontane, 99%
35	78.20	Hexatriaccontane, 98%

Library

Aldrich Condensed Phase Sample Library

HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

HR Nicolet Sampler Library

HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

HR Nicolet Sampler Library

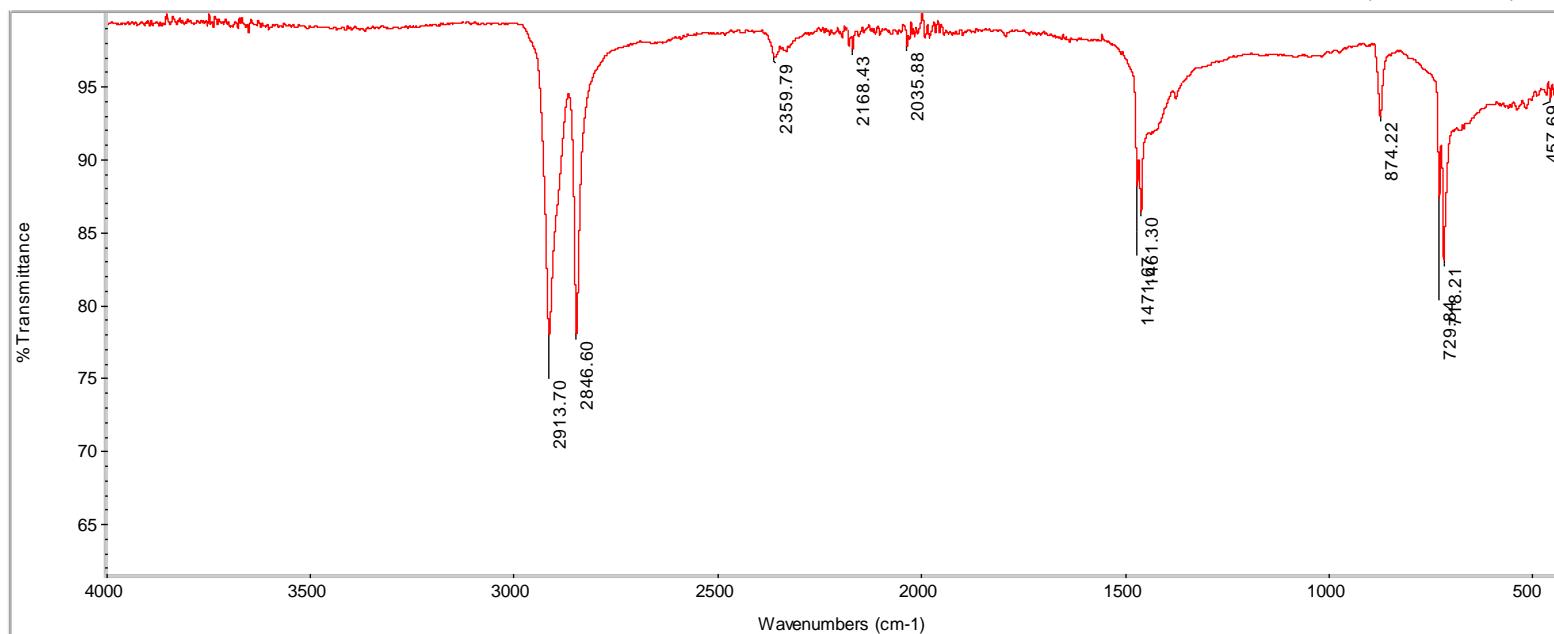
HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

Aldrich Condensed Phase Sample Library

HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

Title: Kontrol 21.1.P

Sat Dec 09 13:28:14 2017 (GMT+07:00)



Collection time: Sat Dec 09 13:27:30 2017 (GMT+07:00)

Sat Dec 09 13:28:02 2017 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: Kontrol 21.1.P

Region: 4000.00 - 400.00

Absolute threshold: 97.895

Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	421.19	Intensity:	94.446
Position:	432.62	Intensity:	95.172
Position:	457.69	Intensity:	94.088
Position:	718.21	Intensity:	82.980
Position:	729.84	Intensity:	87.230
Position:	874.22	Intensity:	92.869
Position:	1461.30	Intensity:	86.350
Position:	1471.67	Intensity:	88.085
Position:	2035.88	Intensity:	97.715
Position:	2168.43	Intensity:	97.509
Position:	2359.79	Intensity:	96.915
Position:	2846.60	Intensity:	77.930
Position:	2913.70	Intensity:	77.893

Spectrum: Kontrol 21.1.P

Region: 3495.26-455.13

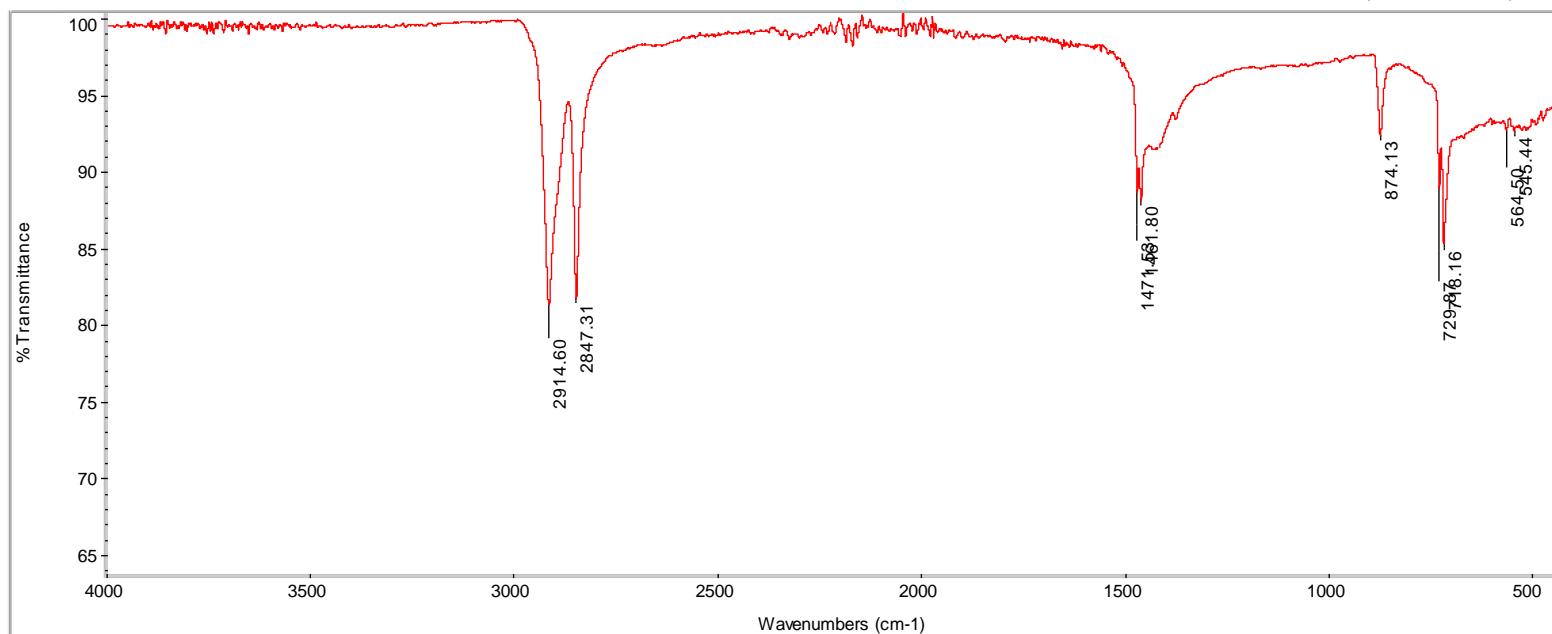
Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
17906	80.00	Polyethylene, oxidized, high molecular weight	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
604	79.98	oxidized polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
95	79.84	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
17868	77.67	Polyethylene, low density	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
625	77.67	polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
645	76.38	1-Triacontanol, 96%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
31	73.79	Triacontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
28	73.68	Heptacosane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
1	73.57	TRIACONTANE, 99%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
33	73.38	Tritriacontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

Title: LM1020.I.P

Thu Jan 18 08:34:29 2018 (GMT+07:00)



Collection time: Thu Jan 18 08:30:46 2018 (GMT+07:00)

Thu Jan 18 08:34:08 2018 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: LM1020.I.P
Region: 4000.00 400.00
Absolute threshold: 96.515
Sensitivity: 50
Peak list:
Position: 414.19 Intensity: 93.373
Position: 422.16 Intensity: 92.511
Position: 430.40 Intensity: 92.722
Position: 444.98 Intensity: 93.653
Position: 545.44 Intensity: 92.586
Position: 564.50 Intensity: 92.638
Position: 718.16 Intensity: 85.164
Position: 729.87 Intensity: 88.852
Position: 874.13 Intensity: 92.325
Position: 1461.80 Intensity: 88.071
Position: 1471.53 Intensity: 88.578
Position: 2847.31 Intensity: 81.659
Position: 2914.60 Intensity: 81.191

Spectrum: LM1020.I.P

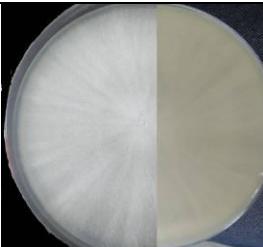
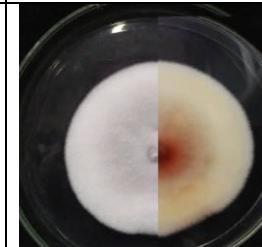
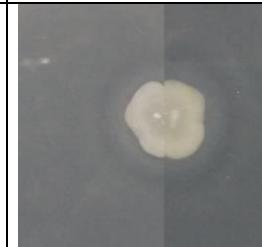
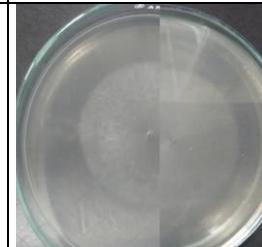
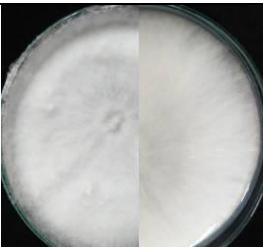
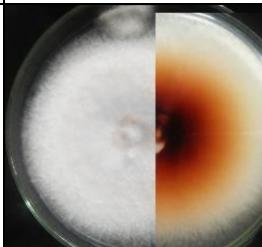
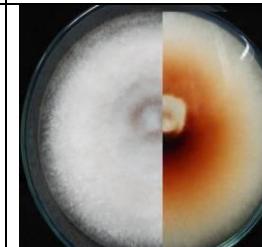
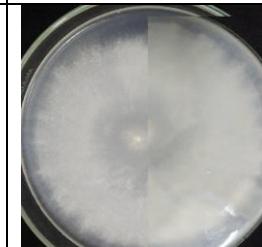
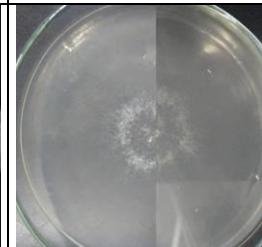
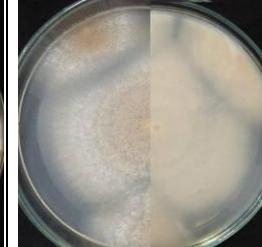
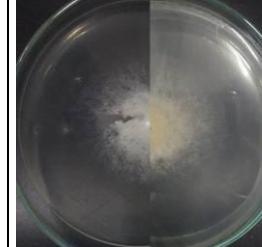
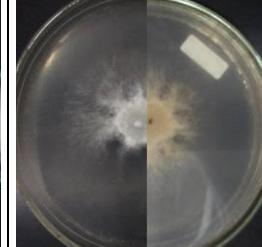
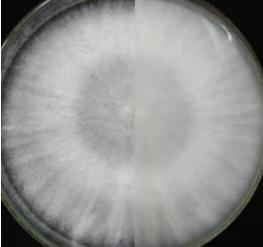
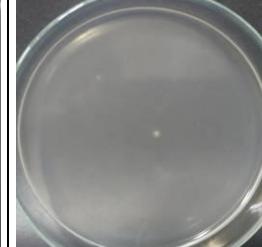
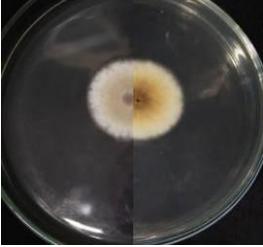
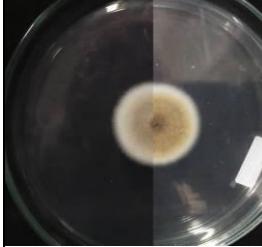
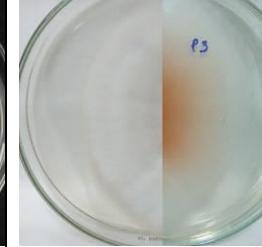
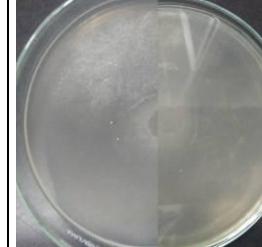
Region: 3495.26-455.13
Search type: Correlation

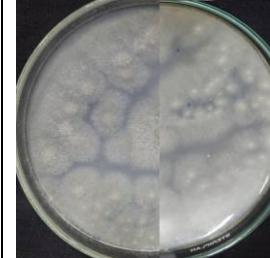
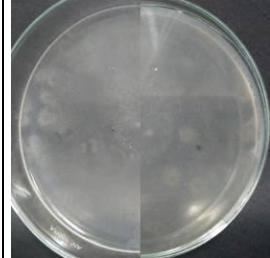
Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
95	83.22	POLY(ETHYLENE), LOW DENSITY	Aldrich Condensed Phase Sample Library
604	81.96	oxidized polyethylene	HR Nicolet Sampler Library
17906	81.95	Polyethylene, oxidized, high molecular w	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
eight			HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
17868	79.44	Polyethylene, low density	HR Nicolet Sampler Library
625	79.40	polyethylene	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
645	78.09	1-Triacontanol, 96%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
1	77.70	TRIACONTANE, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
31	76.13	Triacontane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
33	75.56	Tritriacontane, 98%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
28	75.21	Heptacosane, 99%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

Lampiran 8

Deteksi Enzim yang terlibat dalam Proses Biodegradasi

Kode Isolat	PDA	Laccase	Manganese Peroxidase	Lipase	Alkane Hydrolase
LM1018					
LM1020					
LM1021					
PF1					
PF2					
PF3					

S2					
S3					