

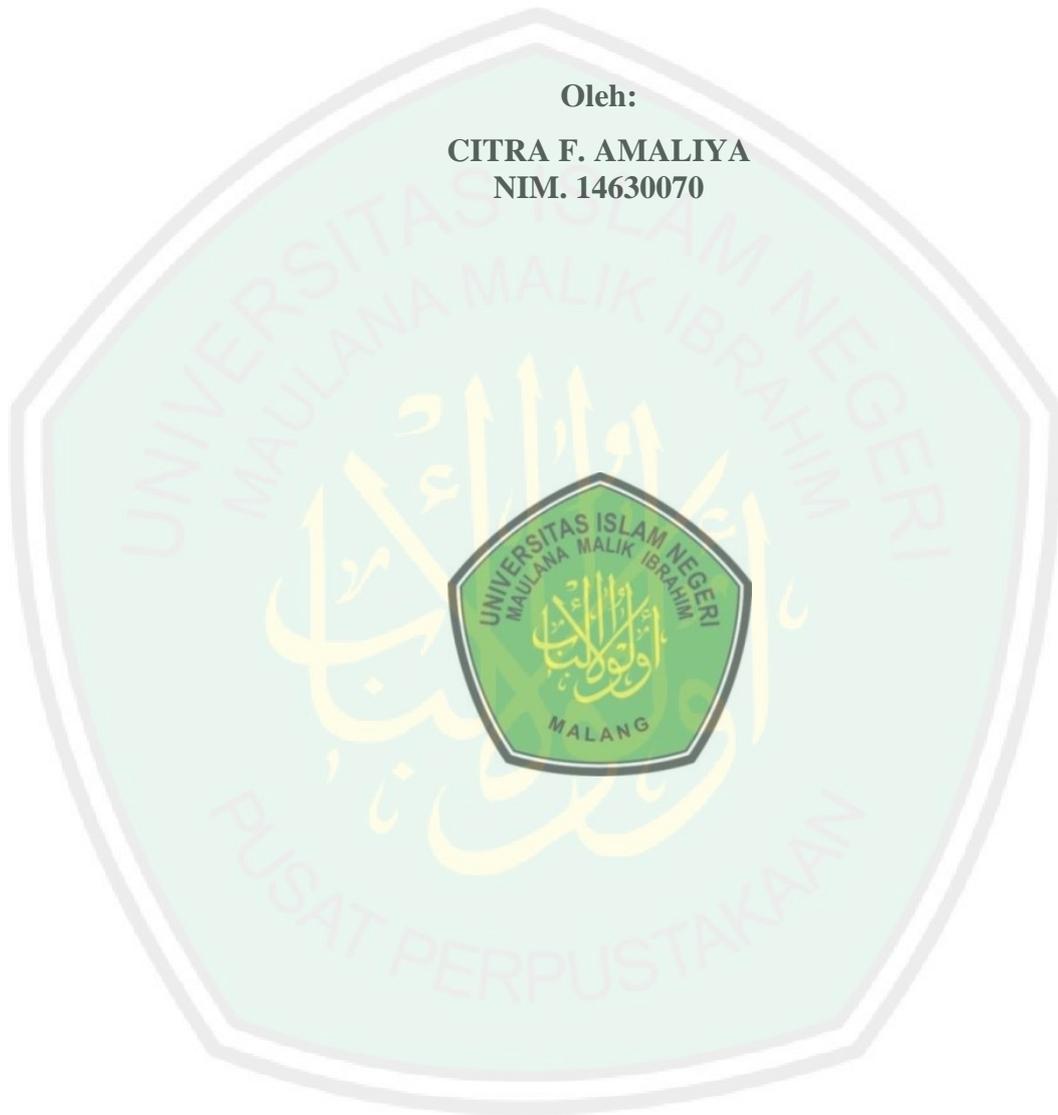
**UJI BIODEGRADASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR PENDEGRADASI  
PLASTIK LDPE SECARA GENOTIP MENGGUNAKAN GEN ITS rDNA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**CITRA F. AMALIYA**

**NIM. 14630070**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2019**

**UJI BIODEGRADASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR PENDEGRADASI  
PLASTIK LDPE SECARA GENOTIP MENGGUNAKAN GEN ITS rDNA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**CITRA F. AMALIYA**  
**NIM. 14630070**

**Diajukan Kepada:**  
**Fakultas Sains dan Teknologi**  
**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**  
**Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam**  
**Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**  
**MALANG**  
**2019**

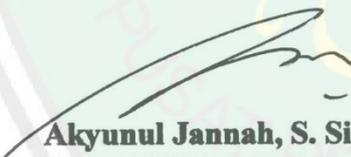
**UJI BIODEGRADASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR PENDEGRADASI  
PLASTIK LDPE SECARA GENOTIP MENGGUNAKAN GEN ITS rDNA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**CITRA F. AMALIYA**  
NIM. 14630070

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 10 Januari 2019

**Pembimbing I**

  
**Akyunul Jannah, S. Si, M.P**  
NIP. 19750410 200501 2 009

**Pembimbing II**

  
**Nur Aini, M.Si**  
NIDT. 19880711 20160801 2 067

**Mengetahui,**  
Jurusan Kimia



  
**Block Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620/200604 2 002

**UJI BIODEGRADASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR PENDEGRADASI  
PLASTIK LDPE SECARA GENOTIP MENGGUNAKAN GEN ITS rDNA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**CITRA F. AMALIYA**  
NIM. 14630070

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 10 Januari 2019

**Penguji Utama : Elok Kamilah Hayati, M.Si** (.....)  
NIP. 19790620 200604 2 002

**Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M.Si** (.....)  
NIDT. 19840608 20160801 2 070

**Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P** (.....)  
NIP. 19750410 200501 2 009

**Anggota Penguji : Nur Aini, M.Si** (.....)  
NIDT. 19880711 20160801 2 067

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia



**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620/200604 2 002

## PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Citra Firunika Amaliya  
NIM : 14630070  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Uji Biodegradasi dan Identifikasi Jamur Pendegradasi Plastik LDPE secara Genotip Menggunakan Gen ITS rDNA

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil penelitian saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima saksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 10 Januari 2019  
Yang Membuat Pernyataan,



Citra Firunika Amaliya  
NIM. 14630070

## HALAMAN PERSEMBAHAN

This is for Mum, Dad and You, brother

It will be one of a very few legacy that will remain

forever after I long gone, a promise fulfilled

Every parallel universe, all for you

사랑이 가득한, 엄마 딸



## KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah senantiasa penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala Rahmat dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Biodegradasi dan Identifikasi Jamur Pendegradasi LDPE secara Genotip menggunakan Gen ITS rDNA” tepat pada waktunya tanpa ada halangan yang berarti. Skripsi ini disusun berdasarkan apa yang telah penulis lakukan selama penelitian. Skripsi ini dapat tersusun dengan baik berkat bantuan dari pihak-pihak yang telah memberikan bimbingan dan dukungan dalam bentuk apapun. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Orang tua dan saudara yang senantiasa selalu melantunkan doa baik, nasihat, dan dukungan moral maupun material kepada penulis.
2. Ibu Akyunul Jannah, S.Si M.P, selaku dosen pembimbing yang telah mengarahkan dan memberikan masukan dalam penulisan skripsi.
3. Ibu Dewi Yuliani, M.Si, selaku dosen konsultan yang telah banyak memberikan kesempatan berdiskusi, koreksi, dan bimbingan selama penulisan skripsi.
4. Ibu Nur Aini, M.Si, selaku dosen pembimbing agama yang telah membantu penulisan integrasi sains dan islam dalam skripsi.
5. Teman-teman kelompok penelitian biokimia: Dian Faiz Alwyda, Shobihul Khair, Andriatul Masruro, Intan Novilia, Anggraini Pujasari, Fathia Rahmatul Azizah dan Ianatul Ummayah atas semangat, dukungan dan canda tawa setiap bertemu.

6. Teman-teman Jurusan Kimia terutama Kelas C Angkatan 2014 yang tengah mengarungi perjalanan serupa.
7. Semua pihak yang telah mendoakan dan membantu penulis dalam penyelesaian skripsi.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan kekeliruan dalam skripsi ini dan mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun agar dalam penulisan selanjutnya dapat lebih baik lagi. Akhirnya penulis mengucapkan terimakasih atas segala dukungan dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini.

Malang, 04 Januari 2018

Penyusun



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>المخض</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan .....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.4 Manfaat .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	
2.1 LDPE ( <i>Low Density Polyethylene</i> ) .....	6
2.2 Jamur Sebagai Agen Pendegradasi LDPE .....	7
2.3 Ekstraksi DNA dengan Metode CTAB.....	11
2.4 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa.....	13
2.5 Gen Pengkode ITS rDNA .....	14
2.6 Amplifikasi DNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	16
2.7 Penentuan Sekuen DNA dan Analisis Bioinformatika .....	22
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	
3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.2.1 Alat.....	21
3.2.2 Bahan` .....	21
3.3 Tahapan Penelitian .....	22
3.4 Cara Kerja .....	23
3.4.1 Pengambilan Sampel .....	23
3.4.2 Preparasi Sampel LDPE.....	23
3.4.3 Isolasi Jamur Pendegradasi LDPE .....	23
3.4.4 Uji Biodegradasi LDPE .....	24
3.4.5 Isolasi DNA dengan Metode CTAB .....	24
3.4.6 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa.....	25
3.4.7 Amplifikasi Gen ITS dengan PCR.....	25
3.4.8 Sikuensing DNA .....	26
3.4.9 Analisis Data .....	26

**BAB HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Isolasi Jamur Pendegradasi LDPE .....	27
4.2 Uji Biodegradasi LDPE secara Kuantitatif .....	29
4.3 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl .....	31
4.4 Amplifikasi Gen ITS menggunakan <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	34
4.5 Analisis Bioinformatik .....	36
4.6 DNA dalam Pandangan Islam .....	39

**BAB PENUTUP**

5.1 Kesimpulan .....	21
5.2 Saran.....	21

**DAFTAR PUSTAKA****LAMPIRAN**

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur umum polietilen berdensitas rendah (LDPE).....	7
Gambar 2.2 Proses biodegradasi LDPE oleh jamur.....	10
Gambar 2.3 Elektroforegram DNA hasil isolasi dengan metode CTAB.....	13
Gambar 2.4 Daerah ITS terdiri atas ITS1, 5,8S dan ITS2.....	15
Gambar 2.5 Sikuens daerah ITS rDNA dari <i>Colletotrichum</i> sp. ....	16
Gambar 2.6 Tahapan-tahapan pada proses PCR.....	17
Gambar 2.7 Visualisasi kromatogram hasil penentuan sekuen DNA.....	19
Gambar 2.8 Pohon filogenetik hasil rekonstruksi isolat R1 dengan MEGA6 ....	20
Gambar 3.1 Tahapan pada proses PCR (Vivantis DNA <i>Amplificatuon</i> Kit) .....	26
Gambar 4.1 Penampakan media kultur isolat HJL28 dan HJL29.....	29
Gambar 4.2 Penampakan isolat HJL28 pada MSM <i>broth</i> .....	30
Gambar 4.3 Purifikasi menggunakan pelarut organik dan presipitasi DNA.....	32
Gambar 4.4 Elektroforegram hasil isolasi DNA metode CTAB/NaCl.....	33
Gambar 4.5 Elektroforegram hasil PCR menggunakan primer ITS4/ITS5.....	35
Gambar 4.6 Elektroforegram hasil PCR dengan primer ITS1/ITS4.....	36
Gambar 4.7 Sekuen Gen ITS rDNA isolat HJL28 dengan panjang 426 bp.....	36
Gambar 4.8 Pohon filogenetik isolat HJL28 berdasarkan sekuen ITS rDNA ....	38

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis-jenis jamur dengan aktivitas degradasi LDPE paling tinggi.....	10
Tabel 2.2 Kemurnian DNA hasil isolasi dengan metode CTAB .....	11
Tabel 2.3 Berbagai macam primer universal untuk daerah ITS2 .....	17
Tabel 4.1 Suhu dan derajat keasaman (pH) sampel tanah .....	28
Tabel 4.2 Morfologi isolat jamur pendegradasi LDPE .....	29
Tabel 4.3 Hasil uji biodegradasi LDPE oleh isolat jamur HJL28.....	31
Tabel 4.4 Hasil uji kuantitatif isolat DNA hasil ekstraksi metode CTAB/NaCl	33
Tabel 4.5 Sekuen nukleotida pasangan primer ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4 .....	34
Tabel 4.6 Hasil analisis BLAST-n terhadap HJL28 .....	37
Tabel 4.7 Hasil perhitungan nilai <i>similarity</i> sekuen isolat HJL28 .....	38



## LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian .....	50
Lampiran 2. Diagram Alir.....	51
Lampiran 3. Pembuatan Reagen .....	55
Lampiran 4. Perhitungan Pembuatan Reagen .....	56
Lampiran 5. Kromatogram hasil sekuensing metode Sanger.....	58
Lampiran 6. Hasil <i>alignment</i> HJL28 dengan sekuen pembanding .....	60



## ABSTRAK

Amaliya, Citra Firunika. 2019. Uji Biodegradasi dan Identifikasi Jamur Pendegradasi LDPE secara Genotip Menggunakan Gen ITS rDNA. Pembimbing I: Akyunul Jannah, S. Si, M.P, Pembimbing II: Nur Aini, M. Si, dan Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si

---

Kantong plastik telah menjadi bagian yang tidak terpisahkan dari kehidupan masyarakat sehari-hari. Komposisi utama penyusun kantong plastik adalah salah satu jenis polimer etilen, yaitu *Low Density Polyethylene* (LDPE). Material ini diketahui memiliki ketahanan fisik yang tinggi dan sulit didegradasi di alam, sehingga berakhir mencemari lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan aktivitas degradasi jamur hasil isolasi dari tanah tempat pembuangan akhir (TPA) terhadap LDPE sebagai upaya untuk mengurangi jumlah sampah plastik LDPE di lingkungan.

Proses isolasi jamur dilakukan dalam media *mineral salt* (MSM) 1% glukosa dengan penambahan LDPE sebagai sumber karbon utama. Penentuan aktivitas degradasi isolat dilakukan setelah 40 hari masa inkubasi berdasarkan perhitungan *weight loss*. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode CTAB/NaCl (2%/1,5 M) yang dimodifikasi. Daerah ITS rDNA dipilih sebagai marker penanda untuk identifikasi molekuler dan diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memakai pasangan primer ITS1/ITS4. Penentuan sekuen ITS rDNA isolat jamur dilakukan dengan metode sekuensing Sanger. Program komputer digunakan untuk melakukan analisis kekerabatan berdasarkan kedekatan sekuen *query* dengan database.

Isolat HJL M4LK1 yang didapatkan melalui proses isolasi diketahui memiliki aktivitas biodegradasi LDPE  $13,33 \pm 0,9428\%$ . Ekstraksi DNA jamur dengan metode CTAB/NaCl menghasilkan isolat dengan rasio  $A_{260}/A_{280}$  sebesar 1,83. Amplifikasi gen ITS dengan metode PCR pada suhu *annealing*  $48^{\circ}\text{C}$  mendapatkan DNA ampikon berukuran  $\sim 500$  bp. Penentuan sekuen menggunakan metode dideoksi Sanger mendapatkan daerah ITS dengan panjang sekuen 426 bp. Urutan DNA hasil sekuensing *dicontig* dan dianalisis menggunakan program komputer. Beberapa *strain* jamur hasil analisis dipilih dan dibuat pohon filogenetik. Berdasarkan analisis kekerabatan diketahui isolat HJL M4LK1 memiliki kedekatan genetik dengan *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17, dengan persen similariti sebesar 100%.

**Kata Kunci :** Jamur, biodegradasi LDPE, metode CTAB/NaCl, gen ITS rDNA, ITS1/ITS4, Sekuensing

## ABSTRACT

Amaliya, Citra Firunika. 2019. Isolation and Genotypic Identification of LDPE-Degrading Fungi Based on ITS rDNA Gene Sequence. Supervisor I: Akyunul Jannah, S. Si, M.P, Supervisor II: Nur Aini, M. Si, Consultant: Dewi Yuliani, M.Si

---

Plastic bag has been such an inseparable material of human daily life. This material is mainly comprised of a type of ethylene polymer termed as low density polyethylene (LDPE). This polymer is known to have high physical resilience and not readily degraded in nature, ended up polluting the environment. The aim of this study is to identify as well as determine the degradation activity of fungi isolated from local dumping area (TPA) against LDPE substrat as an attempt to decrease the amount of LDPE plastic waste in environment.

Isolation process was carried out in mineral salt medium (MSM) with 1% glucose concentration and supplemented with LDPE as the main carbon source. The LDPE-degradation rate of fungal isolate was determined based on weight loss calculation after 40 day incubation period. DNA extraction was performed using modified CTAB/NaCl method. ITS rDNA was selected as a marker for molecular identification. Amplification process was carried out using Polymerase Chain Reaction (PCR) at annealing temperature of 48°C with ITS1/ITS4 as primer. ITS sequence determination was conducted through Sanger sequencing method. Bioinformatic analysis was performed using computational programs to do species identification by comparing sequence in query with those on database.

Through isolation process, isolate HJL M4LK1 was obtained and noted to have LDPE degradation activity of  $13.33 \pm 0.9428\%$ . DNA extraction was carried out using CTAB/NaCl method with NaCl concentration of 1.5 M, yielding isolate of 1,83 purity based on  $A_{260}/A_{280}$  ratio value. The amplification process was yielding DNA amplicon about ~500 bp in size. The ITS sequence obtained has 426 bp in size.. Phylogenetic tree construction of HJL M4LK1 showed the isolate has 100% similarity to *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17.

**Keyword:** Fungi, LDPE Degradation, CTAB/NaCl method, ITS rDNA, Genotype Identification

## تجريد

عملية، جيترونيكا. ٦٠١٩. عزل و تحديد النمط الوراثي للفطريات المحولة لل لد ف اي على أساس جين اي ت س ر د ن ا. مشرفة الاولى : اعين اللجنة الماجستير، مشرفة الثانية : نور عيني الماجستير، ديوي يولييان الماجستير

لقد كانت الأيكاس البلاستيكية مادة لا تنفصل عن الحياة اليومية للإنسان. تتكون هذه المادة بشكل أساس من نوع بوليمر إيثيلين منخفض الكثافة. ومن المعروف أن هذا البوليمر لديه مرونة فيزيائية عالية ولا تتحلل بسهولة في الطبيعة، وينتهي به الأمر تلويث البيئة. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد نشاط تحلل الفطريات المعزولة من منطقة الأغراق المحلية ضد الطبقة التحتية من البولي إيثيلين المنخفض الكثافة في البيئة.

تم تنفيذ عملية العزل في وسط الأملاح المعدنية مع تركيز ١% من الجلوكوز واستكمالها مع لد ف اي كمصدر الكربون الرئيسي. تم تحديد معدل تدهور لد ف اي لعزل الفطريات على أساس حساب فقدان الوزن بعد فترة حضنة لمدة ٤٠ يوماً. تم إجراء استخراج الحمض النووي باستخدام طريقة ج ت ا ب/كلوريد الصوديوم المعدلة. تم اختيار اي ت س ر د ن ا كعلامة لتحديد الهوية الجزيئية. أجريت عملية التضخيم باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل عند درجة حرارة التلدين ٤٨ درجة مئوية مع ITS1/ITS4 كتمهيد. تم إجراء تحديد تسلسل اي ت س ر د ن ا من خلال طريقة تسلسل ساعير. تم إجراء تحليل المعلوماتية الحيوية باستخدام برامج حسابية للقيام بتحديد الأنواع بمقارنة التسلسل في الاستعلم مع تلك الموجودة على قاعدة البيانات.

من خلال عملية العزل، تم الحصول على عزل HJLMLK ولا حظت أن نشاط تحلل لد ف اي هو  $33,13 \pm 9,0$ %. إجراء السخراج الحمض النووي باستخدام طريقة ج ت ا ب/كلوريد مع تركيز كلوريد الصوديوم ٥,١ م، مما أسفر عن عزل ٨٣,١ نقاء على أسلس قيمة نسبة A<sub>٢٦٠</sub>/A<sub>٢٨٠</sub>. كانت عملية التضخيم تقطي د ن ا حوالي ٥٠٠ في الحجم. تسلسل اي ت س الذي تم الحصول عليه يتحوي على ٤٢٦ برمبل في الحجمز أظهر بناء شجرة الأنساب HJLMLK أن العزلة لديها تشابه ١٠٠% مع قسمة *Geotrichum candidum* سلالة

KRR17

لكلمة الرئيسية: الفطريات، تدهور LDPE (لد ف اي)، طريقة ج ت ا ب/كلوريد، ITS rDNA، التعرف الجيني

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Polietilen (PE) merupakan material polimer yang paling banyak digunakan dalam berbagai sektor industri maupun domestik. Salah satu penggunaan polimer tersebut dalam kehidupan sehari-hari adalah sebagai material *packaging* kantong plastik. Umumnya, komponen utama penyusun kantong plastik adalah polietilen berkepadatan rendah atau yang lebih dikenal dengan *low density polyethylene* (LDPE). Pemilihan plastik LDPE ini didasarkan pada sifatnya yang fleksibel, mudah dibentuk, inert pada suhu ruang dan dapat dipanaskan hingga suhu 95°C tanpa mengalami kerusakan (Shah dkk., 2008; Esmaeili dkk., 2013).

Berdasarkan riset yang dilakukan oleh Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan (LHK) dan Greeneration Indonesia tahun 2016, diketahui bahwa setiap tahunnya masyarakat Indonesia mengkonsumsi sekitar 9,8 miliar lembar kantong plastik. Menurut *Environmental Protection Agency* (EPA) (2016), sekitar 1 triliun kantong plastik digunakan dan dibuang di seluruh dunia per tahun. Proses daur ulang hanya dapat mengembalikan 9% dari keseluruhan limbah plastik tersebut, sedangkan sisanya diproses dengan pengabuan (12%) dan penimbunan (79%) (Geyer dkk., 2017). Kombinasi dari ketahanan dan stabilitas LDPE yang tinggi serta konsumsi produk plastik dalam jumlah besar menjadikan polimer ini terakumulasi di lingkungan. Salah satu dampak pencemaran akibat akumulasi LDPE adalah turunnya kualitas tanah sehingga tidak dapat lagi dimanfaatkan

sebagai lahan pertanian. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Ar-Rum ayat 41.

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

*“Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia; Allah menghendaki agar mereka merasakan sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)”* (QS. Ar-Rum: Ayat 41).

Berdasarkan tafsir Al-Mu'tabar, Ar-Rum ayat 41 merupakan bentuk penegasan bahwa kerusakan yang terjadi di muka bumi tidak lain merupakan akibat dari perbuatan manusia sendiri. Hal ini dikarenakan aktivitas kehidupan manusia memberikan dampak langsung terhadap keadaan lingkungan sekitar. Pada ayat tersebut juga terkandung pesan tersirat tentang pentingnya menjaga dan melestarikan alam dalam rangka wujud ibadah kepada Allah SWT (Shihab 2003). Penanggulangan tingkat polusi akibat limbah merupakan bentuk usaha konservasi lingkungan oleh manusia sebagai khalifah di bumi, sehingga kondisi alam dapat berlangsung kembali seperti sedia kala.

Beberapa metode yang telah diterapkan untuk menanggulangi limbah plastik LDPE diantaranya melalui degradasi secara foto-oksidatif, thermal (Shing & Sharma, 2007), fotokatalitis (Ali dkk., 2016) dan biologis (Arutchelvi dkk., 2008). Namun, sebagian besar metode degradasi plastik tersebut tidak bisa diterapkan dalam skala besar karena tingginya biaya yang harus dikeluarkan dan polusi yang dihasilkan. Degradasi secara biologis lebih banyak dipilih untuk mengatasi limbah LDPE karena metode tersebut dinilai lebih aman, murah, dan ramah lingkungan.

Degradasi plastik secara biologis melibatkan mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memecahkan rantai panjang polimer LDPE menjadi

monomernya. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya mengenai biodegradasi LDPE menunjukkan bahwa dari berbagai macam mikroorganisme, jamur memiliki aktivitas biodegradasi LDPE paling tinggi (Sen & Raut, 2015; Pramilla & Ramesh, 2011). Beberapa jenis jamur yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi LDPE diantaranya dari golongan *Penicillium* sp. (Gajendiran dkk., 2015), *Chaetomium* sp. (Sowmya dkk., 2012) dan *Rhizopus* sp. (Sowmya dkk., 2014). Selain itu, spesies *Aspergillus* sp. yaitu *A. japonicas* dan *A. niger* serta golongan *Fusarium* sp. juga menunjukkan aktivitas degradasi LDPE yang cukup tinggi. Masing-masing jenis jamur tersebut mampu mendegradasi 11,11%, 5,8% dan  $\pm$  9% LDPE dalam satu bulan masa inkubasi (Raaman dkk., 2012; Merina, 2014).

Tahap awal dalam identifikasi jamur pendegradasi LDPE adalah ekstraksi DNA dari dalam sel. Proses isolasi DNA metode CTAB didasarkan pada penggunaan detergen kationik untuk merusak jaringan dan membran sel jamur agar DNA dapat terpisah dari komponen sel lainnya. Metode ini digunakan secara luas dalam proses ekstraksi sel jamur karena proses pengerjaannya sederhana dan hasil isolat DNA memiliki kemurnian yang tinggi serta membutuhkan biaya yang relatif lebih rendah dibanding metode kit komersial (Mourellos dkk., 2016). Metode CTAB dapat dimodifikasi lebih lanjut untuk memaksimalkan DNA yang dihasilkan, meminimalisir waktu ekstraksi, mengurangi penggunaan pelarut yang berlebihan dan memastikan kualitas DNA sesuai untuk analisis selanjutnya (Almakarem dkk., 2012).

Pada penelitian Umesha dkk. (2016) kemurnian isolat DNA yang dihasilkan dari metode CTAB berbeda untuk tiap-tiap isolat jamur dengan nilai rasio

$A_{260}/A_{280}$  berkisar antara 1,65-2,10. Isolat DNA metode CTAB menunjukkan pita (*band*) tunggal saat diuji dengan elektroforesis gel agarosa. Hal ini mengindikasikan bahwa metode tersebut berhasil mengisolasi DNA dengan kualitas tinggi (Zhang dkk., 2010; Mourellos dkk., 2016; Cheng dkk., 2014; Gontia-Mishra dkk., 2013; Turan dkk., 2015).

Identifikasi jamur secara molekular dilakukan untuk mengetahui spesies jamur pendegradasi LDPE sehingga dibutuhkan gen penanda yang dapat membedakan antara satu spesies dari spesies lainnya. Gen penanda yang telah digunakan secara luas untuk mengidentifikasi jamur adalah area *non-barcoding* ITS rDNA. Daerah ITS banyak dipilih karena sifatnya yang konservatif dan ukurannya relatif pendek sehingga mudah diamplifikasi (Schoch dkk., 2012). Primer yang akan digunakan pada proses PCR adalah pasangan ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4. Berdasarkan penelitian De Beeck dkk. (2014), primer ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4 menunjukkan efisiensi yang jauh lebih tinggi dalam mengamplifikasi daerah ITS dibanding dengan pasangan primer lain yang umum digunakan, seperti primer ITS1F/ITS2 dan ITS3/ITS4. Amplifikasi DNA oleh pasangan primer tersebut menghasilkan pita tunggal dengan ukuran ~500 bp, yaitu daerah yang mengindikasikan fragmen ITS (Aamir dkk., 2015; Umesha dkk., 2016).

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah aktivitas degradasi isolat jamur terhadap plastik LDPE?
2. Bagaimana hasil identifikasi molekuler jamur pendegradasi plastik LDPE dengan gen pengkode ITS rDNA?

### 1.3 Tujuan

1. Mengetahui aktivitas degradasi jamur hasil isolasi dari tanah TPA terhadap plastik LDPE.
2. Mengetahui hasil identifikasi molekuler jamur pendegradasi plastik LDPE dengan gen pengkode ITS.

### 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel tanah diambil dari tempat pembuangan akhir (TPA) daerah Paras, Kecamatan Poncokusumo, Kabupaten Malang.
2. Pasangan primer yang digunakan adalah ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS5.

### 1.5 Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk menambah daftar keragaman mikroorganisme yang dapat digunakan dalam proses biodegradasi plastik LDPE. Hal ini dilakukan dalam upaya pengurangan jumlah limbah plastik yang ada di lingkungan. Selain itu, hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi literatur penunjang untuk penelitian selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Plastik Polietilen Berdensitas Rendah (*Low Density Polyethylene*)

Polietilen (PE) adalah salah satu jenis polimer sintetik yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari. PE tersusun atas monomer berupa senyawa etilen yang dipolimerisasi membentuk rantai hidrokarbon panjang dan kompleks. Berdasarkan massa jenisnya, secara umum PE dapat digolongkan menjadi dua kelompok besar yaitu HDPE (*High Density Polyethylene*) dan LDPE (*Low Density Polyethylene*). Polimer PE dengan  $\pm 2\%$  rantai cabang pendek memiliki karakteristik berupa kerapatan molekul dan densitas yang rendah. Plastik jenis tersebut dikenal sebagai PE berdensitas rendah atau LDPE (Malpas, 2010; Sen & Raut, 2015).

LDPE adalah salah satu jenis plastik yang paling banyak digunakan sebagai material *packaging*, terutama kantong plastik. LDPE bersifat inert pada suhu ruang, tahan terhadap bahan kimia dan pemanasan hingga suhu  $95^{\circ}\text{C}$  serta tidak mudah sobek saat diregangkan. Ketahanan produk LDPE disebabkan oleh tingginya hidrofobisitas polimer akibat rantai hidrokarbon yang panjang dan kompleks (**Gambar 2.1**). Selain itu, LDPE tidak mengandung gugus fungsi yang dapat membantu menginisiasi proses degradasi (Gajendiran dkk., 2016; Shah dkk., 2008). Laju degradasinya yang rendah di alam menyebabkan polimer LDPE terakumulasi dalam jumlah besar dan menjadi polusi bagi lingkungan.



dengan memanfaatkan sumber karbon non-konvensional. Allah SWT berfirman dalam surat Shaad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۗ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

*“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada diantara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.” (QS. Shaad: Ayat 27)*

Sebagaimana difirmankan Allah SWT dalam surat Shaad ayat 27, sungguh Allah tidak menciptakan segala sesuatu tanpa arti atau dengan sia-sia. Mahasuci Allah SWT dari segala yang tidak berarti dan sia-sia. Segala sesuatu yang diciptakan-Nya adalah hak, mengandung berbagai hikmah dan maslahat yang besar (Al-Maraghi, 1989). Sebagai organisme heterotrof, jamur hidup dengan menguraikan bahan organik yang sering kali berasal dari hasil dekomposisi jasad organisme lain, sehingga umum diasosiasikan dengan sumber patogen. Penemuan jenis jamur yang didapati memiliki kemampuan untuk mendegradasi polimer kompleks LDPE menjadi salah satu bukti bahwa Allah SWT tidak menciptakan segala sesuatu kecuali memiliki peran dan tujuan masing-masing.

Jamur memiliki potensi besar sebagai pendegradasi LDPE dikarenakan kemampuannya untuk menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat memotong polimer kompleks LDPE sehingga memungkinkan terjadinya proses degradasi. Hal ini didukung pula dengan kemampuan jamur dalam memproduksi protein hidrofobik (hidrofobin) yang berperan sebagai surfaktan sehingga membantu menurunkan hidrofobitas polimer dan meningkatkan efektivitas degradasi. Jamur juga diketahui memiliki diversitas tinggi dengan kemampuan metabolisme

yang lebih beragam dibandingkan bakteri (Sen & Raut, 2015; Bayry dkk., 2012). Pada **Tabel 2.1** ditunjukkan kelompok jamur yang dilaporkan memiliki aktivitas degradasi terhadap LDPE

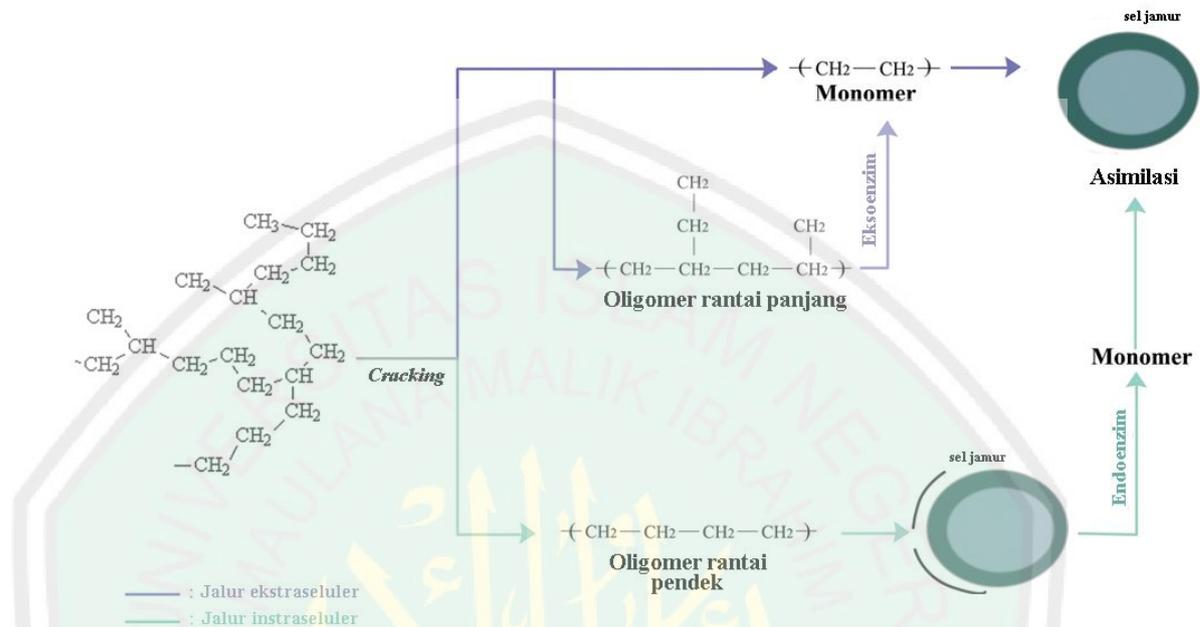
**Tabel 2.1** Jenis-jenis jamur dengan aktivitas degradasi paling tinggi

Jenis	Aktivitas Degradasi (%)	Masa Inkubasi (Hari)	Referensi
<i>A. japonicas</i>	11,11	30	Raaman dkk., 2012
<i>A. niger</i>	10,78	60	Deepika & Madhuri, 2015
<i>Fusarium</i> sp.	9,00	30	Merina, 2014
<i>R. orizae</i> NS5	8,40	30	Awasthi dkk., 2017

Pertumbuhan sel yang pesat dan kemampuan menembus permukaan polimer merupakan faktor yang membuat jamur efektif dalam mendegradasi LDPE. Pertumbuhan miselium pada permukaan LDPE dapat menyebabkan polimer terpecah (*cracked*) menjadi fragmen-fragmen dengan rantai yang lebih pendek. Proses *cracking* akibat perluasan jaringan miselium akan menyebabkan kerapuhan pada struktur polimer dan membuatnya mudah untuk didegradasi lebih lanjut (Gajendiran dkk., 2016).

Biodegradasi LDPE oleh jamur dapat terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur ekstraseluler dan intraseluler. Jalur ekstraseluler melibatkan sekresi eksoenzim jamur yang akan memotong rantai hidrokarbon hasil proses *cracking* permukaan polimer. Produk akhir yang dihasilkan berupa monomer yang dapat langsung dimanfaatkan sebagai sumber makanan melalui proses asimilasi. Pada jalur intraseluler, fragmen pendek hidrokarbon hasil proses *cracking* dibawa masuk melewati membran sel dan didegradasi oleh enzim intraseluler (endoenzim).

Proses degradasi lebih lanjut menyebabkan monomer termineralisasi menjadi humus, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O (**Gambar 2.2**) (Tokiwa dkk., 2009; Gewert dkk., 2015; Awasthi dkk., 2017).



**Gambar 2.2** Proses biodegradasi LDPE oleh jamur terjadi melalui dua jalur. Warna biru menunjukkan jalur ekstraseluler dan warna hijau menunjukkan jalur intraseluler (Gewert dkk., 2015; Paco dkk., 2017).

### 2.3 Ekstraksi DNA dengan Metode CTAB

Ekstraksi DNA dari sel jamur secara umum memiliki 4 tahapan utama yaitu pengeringan miselium, perusakan dinding sel, pemurnian dan presipitasi DNA (Jia dkk., 2014). Lisis dinding sel jamur dilakukan dengan menambahkan detergen kationik CTAB ke dalam larutan. Penggunaan CTAB membantu proses ekstraksi dengan cara mengikat protein dan polisakarida pada sel dan mengendapkannya. Proses tersebut berlangsung dalam larutan dengan konsentrasi NaCl > 1 M. Hal ini disebabkan karena kandungan NaCl yang tinggi dalam larutan menyebabkan penurunan kelarutan molekul protein dan polisakarida

dalam air sehingga terjadi presipitasi. Efektivitas lisis sel ditingkatkan dengan penambahan SDS (*sodium dodecyl sulphate*) yang berfungsi untuk mendenaturasi protein dan menghambat aktivitas DNase. Penambahan EDTA ke dalam bufer lisis dilakukan untuk mengkelat  $Mg^{2+}$  — kofaktor enzim DNase — agar enzim menjadi inaktif.

Tahap pemurnian DNA menggunakan campuran pelarut organik fenol:kloroform untuk melarutkan protein, lipid, karbohidrat dan sisa-sisa sel (*cell debris*). Proses partisi menghasilkan dua fase yang tidak saling bercampur, yaitu fase organik dan fase air (*upper phase*). Fase air merupakan tempat DNA terlarut akibat dari sifat kepolaran molekulnya. Pengendapan DNA dilakukan dengan menurunkan kelarutan DNA dalam air menggunakan etanol dan isopropanol. Seluruh tahapan ekstraksi dilakukan di dalam bufer TE untuk menghindari kerusakan pada isolat DNA (Surzycki, 2000; Tan & Yiap, 2009).

**Tabel 2.3** Kemurnian DNA hasil isolasi dengan metode CTAB

Jenis Jamur	Nilai $A_{260}/A_{280}$	Jenis Jamur	Nilai $A_{260}/A_{280}$
<i>Aspergillus flavus</i>	1,65	<i>Fusarium equiseti</i>	1,87
<i>Aspergillus niger</i>	1,90	<i>Penicillium</i> sp.	2,10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,67	<i>Trichoderma</i> sp.	1,96
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,01	<i>Bipolaris cyanodontis</i>	1,92

Tingkat keberhasilan suatu metode isolasi DNA dapat dilihat dari nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  dan hasil elektroforesis gel agarosa dari isolat DNA. DNA dengan kualitas baik memiliki nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  berkisar antara 1,8-2,0 dan menunjukkan pita tunggal yang utuh tanpa *smear* pada hasil elektroforegram (Fatchiyah dkk., 2011). Umesha dkk. (2016) menggunakan metode CTAB untuk mengisolasi DNA dari berbagai macam jenis jamur. Kemurnian DNA yang

dihasilkan dipaparkan pada **Tabel 2.3**. penelitian yang dilakukan oleh Zhang dkk. (2010), Muorelos dkk. (2016), Cheng dkk., (2014), Gontia-mishra dkk. (2013) dan Turan dkk. (2015) menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi menghasilkan isolat DNA dengan elektroforegram yang menunjukkan pita tunggal utuh dan tanpa *smear*. Pada **Gambar 2.3** ditunjukkan elektroforegram isolat DNA hasil metode CTAB pada berbagai macam jamur.



**Gambar 2.3** Elektroforegram DNA yang diisolasi menggunakan CTAB dikombinasikan dengan SDS. Lajur 1; *A. niger*, Lajur 2; *A. flavus*, Lajur 3; *F. oxysporum*, Lajur 4; *Penicillium* sp., Lajur 5; *Trichoderma* sp., Lajur 6; *F. equiseti* dan Lajur 7; *A. fumigatus* (Umesha dkk., 2016).

#### 2.4 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa

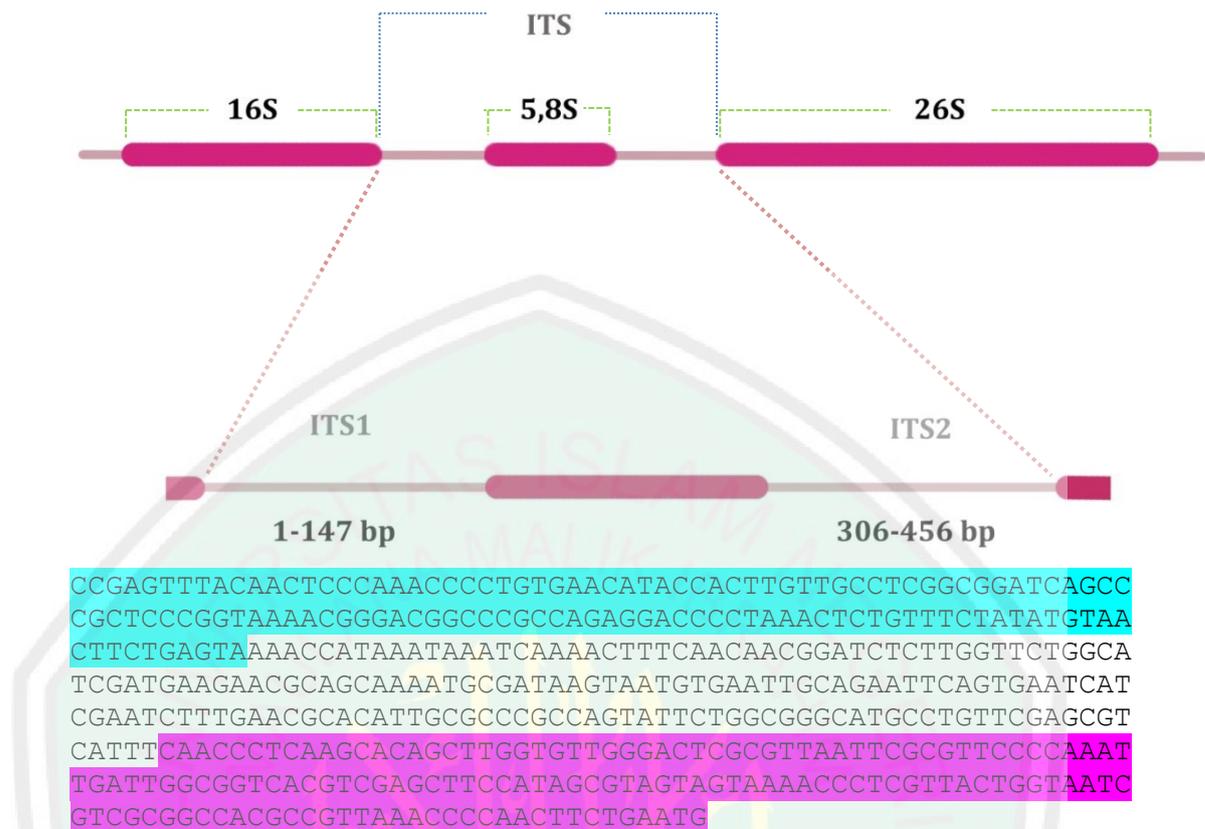
Prinsip dan proses elektroforesis adalah migrasi partikel bermuatan dalam suatu media di bawah pengaruh medan listrik. Arus listrik yang dialirkan melalui media akan menyebabkan molekul DNA yang bermuatan negatif bermigrasi ke kutub positif. Kecepatan migrasi bergantung muatan dari molekul yang setara dengan ukurannya. Molekul yang memiliki ukuran lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dan begitu pula sebaliknya. Berat molekul suatu fragmen DNA yang dihasilkan dapat diperkirakan dengan cara membandingkan laju migrasi fragmen

dengan laju migrasi DNA *marker* yang telah diketahui ukurannya. Elektroforesis gel agarosa dapat digunakan untuk memisahkan sampel DNA dengan kisaran ukuran 200-500.000 bp (Green & Sambrook, 2012; Wibowo, 2010).

Visualisasi fragmen DNA dapat dilakukan dengan menambahkan etidium bromida (EtBr) pada saat pembuatan gel atau melalui perendaman setelah proses elektroforesis selesai. EtBr akan berikatan dengan basa dari DNA dan menyebabkan transmisi sinar UV menjadi tampak oleh mata. Pengamatan pita (*band*) yang terbentuk dari proses elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV transluminator (Surzycki, 2003).

## 2.5 Gen ITS rDNA

DNA ribosom (rDNA) merupakan daerah yang menyandikan genom untuk komponen rRNA. Daerah rDNA dipisahkan menjadi segmen-segmen oleh suatu pembatas yang disebut *spacer*. Terdapat tiga *spacer* yang memisahkan antar daerah pada rDNA yaitu *external transcribed spacer* (ETS), *intergenic spacer* (IGS) dan *internal transcribed spacer* (ITS). Daerah ITS merupakan area pada ribosomal DNA yang terletak di antara segmen 18S dan 28S. Pada golongan jamur, daerah ITS terbagi menjadi dua bagian yaitu ITS1 yang terletak di antara 18S dan 5,8S dan ITS2 yang terapat di antara 5,8S dan 28S (**Gambar 2.4**). Kedua area tersebut tidak ikut diterjemahkan pada saat proses pengkodean rRNA sehingga disebut sebagai daerah *non-coding* (Mulyatni dkk., 2011; Deacon, 2006).



**Gambar 2.4** Daerah ITS terdiri atas ITS1, unit 5,8S dan ITS2. (a) Daerah ITS1 pada *F. oxysporum* berada pada 1-147 bp, sementara ITS2 terletak pada 306-456 bp. (b) Sikuen DNA daerah ITS secara keseluruhan dari *F. oxysporum*, warna biru menunjukkan daerah ITS1 dan warna merah muda menunjukkan daerah ITS2, berada di antaranya adalah sikuen unit 5,8S ([www.ncbi.nlm.gov/nucleotide/AF\\_132799.1](http://www.ncbi.nlm.gov/nucleotide/AF_132799.1)).

Daerah ITS telah digunakan secara luas sebagai gen pengkode universal dalam identifikasi jamur karena sifatnya yang konservatif (**Gambar 2.5**). Hal ini menyebabkan daerah ITS dapat digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan antar spesies pada suatu organisme. Selain itu, ITS juga mengalami evolusi paling cepat dibanding daerah lainnya pada rDNA sehingga menunjukkan variasi genetik yang tinggi. Variasi genetik digunakan untuk membedakan antara satu spesies dengan yang lain dalam satu genus (Schoch dkk., 2012; Raja dkk.,

2017). Pemilihan ITS sebagai gen pengkode juga didasarkan pada ukurannya yang relatif pendek, yaitu sekitar 500 pasangan basa sehingga memudahkan proses amplifikasi menggunakan primer universal.

```

CACCCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCTCCGCGAC
CCTCCCGGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCT
CTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGG ----- 5,8S ----- ATT
TCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGAATGTAAGGCCTC
AAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCG
CACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAACCCCAATTTTCCAAAGGTTGA

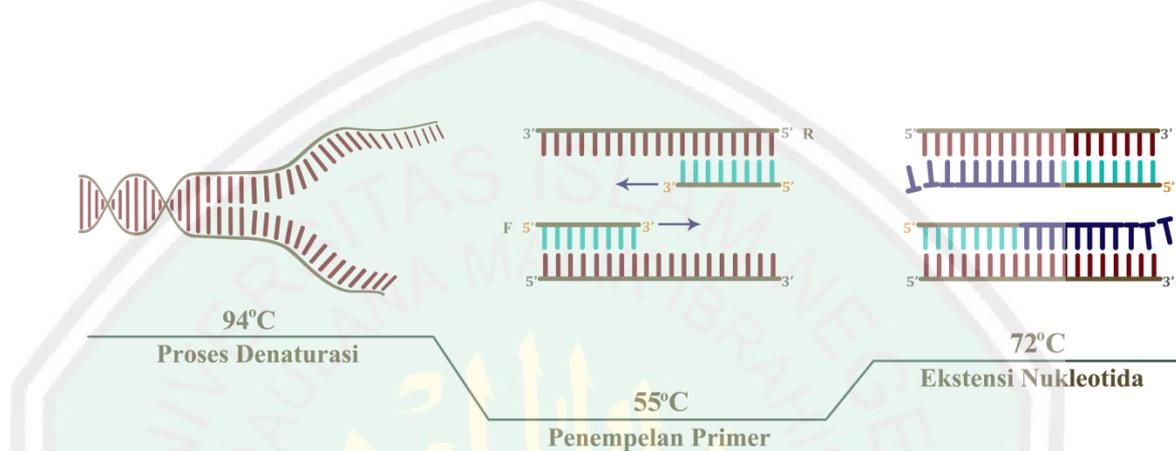
```

**Gambar 2.5** Sikuen daerah ITS rDNA dari *Colletotrichum* sp. Warna biru menunjukkan daerah konservatif dari area ITS1 dan ITS2 (Rampersad, 2014).

## 2.6 Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Reaksi polimerasi berantai (PCR) merupakan teknik amplifikasi yang digunakan untuk mereplikasi suatu daerah spesifik pada DNA sehingga dihasilkan salinan sikuen dalam jumlah besar. Reaksi tersebut didasarkan pada kemampuan enzim DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru berdasarkan templat. Secara umum, amplifikasi DNA melalui proses PCR membutuhkan DNA templat, primer, nukleotida (mencakup basa adenin, timin, sitosin dan guanin) dan DNA polimerase. Sintesis DNA dilakukan oleh DNA polimerase dengan cara menggabungkan tiap-tiap nukleotida sehingga dihasilkan salinan sikuen yang komplementer terhadap templat DNA. Proses amplifikasi dilakukan dengan bantuan primer, yaitu potongan sikuen sepanjang 15-25 nukleotida yang sifatnya komplementer terhadap DNA target. Terdapat dua macam primer yang

dibutuhkan dalam proses amplifikasi, yaitu primer *forward* dan *reverse*. Primer *forward* merupakan primer yang menempel pada untai DNA dengan orientasi dari ujung 5' → 3', sebaliknya primer *reverse* memiliki orientasi dari sisi 3' → 5'. Fungsi primer pada proses PCR adalah sebagai titik penanda awal dan akhir daerah yang ingin diamplifikasi (Garibyan & Avashia, 2013; Chen & Janes, 2002).



**Gambar 2.6** Tahapan-tahapan pada proses PCR. Denaturasi atau proses pemisahan untai ganda DNA, penempelan primer dan sintesis untai DNA baru. F mengindikasikan primer *forward* dan R menunjukkan primer *reverse*.

Satu siklus proses PCR mencakup tiga tahapan reaksi yaitu denaturasi, *annealing* dan elongasi nukleotida (**Gambar 2.4**). pada tahap denaturasi, DNA dipanaskan pada suhu 94°C untuk memutuskan ikatan hidrogen yang menghubungkan struktur heliks ganda pada DNA sehingga dihasilkan untai tunggal. *Annealing* merupakan proses penempelan primer pada DNA templat. Pada tahap tersebut suhu diturunkan hingga titik 50-60°C agar primer menempel tepat pada posisi yang diinginkan. Tahap terakhir adalah elongasi, yaitu proses sintesis nukleotida oleh enzim *Taq polymerase*. Suhu yang umum diterapkan pada saat elongasi adalah 72°C, yaitu suhu kera optimum dari *Taq polymerase* (Brown, 2007).

**Tabel 2.2** Beberapa macam primer universal yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS

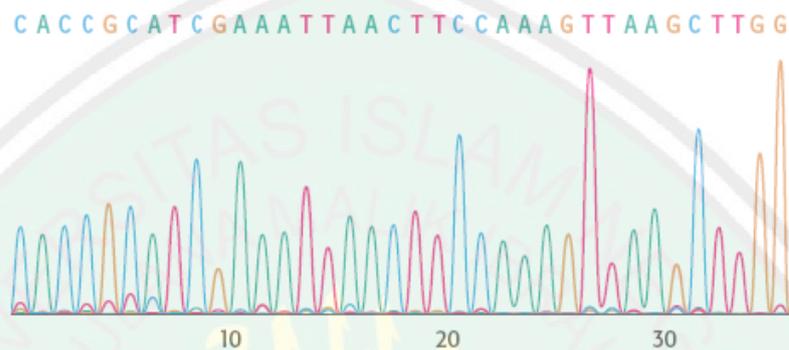
Jenis Primer		Referensi
ITS1-F	5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Umesha dkk., 2016
ITS4-R	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
ITS3	5' -GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	Blaalid dkk., 2013
ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Vancouv & Keen, 2009
ITS86-F	5' -GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3'	
ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Aamir dkk., 2015
ITS5	5' -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	

Pemilihan primer merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan proses PCR. Syarat pemilihan primer yang baik menurut Lorenz (2012) diantaranya panjang fragmen berkisar antara 15-30 basa dengan kandungan G+C mencapai 50-60% dari total keseluruhan nukleotida. Tm primer berkisar antara 55-80°C. Tm (*melting temperature*) mengindikasikan suhu pada saat 50% molekul DNA telah terurai strukturnya menjadi untai tunggal dan digunakan untuk menentukan suhu proses *annealing*. Selain itu, ujung primer tidak dapat berupa dinukleotida berulang atau rangkaian panjang terdiri atas satu basa sebab dapat meningkatkan kemungkinan amplifikasi daerah yang salah. Beberapa primer universal yang diketahui berhasil mengamplifikasi daerah ITS jamur tertera pada **Tabel 2.2**.

## 2.7 Penentuan Sekuen DNA dan Analisis Bioinformatika

Proses sekuensing DNA menggunakan metode *dideoxy nucleotide chain termination* menghasilkan kromatogram yang tersusun atas puncak (*peak*) dalam empat warna berbeda yang mengkodekan empat basa yang menyusun DNA

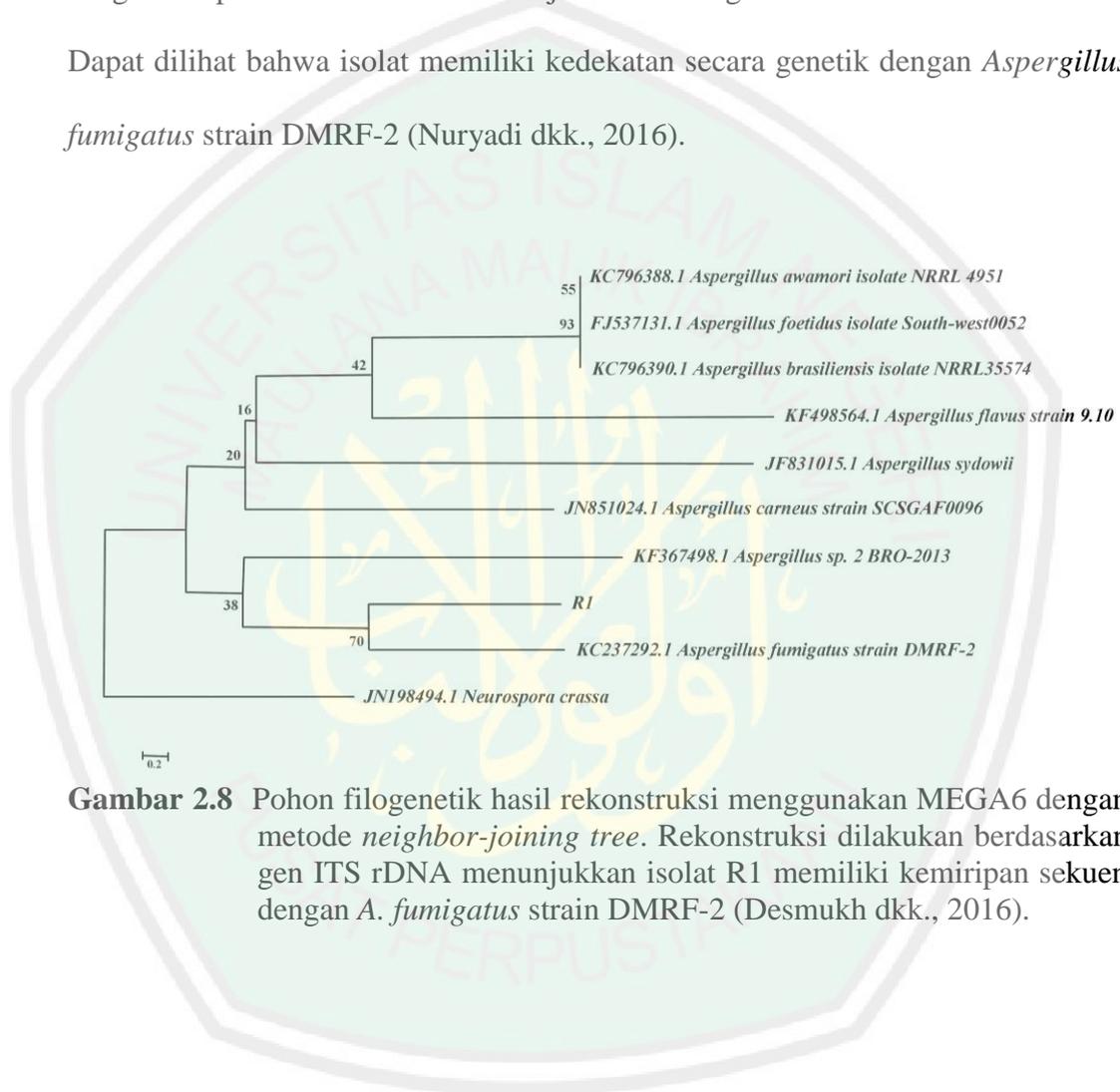
(**Gambar 2.7**). Program komputer akan melakukan pembacaan pada potongan-potongan sekuen DNA yang saling tumpang tindih dan menyusunnya menjadi urutan berkesinambungan yang disebut *contig* (Watson dkk., 2014; Hebert & Gregory, 2005).



**Gambar 2.7** Visualisasi kromatogram hasil penentuan sekuen DNA dengan metode *dideoxy nucleotide chain termination*. Nukleotida yang berbeda terbaca sebagai *peak* dalam warna yang berbeda pula; hijau untuk adenin (A), kuning untuk guanin (G), biru untuk sitosin (C) dan merah untuk timin (T).

Hasil penentuan sekuen dianalisis menggunakan program komputer Bioedit, BLAST-n dan MEGA6. Analisis *contig* dilakukan dengan Bioedit untuk memperoleh hasil sekuensing yang lebih baik. Hal ini dilakukan dengan cara membuang daerah yang bukan merupakan hasil konsensus dari hasil sekuen *forward* dan *reverse*. Program BLAST-n digunakan untuk mencocokkan sekuen DNA *query* dengan sekuen pada database *Nucleotide Center for Biotechnology Information* (NCBI). Pencocokan identitas didasarkan pada kemiripan sekuen *query* dengan database dan dikelompokkan berdasarkan kemiripannya (Tamura dkk., 2007; Toha dkk., 2016).

Pembandingan yang digunakan pada proses konstruksi pohon filogenetik adalah sekuen database dengan presentase kemiripan antara 98-100% terhadap sekuen target. Konstruksi dilakukan menggunakan *software* MEGA6 berdasarkan pendekatan *maximum likelihood* atau kemiripan yang paling tinggi. Pohon filogenetik pada **Gambar 2.8** menunjukkan hubungan kekerabatan dari isolat R1. Dapat dilihat bahwa isolat memiliki kedekatan secara genetik dengan *Aspergillus fumigatus* strain DMRF-2 (Nuryadi dkk., 2016).



**Gambar 2.8** Pohon filogenetik hasil rekonstruksi menggunakan MEGA6 dengan metode *neighbor-joining tree*. Rekonstruksi dilakukan berdasarkan gen ITS rDNA menunjukkan isolat R1 memiliki kemiripan sekuen dengan *A. fumigatus* strain DMRF-2 (Desmukh dkk., 2016).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Oktober 2018 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang dibutuhkan pada saat *sampling* diantaranya *polybag* steril, sendok steril dan *icebox*. Uji aktivitas biodegradasi LDPE dan isolasi jamur membutuhkan seperangkat alat gelas, cawan petri, jarum ose, neraca analitik, tabung mikro 1,5 mL, *shaker*, *hotplate*, *vortex* (Maxi Mix II), dan inkubator (Mammert). Peralatan yang dibutuhkan pada tahap isolasi DNA meliputi mikropipet (Bio-Rad), tip mikropipet, bunsen, *autoclave* dan *centrifuge* (Thermo scientific). Uji kuantitatif dan kualitatif DNA menggunakan seperangkat alat elektroforesis (Bio-Rad), lampu UV transluminator (Bio-Rad) dan spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Bio-Rad) digunakan pada tahap amplifikasi DNA.

##### 3.2.2 Bahan

Sampel tanah didapatkan dari Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Paras. Bahan-bahan yang digunakan dalam isolasi jamur antara lain *mineral salt medium* (MSM) yang mengandung 0,25%  $K_2HPO_4$ ; 0,02%  $KH_2PO_4$ ; 0,05% NaCl; 0,001%

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 0,0005% FeSO<sub>4</sub>, glukosa, dan akuades. Proses isolasi DNA membutuhkan CTAB 2%, NaCl 0,7 M; 1,5 M, kloroform, isopropanol, bufer TE pH 8 (10 mM Tris, 10 mM EDTA), ddH<sub>2</sub>O steril dan etanol 70 %.

Proses elektroforesis DNA jamur memerlukan agarosa, bufer TAE 1X, EtBr, dan *loading buffer* (Vivantis). Proses amplifikasi DNA menggunakan *Vivantis DNA Amplification Kit* (dNTP 2 mM, 10X Vibufer A, MgCl<sub>2</sub> 50 mM dan *Taq DNA polimerase*), *Nuclease-free water* (Vivantis), *primer forward* dan *primer reserve* (IDT).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tahapan-tahapan berikut.

1. Pengambilan sampel tanah
2. Isolasi jamur
3. Uji aktivitas biodegradasi LDPE oleh jamur
4. Isolasi DNA jamur
5. Amplifikasi gen ITS dengan PCR
6. Penentuan sekuen gen ITS
7. Analisis data menggunakan bioinformatik

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari lahan TPA pada tiga titik yang berbeda. Sampel kemudian dicampur dalam *polybag* steril dan diaduk hingga rata. Selanjutnya,

sampel dimasukkan ke dalam *icebox* yang telah diisi dengan *blue ice* dan dibawa ke laboratorium (Khan dkk., 2017).

### 3.4.2 Preparasi plastik LDPE

Proses preparasi yang dilakukan merupakan hasil modifikasi dari penelitian Ainiyah & Shovitri (2013). Kantong plastik bening yang terbuat dari LDPE dipotong-potong dengan ukuran 2x2 cm (berat rata-rata 0,02 gram) dan disterilisasi dengan cara direndam menggunakan alkohol selama  $\pm$  24 jam. Kemudian dikeringanginkan di bawah lampu UV dalam *laminar air flow* selama 24 jam.

### 3.4.3 Isolasi Jamur Pendegradasi LDPE

100 gram sampel tanah dipindahkan ke dalam botol kaca steril bertutup. Tiga potong plastik LDPE ditanamkan ke dalam sampel tanah, kemudian ditambahkan 100 mL media *mineral salt* (MSM) yang mengandung 1% glukosa. Media kultur diinkubasi di dalam tanah pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 7 hari (Khan dkk., 2017). Setelah 7 hari, kultur diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan sebanyak tiga kali ( $10^{-3}$ ). Hasil pengenceran  $10^{-3}$  dipindahkan ke dalam MSM agar. setiap koloni tunggal ditransfer ke media agar baru dan dimurnikan sebanyak tiga kali tahap pemurnian.

### 3.4.4 Uji Biodegradasi LDPE oleh Jamur

MSM *broth* sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan disterilkan. Masing-masing isolat jamur diinokulasikan ke dalam media yang mengandung 0,5% glukosa. Plastik steril yang telah dipreparasi sebelumnya

dimasukkan ke dalam media kultivasi hingga keseluruhan bagian terendam dalam media. Selanjutnya, toples ditutup menggunakan *plastic wrap* dan diinkuasi pada suhu ruang. Proses degradasi dilakukan selama 40 hari, dan pada akhir proses dilakukan penimbangan berat akhir plastik untuk menentukan isolat dengan aktivitas degradasi paling tinggi (Khan dkk., 2017).

$$\% \text{ Degradasi} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 3.4.6 Isolasi DNA Menggunakan Metode CTAB

Isolasi DNA yang diterapkan adalah hasil modifikasi metode CTAB pada penelitian Almakarem dkk. (2012) dan Prabha dkk. (2013). Miselium jamur ditimbang sebanyak 200 mg ke dalam tabung mikro, lalu ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan bufer ekstraksi (200 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 1,5 M NaCl dan 2,5% CTAB). Setelah dihaluskan menggunakan stamper hingga homogen, sampel dipindahkan ke dalam tabung mikro. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan suhu 65°C selama 10 menit, tabung mikro dibolak-balik setiap 5 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan P : C (25 : 25), dengan perbandingan volume 1:1. Hasil partisi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Suspensi sampel ditambahkan kloroform dengan perbandingan 1:1 dan disentrifugasi kembali.

Presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 kali volume supernatan dan disimpan selama 3 jam pada *freezer* suhu -20°C. Endapan DNA kemudian dipisahkan melalui sentrifugasi. Supernatan dibuang, lalu pelet yang didapat ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  etanol absolut dan

disentrifugasi kembali. Pencucian dilakukan sebanyak dua kali menggunakan 10  $\mu\text{L}$  etanol 70%. Setelah itu, pelet ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  bufer TE dan disimpan pada suhu 4°C. Pengujian uji kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometer NanoDrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

#### 3.4.7 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa (Lee, 2012)

Pembuatan gel agarosa 1% dilakukan dengan menimbang 0,3 gram agarosa dan melarutkannya ke dalam 30 mL buffer TAE 1X. Campuran kemudian dipanaskan dalam *microwave* hingga agarosa terlarut. Selanjutnya, gel didinginkan hingga suhu  $\pm 60^\circ\text{C}$ , ditambahkan 1-2  $\mu\text{L}$  pewarna EtBr dan dituang ke dalam *tray* serta dipasang *combs*. Gel dibiarkan selama 1 jam agar mengeras, kemudian *combs* dilepas dan gel agarosa dapat digunakan untuk tahap selanjutnya.

Gel dimasukkan ke dalam *tank* elektroforesis yang berisi bufer TE hingga keseluruhan bagiannya terendam dalam larutan. Selanjutnya, 5  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke dalam sumur/*well*. Proses elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan voltase 85 V. Setelah itu, gel diletakkan di bawah UV transiluminator untuk diamati pita (*band*) yang terbentuk.

#### 3.4.8 Amplifikasi gen ITS dengan PCR (De Beeck, 2014)

Proses amplifikasi gen ITS dilakukan dengan alat PCR menggunakan primer universal ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4. Komposisi dari PCR meliputi 1  $\mu\text{L}$  DNA template, *Vivantis* DNA *amplification* Kit, 1  $\mu\text{L}$  primer *forward* 10  $\mu\text{M}$  dan 1  $\mu\text{L}$  primer *reverse* 10  $\mu\text{M}$ . DNA *Amplification* Kit terdiri atas 2  $\mu\text{L}$  dNTP 2 mM, 5  $\mu\text{L}$  10X *Vibuffer* A, 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  50 mM dan 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase. *Nuclease-free water* ditambahkan hingga jumlah total larutan adalah 50  $\mu\text{L}$ .

Reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus yang tiap siklusnya terdiri dari denaturasi, *annealing* dan elongasi, seperti yang dijabarkan pada gambar 3.1. Hasil yang didapat kemudian diuji kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa



Gambar 3.1 Tahapan pada proses PCR (*Vivantis DNA Amplification Kit*, 2017).

### 3.4.9 Sikuensing DNA

Proses sekuensing hasil amplifikasi dilakukan berdasarkan metode *dideoxy nucleotide chain termination* Sanger di First Base Laboratories, The Gemini Singapore Science Park (Legiastuti & Aminingsih, 2012).

### 3.4.10 Analisis Data

Hasil peruntan DNA disusun dengan program Bioedit dan dianalisis menggunakan program BLAST-N untuk mengkonfirmasi kemiripan sekuen jamur dengan sekuen yang lain pada *GenBank*. Pengkonstruksian pohon filogenetik dilakukann dengan program bioinformatika MEGA6. Tingkat kemiripan yang paling tinggi ditunjukkan dengan jarak terdekat dari sekuen sampel terhadap sekuen pembanding (Yuniarti dkk., 2016).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Material *low density polyethylene* (LDPE) merupakan salah satu komponen plastik *packaging* yang sulit terurai dengan sendirinya. Penguraian LDPE di alam melibatkan peran konsortium mikroorganisme. Jamur pendegradasi LDPE banyak diisolasi dari area penimbunan limbah plastik, seperti tempat pembuangan sampah atau *landfill*. Tempat pembuangan akhir (TPA) dipilih karena dianggap memiliki potensi besar ditemukannya konsortium jamur pendegradasi LDPE. Identifikasi spesies jamur dilakukan secara genotip melalui penelusuran hubungan kekerabatan antar spesies menggunakan gen penanda ITS rDNA.

#### 4.1 Isolasi Jamur Pendegradasi LDPE

Proses isolasi dilakukan untuk mendapatkan konsortium jamur yang dapat memanfaatkan LDPE sebagai sumber makanan utama. Sampel tanah diambil dari TPA Paras, Poncokusumo, pada tiga titik yang berbeda. titik sampling dipilih berdasarkan kedalaman dan kepadatan timbunan limbah plastik. Hal ini dimaksudkan untuk meminimalkan kemungkinan konsortium berasal dari kontak manusia dan lingkungan sekitar. Pengukuran suhu (*in situ*) dan derajat keasaman tanah (*ex situ*) dilakukan untuk mengetahui karakter tanah media tumbuh jamur. Hasil pengukuran pada **Tabel 4.1** menunjukkan bahwa suhu lingkungan tumbuh relatif dingin dengan pH tanah netral berkisar antara 6,73-7,09.

**Tabel 4.1** Suhu udara dan derajat keasaman (pH) sampel tanah

Titik Sampling	Suhu Udara (°C)	Derajat Keasaman (pH)
1	11	6,73
2	11	7,09
3	11	6,89
Sampel homogen	24	6,93

Isolasi jamur pendegradasi dilakukan dengan mensuspensi sampel tanah ke dalam *mineral salt medium* (MSM). MSM merupakan media dengan kandungan karbon minimal yang umum digunakan pada proses isolasi jamur pendegradasi polimer sintetik (Khan dkk., 2017). Glukosa 1% ditambahkan ke dalam media sebagai sumber makanan bagi jamur untuk memulai proses metabolisme. Selektivitas media ditingkatkan dengan penambahan substrat LDPE guna mendapatkan konsortium jamur yang dapat memanfaatkan polimer LDPE sebagai sumber karbon. Hasil suspensi diinkubasi selama 7 hari yang bertujuan untuk memastikan spesies yang tumbuh merupakan spesies pendegradasi LDPE.

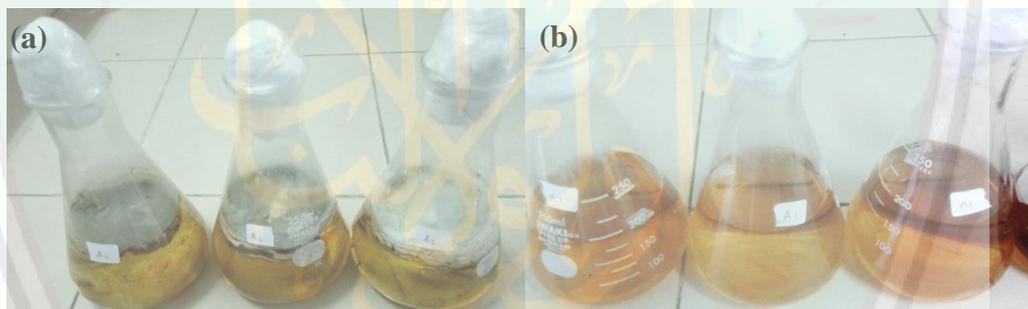
Kultur cair dipindahkan ke dalam media agar melalui metode tuang (*pour plate*). Kultur diencerkan sebanyak tiga kali ( $10^{-3}$ ) untuk mengurangi kepadatan koloni sehingga didapatkan koloni jamur tunggal. Purifikasi isolat jamur dilakukan dengan metode *streak* sebanyak tiga kali tahap pemurnian. Berdasarkan hasil isolasi didapatkan dua jenis isolat jamur yang diberi kode nama HJL M4LK1 dan HJL M4LK2 (**Tabel 4.2**).

**Tabel 4.2** Morfologi isolat jamur pendegradasi LDPE

Isolat	Koloni	Miselium	Konidia
HJL M4LK1	Putih, hifa mulai terlihat jelas setelah masa inkubasi 24 jam	Putih	Hijau
HJL M4LK2	Coklat dengan permukaan halus tanpa hifa	-	-

## 4.2 Uji Biodegradasi LDPE secara Kuantitatif

Pengujian dilakukan untuk menentukan kemampuan degradasi LDPE oleh masing-masing isolat jamur yang telah didapatkan. Kandungan glukosa pada MSM *broth* yang digunakan pada proses uji biodegradasi diturunkan hingga 0,5% untuk memaksimalkan pemanfaatan substrat LDPE oleh koloni jamur. Pengamatan yang dilakukan setelah 40 hari masa inkubasi menunjukkan isolat HJL M4LK1 mampu tumbuh dalam MSM (0,5% glukosa) menggunakan LDPE sebagai sumber karbon (**Gambar 4.1a**). Hal ini berbeda dengan kondisi isolat HJL M4LK2, pertumbuhan yang tidak teramati pada kultur menandakan isolat tidak dapat menggunakan LDPE sebagai sumber makanan utama (**Gambar 4.1b**).



**Gambar 4.1** Penampakan kultur isolat (a) HJL28 dan (b) HJL29 setelah 40 hari masa inkubasi

Pada **Gambar 4.2** dapat dilihat terdapat jalinan miselium yang tumbuh di bagian tepi dan atas permukaan strip LDPE. Kemampuan jamur untuk mengkolonisasi permukaan LDPE meningkatkan efisiensi pemecahan polimer melalui proses *cracking* sehingga didapatkan fragmen dengan rantai yang lebih pendek (Gewert dkk., 2015, Gajendiran dkk. 2016). Secara fisik, LDPE yang telah

melalui proses degradasi oleh HJL28 mengalami penurunan pada *tensile strength* polimer serta permukaan material yang berubah kasar.



**Gambar 4.2** Penampakan isolat HJL M4LK1 pada MSM *broth*. Jalinan miselium yang tumbuh pada permukaan polimer menandakan isolat dapat mengkolonisasi material LDPE.

Menurut Volke-sepulveda dkk. (2002) jamur diketahui tergolong mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses degradasi material LDPE di alam dengan kemampuan degradasi yang lebih tinggi dibandingkan bakteri (Gajendirian dkk., 2016; Restrepo-Florez dkk., 2014; Sen & Raut, 2015). Proses degradasi didukung oleh kemampuan jamur dalam memproduksi hidrofobin yang berperan sebagai surfaktan antara tubuh jamur dengan permukaan LDPE. Polimer rantai pendek kemudian akan memasuki jalur degradasi enzimatik yang melibatkan sekresi eksoenzim dan pengangkutan fragmen serta monomer PE ke dalam sel jamur (Tokiwa dkk., 2009, Gewert dkk., 2015).

Penentuan presentase degradasi LDPE oleh isolat HJL M4LK1 dilakukan setelah 40 hari masa inkubasi. Hasil uji biodegradasi ditunjukkan pada **Tabel 4.3**. Berdasarkan perhitungan didapatkan presentase degradasi rata-rata LDPE sebesar  $13,33 \pm 0,9428\%$ . Raaman dkk. (2012) melaporkan *A. japonicas* memiliki

aktivitas degradasi LDPE tertinggi sebesar 11,11% selama 30 hari masa inkubasi. Sementara itu, penelitian Merina (2014) mendapati bahwa golongan *Fusarium* sp. mampu mendegradasi LDPE hingga 9% dengan masa inkubasi yang sama. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat HJL28 mempunyai aktivitas degradasi LDPE yang tergolong tinggi.

**Tabel 4.3** Hasil uji biodegradasi LDPE oleh isolat jamur HJL28

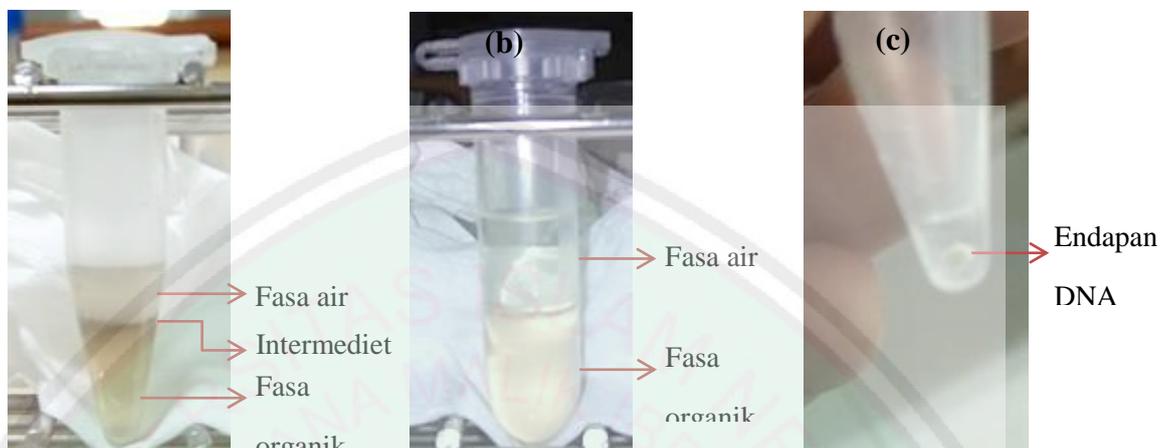
Isolat Jamur	Berat Awal (g)	Berat Akhir (g)	Weigh Loss (g)	Persen Degradasi (%)
Ulangan 1	0,0020	0,0018	0,0002	10
Ulangan 2	0,0020	0,0018	0,0002	10
Ulangan 3	0,0020	0,0016	0,0004	20
Persen Degradasi Rata-rata				13,33 ± 0,9428 %

#### 4.3 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl

Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) umumnya digunakan untuk mengekstrak DNA dari jaringan yang tinggi kandungan karbohidrat (Jia, Wamishe & Zhou, 2014). CTAB akan mengikat protein dan polisakarida pada sel dan mengendapkannya, sementara DNA akan tetap terlarut dalam air. purifikasi DNA dilakukan melalui proses partisi menggunakan pelarut organik kloroform dan campuran fenol:kloroform. Menurut Tan & Yiap (2009), DNA yang bersifat polar akan terlarut ke dalam fasa air sementara komponen penyusun sel lainnya terikat ke dalam fasa organik (**Gambar 4.3**)

Pengendapan DNA menggunakan isopropanol berlangsung efektif pada suhu di bawah 4°C (Turan dkk., 2015). Hal ini dapat dicapai dengan menambahkan isopropanol dingin atau menyimpan isolat di dalam *freezer*. Penambahan isopropanol akan menurunkan kelarutan DNA dalam air sehingga terjadi

presipitasi. Endapan DNA terlihat sebagai lapisan putih pada dasar tabung mikro (**Gambar 4.3c**).

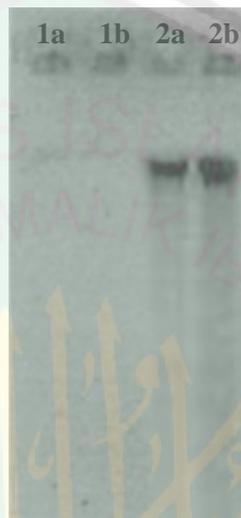


**Gambar 4.3** Purifikasi dengan pelarut organik menghasilkan lapisan tidak saling campur. (a) Partisi pertama dengan kloroform menghasilkan tiga fasa; air, intermediet dan organik. DNA terlarut dalam fasa air. (b) Partisi kedua dengan fenol:kloroform menghasilkan fasa air dan fasa organik. (c) DNA tampak sebagai endapan putih di dasar tabung mikro setelah penambahan isopropanol.

Pada tahap pemecahan dinding sel digunakan bufer lisis dengan dua konsentrasi NaCl yang berbeda, yaitu 0,7 M dan 1,5 M. **Tabel 4.4** memperlihatkan kemurnian DNA sampel 1 yang diisolasi menggunakan bufer lisis dengan kandungan NaCl 0,7 M terbaca (a) 1,56 dan (b) 1,44. Konsentrasi DNA yang didapat relatif tinggi, yaitu (a) 1292,10 dan (b) 1178,20 ng/uL. Namun, hasil elektroforegram tidak menunjukkan keberadaan pita DNA (**Gambar 4.4**). Berbeda dari hasil uji kuantitatif terhadap sampel 2 yang memperlihatkan isolat DNA memiliki kemurnian tinggi, dengan rasio  $A_{260}/A_{280}$  sebesar 1,83 dan 1,78. Hasil ini didukung pula dengan munculnya pita tunggal pada elektroforegram yang menandakan keberhasilan proses isolasi.

**Tabel 4.4** Hasil uji kuantitatif isolat DNA hasil ekstraksi metode CTAB/NaCl

Kode		Konsentrasi NaCl (M)	Absorbansi $A_{260}/A_{280}$	Konsentrasi (ng/uL)
1	a	0,70	1,56	1292,10
	b	0,70	1,44	1178,20
2	a	1,50	1,83	193,52
	b	1,50	1,78	157,65



**Gambar 4.4** Elektroforegram hasil isolasi metode CTAB/NaCl. M adalah marker DNA, Lajur 1a-b merupakan hasil isolasi menggunakan bufer lisis dengan konsentrasi NaCl 0,7 M dan Lajur 2a-b dengan konsentrasi NaCl 1,5 M. Munculnya pita DNA pada Lajur 1a-b menandakan keberhasilan proses isolasi.

Secara teori, menurut Surzycki (2000) konsentrasi NaCl 0,7 M cukup untuk menjaga kekuatan elektrolit larutan sehingga DNA tetap terlarut pada fasa air dan dapat dipisahkan melalui presipitasi isopropanol. Namun, hasil elektroforegram sampel I tidak menunjukkan adanya DNA di dalam larutan. Hal ini dimungkinkan karena kandungan air dalam sel jamur yang tinggi menurunkan konsentrasi akhir NaCl pada bufer lisis. Pada konsentrasi NaCl < 0,7 M, DNA akan membentuk kompleks dengan CTAB dan terendapkan sementara protein tetap terlarut dalam air. konsentrasi DNA yang tinggi kemungkinan merupakan hasil pembacaan kadar protein pada panjang gelombang 280 nm. Menurut Rapley (2007), nilai  $A_{260}/A_{280}$

kurang dari 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein di dalam isolat DNA. Berdasarkan uji kualitatif dan kuantitatif pada sampel I dan II diketahui bahwa peningkatan kandungan NaCl dari 0,7 M ke 1,5 M pada bufer lisis terbukti mampu meningkatkan kemurnian DNA *yield* secara signifikan.

#### 4.4 Amplifikasi Gen ITS menggunakan *Polymerase Chain Reaction*

Reaksi polimerasi berantai (PCR) merupakan teknik amplifikasi DNA yang didasarkan pada proses elongasi primer oleh enzim polimerase berdasarkan templat DNA (Chen & Janes, 2002). Pemilihan pasangan primer dan suhu *annealing* yang tepat merupakan faktor penentu keberhasilan proses amplifikasi DNA target. Berdasarkan penelitian sebelumnya, pasangan primer ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4 banyak dipakai sebagai marker universal proses amplifikasi daerah ITS pada jamur (Umesha dkk., 2016; Rakhmana., 2015; Rahayu dkk., 2015). **Tabel 4.5** menunjukkan sekuen nukleotida dari pasangan primer ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4 yang digunakan pada penelitian ini.

**Tabel 4.5** Sekuen nukleotida pasangan primer ITS4/ITS5 dan ITS1/ITS4

No	Primer	Sekuen	T <sub>m</sub> (°C)
1	ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	59
	ITS5	5' -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	
2	ITS1	5' -TCTGTAGGTGAACCTGCGG-3'	50
	ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

Secara umum, penentuan suhu *annealing* dilakukan berdasarkan suhu leleh (T<sub>m</sub>) primer yaitu 2-5°C dari harga T<sub>m</sub>. Pada proses amplifikasi menggunakan pasangan primer ITS4/ITS5 dilakukan percobaan suhu *annealing* pada 50, 51, 53

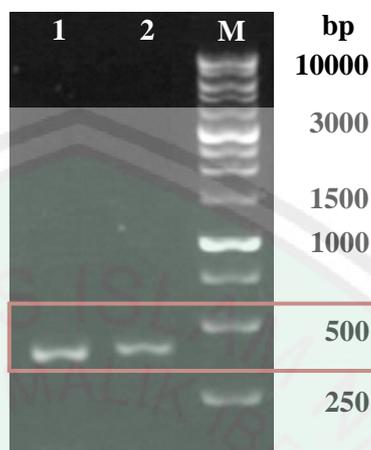
dan 55°C. Dapat dilihat dari **Gambar 4.5**, tidak tampak keberadaan pita DNA pada elektroforegram menandakan primer ITS4/ITS5 tidak dapat menempel dengan baik pada tempat DNA di rentang suhu tersebut, sehingga tidak terbentuk produk di akhir proses (Rambe dkk., 2014). Menurut Rahayu dkk. (2015), hal ini dimungkinkan karena suhu *annealing* yang terlalu tinggi mengakibatkan primer sulit menempel pada daerah target.



**Gambar 4.5** Elektroforegram hasil PCR menggunakan pasangan primer ITS4/ITS5. M merupakan marker DNA 100 bp. Lajur 1, 2, 3 dan 4 menunjukkan hasil PCR pada suhu *annealing* 50, 51, 53 dan 55°C secara berurutan. Tidak adanya pita DNA yang teramati mengindikasikan proses amplifikasi tidak berlangsung pada kondisi tersebut.

Pasangan primer ITS1/ITS4 merupakan salah satu primer universal yang umum digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS pada jamur. Suhu 48°C dipilih sebagai suhu *annealing* ITS1/ITS4 berdasarkan titik leleh ( $T_m$ ) primer. Hasil elektroforegram pada **Gambar 4.6** memperlihatkan daerah ITS berhasil diamplifikasi, ditunjukkan dengan keberadaan pita tunggal yang linier dengan marker ~500 bp. Menurut White dkk. (1990), daerah ITS1-ITS2 memiliki panjang

sekuen 563-602 bp. Ukuran pasangan basa < 500 bp menandakan PCR tidak berhasil mendapatkan daerah ITS secara penuh.



**Gambar 4.6** Elektroforegram hasil PCR menggunakan primer ITS1/ITS4 pada suhu *annealing* 48°C. M adalah marker DNA 1 kb, Lajur 1 merupakan ulangan 1 dan Lajur 2 adalah ulangan 2. Proses amplifikasi menghasilkan amplikon berukuran ~500 bp.

#### 4.5 Analisis Bioinformatika

Penentuan sekuen DNA menggunakan metode dideoksi Sanger dilakukan dengan dideoksinukleotida (ddNTP) berflorensi (Heather & Chain, 2016). Hasil proses *sequencing* pada **Gambar 4.7** menunjukkan daerah ITS yang didapatkan memiliki ukuran 426 bp.

```
CCTCCGCTTATTGATATGTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAATTATTAATATTTGTGAAAT
TTACACAGCAAACAATAATTTTATAGTCAAAACAAAAATAATCAAACTTTTAAC
AATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATTTCT
TGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCACATTGCACTTTGGGGTA
TCCCCCAAAGTATACTTGTGGAGCGTTGTTTCTCTCTTGGAAATTGCATTGCTTT
TCTAAAATTTCGAATCAAATTCGTTTGAAAACAACACTATTC AACCTCAGATCA
AGTAGGATTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

**Gambar 4.7** Sekuen gen ITS rDNA HJL28 memiliki panjang sekuen 426 bp.

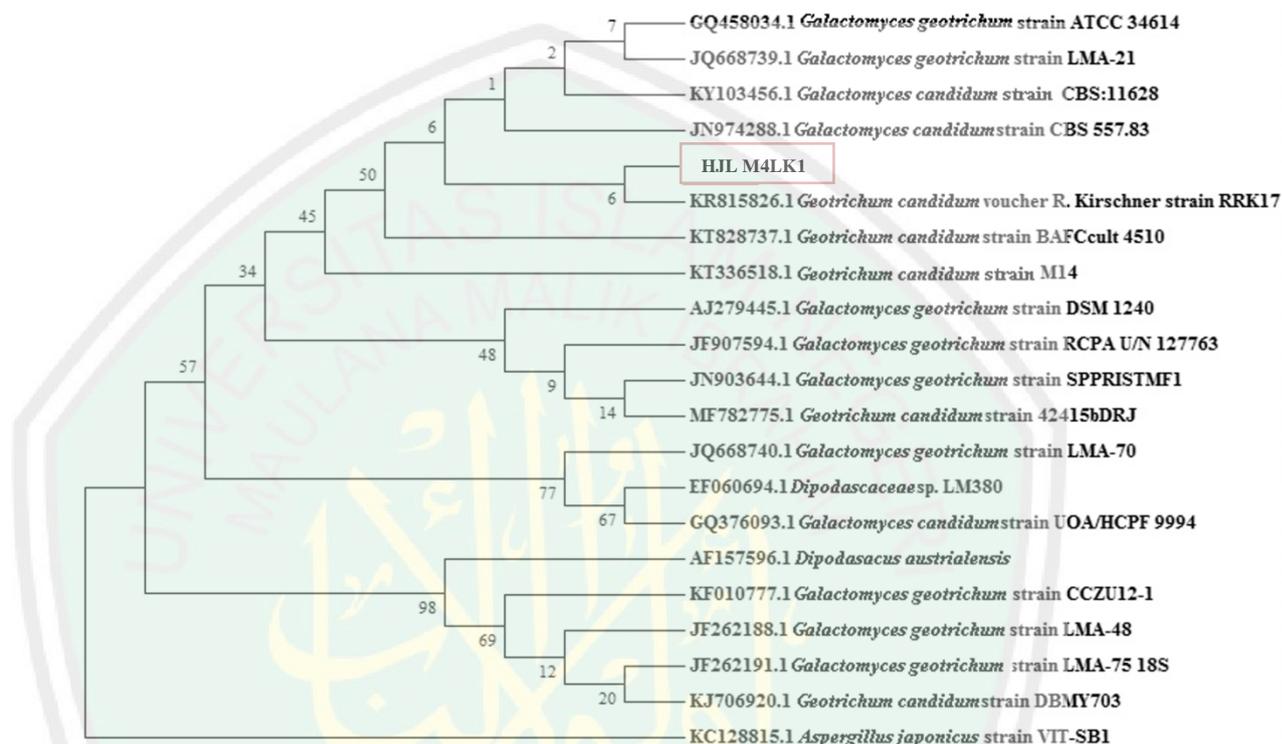
**Tabel 4.6** memperlihatkan 11 spesies yang memiliki nilai similaritas tertinggi dengan isolat berdasarkan *Max score* dan *Identity* program BLAST-n. Nilai *Identity* 99% mengindikasikan strain jamur termasuk ke dalam kelompok spesies yang sama. Hasil *Max score* terbesar ditunjukkan oleh *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17 dengan nilai 754 yang mengindikasikan tingginya homologi sekuen dengan isolat HJL28.

**Tabel 4.6** Hasil analisis BLAST-n terhadap HJL28

No	Deskripsi	Max Score	Identity
1	<i>Geotrichum candidum</i> voucher R. Kirschner strain RRK17, complete sequence	754	99%
2	<i>Galactomyces candidum</i> strain CBS:11628, complete sequence	752	99%
3	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-21, complete sequence	747	99%
4	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-70, complete sequence	741	99%
5	<i>Galactomyces candidum</i> strain CBS:557.83, complete sequence	734	99%
6	<i>Geotrichum candidum</i> strain 42415bDRJ, partial sequence	725	99%
7	<i>Galactomyces geotrichum</i> SPPRISTMF1, complete sequence	725	99%
8	<i>Galactomyces geotrichum</i> RCPA U/N 127763, complete sequence	725	99%
9	<i>Dipodascaceae</i> sp. LM380, complete sequence	719	99%
10	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain DSM 1240, complete sequence	719	99%
11	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain ATCC 34614, complete sequence	682	99%

Analisis kekerabatan dilakukan pula dengan cara konstruksi pohon filogenetik menggunakan program komputasi MEGA6. Hasil rekonstruksi dan perhitungan nilai *similarity* (**Tabel 4.7**) menunjukkan isolat dekat secara genetik dengan *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17 (**Gambar 4.8**). Kedua

sekuen didapati memiliki persen kemiripan sebesar 100%. Berdasarkan data di atas, dapat disimpulkan bahwa MEGA6 dan BLAST-n memberikan hasil analisis yang serupa.



**Gambar 4.8** Pohon filogenetik isolat jamur pendegradasi LDPE berdasarkan sekuen ITS rDNA. Konstruksi dilakukan dengan program MEGA6 menggunakan model K2 (Kimura-2-parameter). Pada gambar ditunjukkan isolat HJL M4LK1 memiliki kedekatan secara genetik dengan *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17.

*G. candidum* umumnya ditemukan di dalam tanah, bagian-bagian tumbuhan dan beberapa diisolasi dari produk berbahan dasar susu (*dairy product*). Jalanan hifa berwarna putih dengan arthroconida coklat pucat atau kehijauan. Menurut Grygier, Myszika & Rudzinska (2017), spesies *Geotrichum* sp. berpotensi besar sebagai agen bioremediasi. Penelitian yang telah dilakukan di antaranya

penggunaan *G. candidum* untuk mendegradasi limbah air, pestisida, material biofuel dan *crude oil* (Marjangkasa dkk., 2015; Yingben dkk., 2012).

**Tabel 4.7** Hasil perhitungan nilai *similarity* (100%) antara sekuen isolat HJL28 dengan sekuen pembandingan berdasarkan jara (*distance*) antar cabang.

No	Jenis Isolat	Similarity (%)
1	<i>Geotrichum candidum</i> voucher R. Kirschner strain RRK17	100,0
2	<i>Galactomyces candidum</i> strain CBS 557.83	100,0
3	<i>Galactomyces candidum</i> strain CBS 11628	100,0
4	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain ATCC 34614	100,0
5	<i>Geotrichum candidum</i> strain BAFCCult 4510	100,0
6	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-21	100,0
7	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain DSM 1240	99,72
8	<i>Geotrichum candidum</i> strain 42415bDRJ	99,72
9	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain RCPA U/N 127763	99,72
10	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain SPPRISTMF1	99,72
11	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-70	99,43
12	<i>Geotrichum candidum</i> strain M14	99,43
13	<i>Dipodascaceae</i> sp. LM380	99,15
14	<i>Galactomyces candidum</i> strain UOA/HCPF 9994	99,15
15	<i>Dipodascus australiensis</i>	98,00
16	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain CCZU12-1	98,00
17	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-48	98,00
18	<i>Geotrichum candidum</i> strain DBMY703	98,00
19	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-75	98,0
20	<i>Aspergillus japonicus</i> strain VIT-SB1	56,1

#### 4.6 DNA dalam Pandangan Islam

DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) atau asam deoksiribonukleat merupakan polimer asam nukleat yang bertindak sebagai materi pembawa informasi genetik (*hereditary information*) pada makhluk hidup (Watson dkk., 2013). DNA ditemukan dalam bentuk pasangan basa adeni-timin (A-T) dan sitosin-guanin (C-T). Kedua pasang basa tersebut menyusun kode genetik yang akan menentukan bentuk fisik suatu organisme. Hal ini menunjukkan bahwa tanda-tanda kekuasaan Allah SWT dapat dilihat pada tiap tingkat kehidupan, termasuk pada bagian

terkecil makhluk hidup sekalipun, yaitu di dalam sel. Allah berfirman dalam Al-Qur'an surat Fussilat ayat 53:

سُرِّيهِمْ ءَايَاتِنَا فِي الْأَفَاقِ وَفِي أَنْفُسِهِمْ حَتَّىٰ يَتَبَيَّنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ ۗ أَوَلَمْ يَكْفِ بِرَبِّكَ أَنَّهُ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ شَهِيدٌ ﴿٥٣﴾

*“Kami akan memperlihatkan kepada mereka tanda-tanda (kekuasaan) Kami di segala wilayah bumi dan pada diri mereka sendiri, hingga jelas bagi mereka bahwa Al-Qur'an itu adalah benar. Tiadakah cukup bahwa sesungguhnya Tuhanmu menjadi saksi atas segala sesuatu?”*. (QS. Fussilat: Ayat 53)

Penggalan ayat *وَفِي أَنْفُسِهِمْ* yang diterjemahkan sebagai ‘dan pada diri mereka sendiri’ menurut Abdullah (2004) dalam tafsir Ibnu Katsir, dapat dimaknai sebagai materi, campuran (senyawa) dan karakteristik menakjubkan yang membentuk tubuh manusia, sebagaimana yang diterangkan dalam ilmu anatomi modern. Karakter khas yang dimiliki oleh tiap-tiap makhluk ditentukan oleh materi genetik yang dikodekan dalam bentuk untaian DNA dan tersimpan dalam *cluster* yang disebut gen.

Pengekspresian gen menjadi protein terlebih dahulu melewati tahapan awal berupa proses replikasi. Tubuh makhluk hidup melakukan proses replikasi di dalam sel dengan sendirinya dan tanpa disadari. Para ilmuwan menjadikan proses tersebut sebagai acuan dengan demikian DNA dapat digandakan secara *in vitro*, yaitu melalui metode amplifikasi PCR. hasil Amplikon DNA yang spesifik memiliki beberapa manfaat, salah satunya dalam proses identifikasi organisme secara genotip. Sebagaimana firman Allah dalam surat Ali ‘Imran ayat 190-191 sebagai berikut.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقَعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا تُسَبِّحُكَ فَقَتَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

*‘Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata). “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.” (QS. Ali-‘Imran: Ayat 190-191)*

Istilah اولول الاباب tersusun atas dua kata, yaitu اولول dan الاباب. Kata اولول merupakan bentuk jamak yang memiliki makna ‘mereka yang mempunyai’, sedangkan الاباب berarti ‘inti dari segala sesuatu’. Kata لاولي pada ayat di atas dapat dimaknai sebagai orang-orang dengan akal murni, tidak tertutup kabut yang dapat menimbulkan kerancuan dalam berpikir (Shihab, 2003). Mereka adalah orang-orang yang bersedia menggunakan akal pikirannya untuk merenungkan dan menganalisa peristiwa serta fenomena alam, sehingga sampai pada bukti kebesaran dan kekuasaan Allah Yang Maha Esa (Departemen Agama Republik Indonesia, 1993). Allah berfirman dalam Al-Qur’an surat Az-Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعٌ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُّخْتَلِفًا أَلْوَنُهُ ثُمَّ يَهِيجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطًا مَّا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرَىٰ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

*“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanaman-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.” (QS. Az-Zumar: Ayat 21)*

Makna ayat di atas berdasarkan tafsir Jalalain (2010) bahwa Allah yang menurunkan air dari langit lalu mengalirkannya dalam bentuk mata air di dalam perut bumi. Dia kemudian menumbuhkan tanaman dengan bentuk yang beragam, yang menjadi kering dan kuning setelah sebelumnya hijau. Selanjutnya, dijadikan-Nya tanaman itu hancur berkeping-keping. Sungguh, dalam proses perpindahan dari satu kondisi ke kondisi lain itu terdapat peringatan bagi orang-orang yang mau berpikir.

Proses hancurnya komponen organik (dekomposisi) di alam merupakan proses kompleks yang melibatkan peran konsortium mikroorganisme. Menurut Deacon (2006), jamur merupakan salah satu organisme heterotrof yang hidup sebagai dekomposer dengan memanfaatkan senyawa organik *preform* yang didapati di lingkungan tempatnya tumbuh. Mikroorganisme ini umumnya berperan sebagai pengurai senyawa organik kompleks, seperti LDPE, menjadi senyawa yang lebih sederhana. Dekomposisi polimer LDPE oleh jamur mengakibatkan fragmentasi polimer menjadi monomer polietilen yang dapat diasimilasi sel jamur. Proses mineralisasi oleh isolat jamur menghasilkan H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub> yang dapat dilepaskan ke lingkungan tanpa berpotensi menimbulkan polusi lanjutan pada tanah (Gewert dkk., 2015).

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berikut adalah kesimpulan yang dapat ditarik berdasarkan hasil penelitian.

1. Isolat HJL M4LK1 memiliki aktivitas degradasi LDPE sebesar  $13,33 \pm 0,9428\%$  selama 40 hari masa inkubasi.
2. Berdasarkan sekuen gen ITS rDNA, HJL M4LK1 memiliki kedekatan secara genetik dengan *Geotrichum candidum* voucher R. Kirschner strain RRK17 dengan nilai similariti sebesar 100%.

#### 5.2 Saran

1. Kadar air yang tinggi dalam miselium jamur dapat menurunkan konsentrasi buffer lisis sehingga dapat dilakukan preparasi sampel dengan nitrogen cair pada tahap awal isolasi DNA. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air berlebih dalam isolat.
2. Analisis gravimetri terhadap substrat LDPE disarankan dilakukan setiap interval 1 bulan selama 3 bulan untuk mengetahui masa inkubasi optimum isolat HJL28 dalam mendegradasi substrat.
3. Aktivitas degradasi isolat jamur terhadap LDPE dapat ditingkatkan dengan melakukan *treatment* terhadap substrat dalam bentuk iradiasi sinar UV, sebelum dilakukan inkubasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aamir, S., Sutar, S., Sing S. K., & Baghela, A. (2015). A Rapid and Efficient Method of Fungal Genomic DNA Extraction Suitable for PCR Based Molecular Methods. *Plant Pathology & Quarantine*, 5(2014), 74–81. <https://doi.org/10.5943/ppq/5/2/6>
- Abdullah. (2004). Tafsir Ibnu Katsir. Kairo: Muassah Daar al-Hilal
- Ali, S. S., Qazi, I. A., Arshad, M., Khan, Z., Voice, T. C. & Mehmood, C. T. (2016). Photocatalytic Degradation of Low Density Polyethylene (LDPE) Films Using Titania Nanotubes. *Environment Nanotechnology: Monitoring Management*, 5(2016), 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.01.001>
- Almakarem, A., Heilman, K. L., Conger, H. L., Shtarkman, Y. M. & Rogers, S. O. (2012). Extraction of DNA from Plants and Fungus Tissues *in situ*. *BMC Research Notes*, 5(2012), 266. PMID: PMC3505157
- Al-maraghi, A. M. (1989). Terjemah Tafsir Al-Maraghi. Semarang: Thoaha Putra
- Ainiyah, D. N. & Shovitri, M. (2013). Bakteri Tanah Sampah Pendegradasi Plastik dalam Kolom *Winogradsky*. *Jurnal Pomit Sains*, 2(1), 1-4. ISSN: 2337-3539
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S. & Uppara, P. (2008). Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(1), 9-22
- Awasthi, S., Srivastava, N., & Singh, T. (2017). Biodegradation of Thermally Treated Low Density Polyethylene by Fungus *Rhizopus Oryzae* NS 5. *Biotechnology*, 7(1), 73-81. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0699-4>
- Bayry, J., Amanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M. & Latge, J. P. (2012). Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., & Gardens, R. B. (2013). ITS1 Versus ITS2 as DNA Metabarcodes for Fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 18-24. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>
- Brown, T. A. (2007). *Genoms 3*. New York: Garland Science Publishing
- Chen, B. & Janes, H. W. (2002). PCR Cloning Protocols. New Jersey: Humana Press
- Cheng, X., Chen, X., Su, X., Zhao, H., Han, M., Bo, C., Ning, K. (2014). Application Note DNA Extraction Protocol for Biological Ingredient

Analysis of Liuwei Dihuang Wan. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12(3), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.03.002>

Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology*. Edisi Keempat. UK: Blackwell Publishing

De Beeck, M. O., Lievens, B., Busschaert, P., Decklerck, S., Vangronsveld, J. & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS One*, 9(6), e97629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>

Deepika, S., & Jaya, M. R. (2015). Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences Biodegradation Of Low Density Polyethylene By Microorganisms From Garbage Soil. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(1), 15-21. ISSN: 2320-8694

Departemen Agama Republik Indonesia. (1993). Tafsir Al-Qur'an. Semarang: PT Citra Effhar

Desmukh, R., Jagtap, S., Mandal, M. & Mandal, S. K. (2016). Purification, Biochemical Characterization and Structural Modelling of Alkali-stable Beta-1,4-Xylan Xylanhidrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 Isolated from Soil. *BMC Biotechnology*, 16(1), 20-27, <http://doi.org/10.1186/s12896-016-0242-2>

EPA. (2016, 1 November). Confronting Plastic Pollution One Bag at a Time. Diakses pada 11 Desember 2017 dari <https://blog.epa.gov/blog/2016/11/confronting-plastic-pollution-one-bag-at-a-time>

Esmaeili, A., Pourbabaee, 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* , 8(9), e71720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071720>

Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S. & Rahayu, S. Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis. Erlangga: Jakarta

Fernandez, L. dkk. (2008). Alteration of Substrate Specificity of *Galactomyces geotrichum* BT107 Lipase 1 on Eicosapentaenoic Acid-rich Triglycerides. *Biocatalyst and Biotransformation*, 26(2008), 296-305

Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (2016). Microbial Degradation of Low-Density Polyethylene ( LDPE ) by *Aspergillus clavatus* Strain JASK1 Isolated from Landfill Soil. *3 Biotechnology*, 6(2016), 52. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0394-x>

Gariyban, L & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://dx.doi/10.1038/jid.2013.1>

- Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. (2017). Production, Use and Fate of All Plastics Ever Made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gewert, B., Plassmann, M. M. & MacLeod, M. (2015). Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in The Marine Environment. *Environmental Science: Processes Impacts*, 17(2015), 1513. <https://doi.org/10.1039/c5em00207a>
- Gontia-mishra, I., Tripathi, N., & Tiwari, S. (2014). A Simple and Rapid DNA Extraction Protocol for Filamentous Fungi Efficient for Molecular Studies. *Indian Journal of Biotechnology*, 13(4), 536–539. ISSN: 0975-0967
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . Edisi Keempat. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Grygier, A., Myszka, K. & Rudzinska. (2017). *Galactomyces geotrichum* – Moulds from Dairy Products with High Biotechnological Potential. *Acta Scientiarum Polonorum*, 16(1), 5-16, <https://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2017.0445>
- Harun, M. Y. (2010). Tafsir al-Jalalain. Surabaya: Pustaka ELBA
- Heather J. M. & Chain, B. (2016). The Sequence of Sequencers: the History of Sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hebert, P. D. & Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859. <http://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Jia, Y., Wamishe, Y. A. & Zhou, B. (2014). An Expedited Method for Isolation of DNA for PCR from *Magnaporthe oryzae* Stored on Filter Paper. *The Crop Journal*, 2(5), 267-271. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.06.003>
- Khan, S. dkk. (2017). Biodegradation of Polyester Polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 225(2017), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>
- Legiastuti, T. S. & Aminingsih, T. (2012). Identifikasi Cendawan Endofit Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 8(2), 31-36. ISSN: 0215-7950
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal Visualized Experiments*, 63(2012), 3998. PMID: PMC4846334

- Lee, P. Y. dkk. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for The Separation of DNA Fragments. *Journal Visualized Experiments*, 62(2012), 3923. <https://dx.doi.org/10.3971/3923>
- Malpas, D. B. (2010). *Downstream Aspects of Polyethylene*. New York: Scrivener Publishing
- Marjangkasa, J. M., Lakaniemia, A. M., Koskinenb, P. E. P., Change, J. S. & Puhakkaa, J. A. (2014). Lipid Production by Eukaryotic Microorganism Isolated from Palm Oil Mill Effluent. *Biochemical Engineering Journal*, 99(2), 324-329, <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.006>
- Merina, P. D. (2014). Microbial Deterioration of Low Density Polyethylene by *Aspergillus* sp. and *Fusarium* sp. *International Journal of Chemistry Technology Research*, 6(1), 299-305
- Mourellos, C. A., Malbrain, I., Gomez, D. M., Balatti, P. A., Ghiringhelli, P. D. & Lori, G. A. (2016). Comparison of The Efficiency of 5 Methods for Fungal DNA Extraction from Crop Debris and Evaluation of Its Suitability for the Amplification of *Fusarium graminearum* by PCR. *Crop Protection*, 82(1), 7-9.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A. & Purwantara, A. (2011). Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA Ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan Jamur Sekerabat Pembanding. *Menara Perkebunani*, 79(1), 1-5.
- Nuryadi, W., Rakhmawati, A. & Prihatini, I. (2016). Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Pohon Sengon Prevenan Kepulauan Solomon berdasarkan Morfologi dan Molekuler Analisis rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*). *Jurnal Biologi*, 5(6), 15-27
- Paco, A. dkk. (2017). Biodegradation of Polyethylene Microplastics by the Marine Fungus *Zalerion maritim*, 586(1), 10-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>
- Prabha, T. R., Revathi, K., Vinod, M. S., Shanthakumar, S. P. & Bernard, P. (2013). A Simple Method for Total Genomic DNA Extraction from Water Moulds. *Current Science*, 104(3), 345-347
- Pramilla, R. & Ramesh, K. V. (2011). Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Fungi Isolated from Municipal Landfill Area. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 131-136
- Raaman, N., Rajitha, N., Jayshree, A. & Jegadesh, R. (2012). Biodegradation of Plastic by *Aspergillus* sp. Isolated from Polyethylene Polluted Sites Around Chennai. *Journal Academia Industrial Research*, 1(6), 313-316

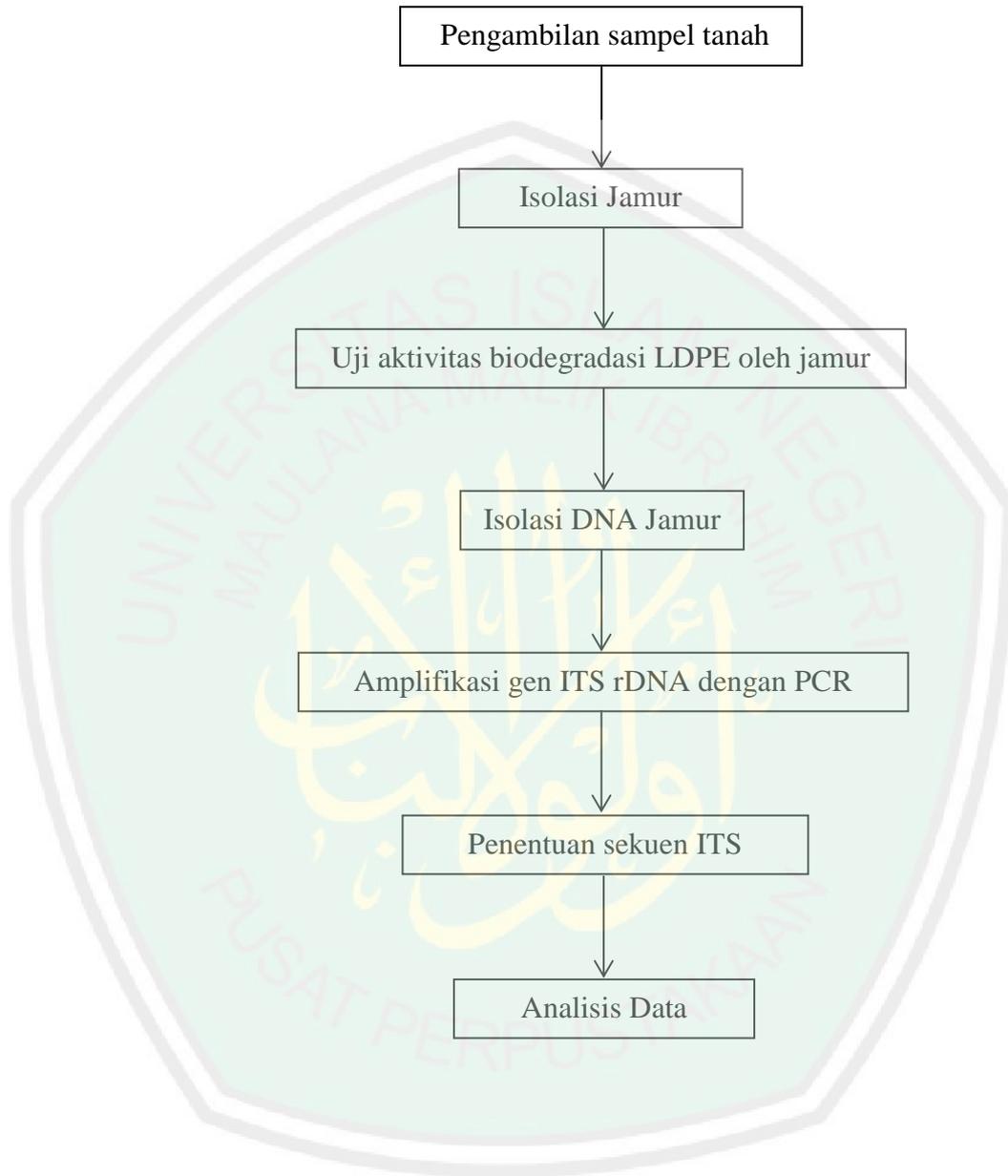
- Rahayu, F., Saryono, Nugroho, T. T. (2015). Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. *Jurnal of Mahasiswa FMIPA*, 2(1), 100-106
- Raja, A. H., Miller, A. N., Pearce, C J. & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Product Research Community. *Journal of Natural Product*, 80(3), 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rakhmana, S., Saryono, Nugroho, T. T. (2015). Ekstraksi DNA dan Amplifikasi ITS rDNA Isolat Fungi Endofit LBKURCC67 Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal of Mahasiswa FMIPA*, 2(1), 145-151
- Rambe, E., Restuhasi, Nugroho, T. T. (2015). Amplifikasi DNA dan Sekuensing Daerah Daerah ITS1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22. *Indonesia Chemica Acta*, 4(2), 41-47
- Rampersad, S. N. (2014). ITS1, 5,8S and ITS2 Secondary Structure Modelling for Intra-specific Differentiation among Species of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* Species Complex. *Springerplus*, 3(1), 684-696.
- Rapley, R. (2007). *Molecular Biology and Biotechnology*. Edisi Kelima. London: Royal Society of Chemistry
- Restrepo-Florez, J., Bassi, A. & Thompson, M. R. (2014). Microbial Degradation and Deterioration of Polyethylene: A Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88(1), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Sahebnazar, Z., Shojaosadati, S. A., Mohammad-Taheri, M. & Nosrati, M. (2010). Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Isolated Fungi in Solid Waste Medium. *Waste Manage*, 30(1), 396-401
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Rober, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *United States National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sen, S. K., & Raut, S. (2015). Microbial Degradation of Low Density Polyethylene ( LDPE ): A Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological Degradation of Plastics : A Comprehensive Review. *Biotechnology Advances*, 26(2008), 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shihab, M. Q. (2003). Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an. Jakarta: Lentera Hati.

- Shing, B. & Sharma, N. (2008). Mechanistic Implications of Plastic Degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(2007), 561-584. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Surzycki, S. (2003). *Human Molecular Biology Laboratory*. USA: Blackwell Science Ltd.
- Sowmya, H. V., Ramalingappa & Krishnappa, M. (2012). Degradation of Polyethylene by *Chaetomium* sp. And *Aspergillus Flavus*. *International Journal of Recent Scientific Research*, 3(6), 513-517. ISSN: 0976-3031
- Sowmya, H. V., Ramalingappa, Krishnappa, M., Thippeswamy, B. (2014). Low Density Polyethylene Degrading Fungi Isolated from Local Dumpsite of Shivamogga District. *International Journal of Recent Scientific Research*, 2(2), 39-43. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v2i2.2877>
- Sowmya, H. V., Ramalingappa, Krishnappa, M., Thippeswamy, B. (2015). Degradation of Polyethylene by *Penicillium simplicium* Isolated from Local Dumpsite of Shivamogga District. *Environment, Development and Sustainability*, 17(4), 731-745. <https://doi.org/10.1007/s10668-014-9571-4>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599, <http://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tan, C. P. & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedical and Biotechnology*, 2009(2009), 574398. <https://dx.doi.org/10.1155/2009/574398>
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U. & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Science*, 10(9), 3722-3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Turan, C., Nanni, I. M., Brunelli, A. & Collina M. (2015). New Rapid DNA Extraction Method with Chelex from *Venturia Inaequalis* Spores. *Journal of Microbiological Methods*, 115(2015), 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.06.005>
- Umesha, S., Manukumar, H. M. & Raghava, S. (2016). A Rapid Method for Isolation of Genomic DNA from Food-borne Fungal Pathogens. 3 *Biotechnology*, 6(1), 123. <https://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0436-4>

- Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of Soil Fungal Community DNA Using The ITS86F and ITS4 Primers. *FEMS Microbiology Letter*, 296(2009), 91-96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01621.x>
- Volke-Sepulveda, T., Saucedo-Castaneda, G., Gutierrez-Rojas, M., Manzur, M. & Favella-Torres, E. (2002). Thermally Treated Low Density Polyethylene Biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Polymers Science*, 83(1), 305-314
- Watson, J. D. dkk. (2014). *Molecular Biology of The Gene*. Edisi Ketujuh. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. San Diego: Academic Press
- Wibowo, M. S. (2010). Elektroforesis. Bandung: ITB Press
- Yingben, W., Yuelin, H., Hongmei, Y., Wei, C., Zhen, W., Lijuan, X. & Aiqun, Z. (2012). Isolation of Phosphate Solubilizing Fungus and Its Application in Solubilisation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(1), 1144-1151, <https://dx.doi.org/103923/pjbs.2012.1144.1151>
- Zhang, Y. J., Zhang, S., Liu, X. Z., Wen, H. A., & Wang, M. (2010). A Simple Method of Genomic DNA Extraction Suitable for Analysis of Bulk Fungal Strains. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2010), 114-118. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x>
- Zheng, R. S., Wang, W. L., Tan, J., Xu, H., Zhan, R. T. & Chen, W. W. (2017). An Investigation of Fungal Contamination on The Surface of Medicinal Herbs in China. *Chinese Medicine*, 12(1), 2. PMID: PMC5209813

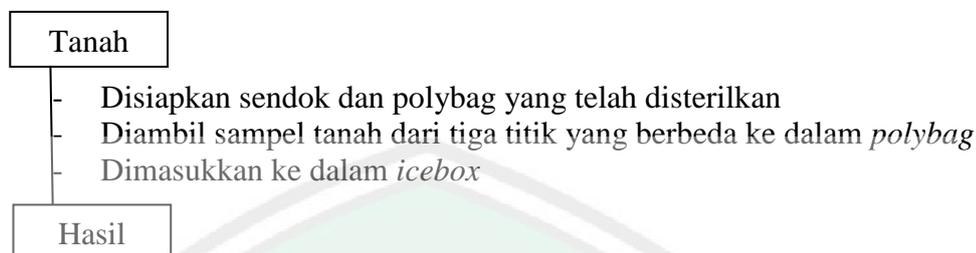
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian

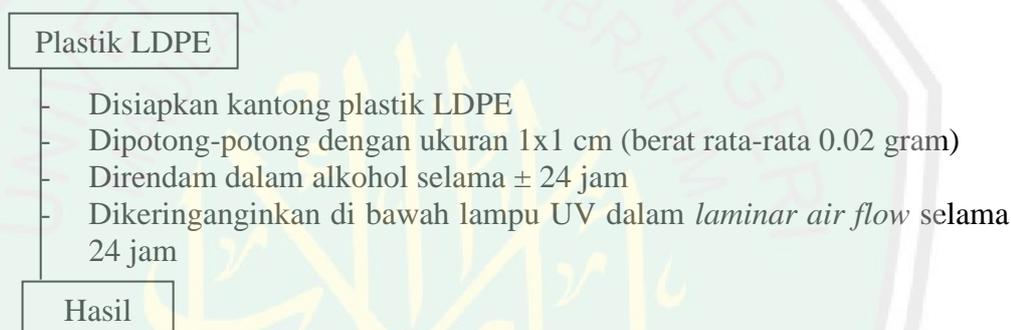


## Lampiran 2. Diagram Alir

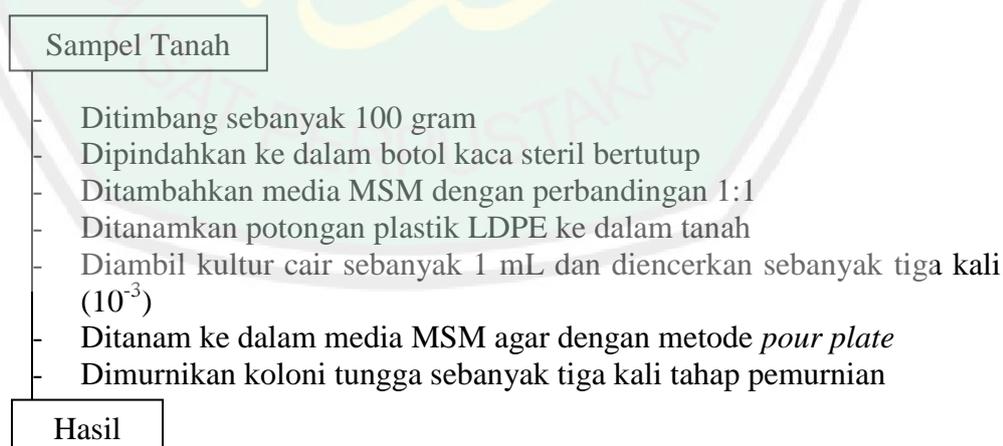
### 1. Pengambilan Sampel Tanah



### 2. Preparasi Plastik LDPE



### 3. Isolasi Jamur Pendegradasi LDPE



#### 4. Uji Biodegradasi LDPE

MSM *broth* (0,5% glukosa)

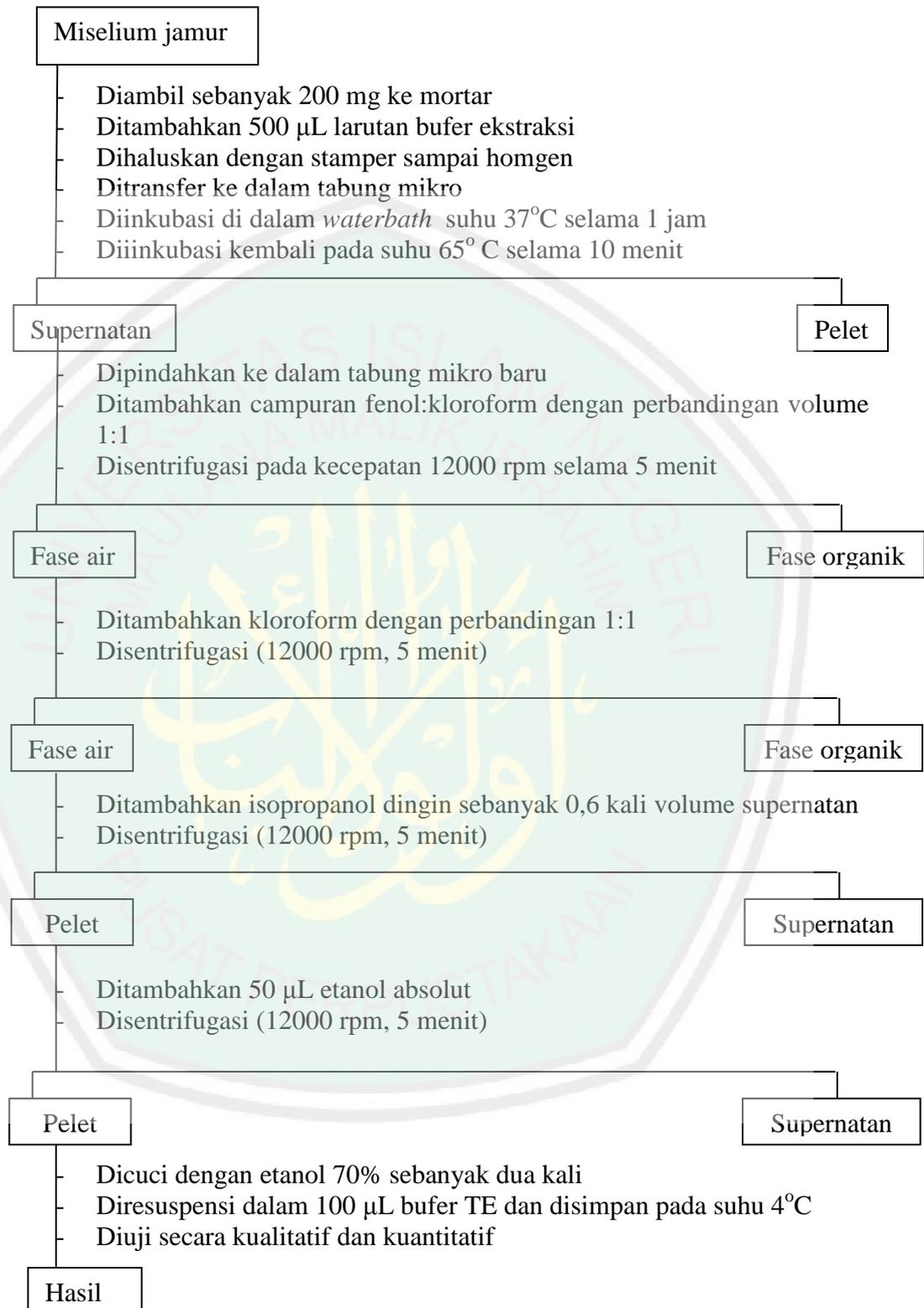
Dimasukkan 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL  
Disterilkan

Isolat Jamur

Diinokulasikan ke dalam media (triplo)  
Ditambahkan substrat LDPE yang telah dipreparasi sebelumnya  
Ditutup menggunakan *plastic wrap*  
Diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 40 hari  
Dilakukan penimbangan berat plastik LDPE akhir  
Ditentukan isolat jamur dengan aktivitas degradasi LDPE paling tinggi

Hasil

## 5. Isolasi DNA dengan Metode CTAB



## 6. Elektroforesis Gel Agarosa

### 6.1 Pembuatan gel agarosa 1%

#### Agarosa

- Ditimbang sebanyak 0,3 gram
- Dilarutkan dalam 30 mL bufer TAE 1X
- Dimasukkan dalam *microwave* hingga larut
- Didinginkan hingga suhu  $\pm 60^{\circ}\text{C}$
- Ditambahkan 1-2  $\mu\text{L}$  EtBr
- Dituang ke dalam *tray* dan dipasang *combs*
- Dibiarkan 60 menit hingga gel mengeras
- Dilepas *combs*

#### Gel agarosa 1%

### 6.2 Elektroforesis gel agarose

#### Sampel

- Dimasukkan ke dalam tank elektroforesis
- Dituangkan bufer TAE sampai keseluruhan gel terendam
- Dimasukkan 3  $\mu\text{L}$  sampel DNA : *loading dye buffer* (2:1)
- Dimasukkan marker 100 bp
- Dirunning selama 60 menit dengan tegangan 65 volt
- Diletakkan di bawah UV transilluminator untuk diamati

#### Hasil

### Lampiran 3. Pembuatan Reagen

#### 1. Media *Mineral Salt* (MSM) Agar

Mineral dilarutkan dalam 100 mL sesuai komposisi berikut; 0,25 gram  $K_2HPO_4$ , 0,02 gram  $KH_2PO_4$ , 0,05 gram NaCl, 0,001 gram  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,1 gram  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,01 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,0005 gram  $FeSO_4$  dan 1 gram glukosa. Agar ditambahkan sebanyak 2 gram untuk membuatnya menjadi media padat. Larutan dipanaskan hingga seluruh mineral terlarut, kemudian disterilkan. Media dituangkan ke dalam petri dan ditunggu hingga mengeras.

#### 2. Media *Mineral Salt* (MSM) Broth

Media dibuat dengan komposisi seperti MSM agar tanpa ditambahkan agar *powder*. larutan dipanaskan hingga seluruh mineral terlarut, kemudian disterilkan. MSM *broth* siap digunakan sebagai media inokulasi.

#### 3. CTAB/NaCl (2%/0,7 M & 1,5 M)

Larutan CTAB/NaCl dibuat dengan menimbang CTAB sebanyak 0,02 gram ke dalam tabung mikro dan ditambahkan 140  $\mu$ L NaCl 5 M. Akuades steril ditambahkan hingga volume total larutan menjadi 1 mL. Tabung mikro diketuk-ketuk sampai CTAB terlarut secara keseluruhan tanpa menimbulkan busa. Prosedur yang sama dilakukan untuk membuat CTAB/NaCl 1,5 M dengan perubahan pada volume NaCl yang ditambahkan ke dalam CTAB, yaitu sebanyak 300  $\mu$ L.

#### 4. Bufer TE, pH 8

Pembuatan bufer TE dilakukan dengan melarutkan 1,211 gram Tris-base ke dalam 50 mL ddH<sub>2</sub>O. pH larutan dimonitor sambil ditambahkan HCl pekat sampai pH larutan menjadi 8. Tris-Cl dipindahkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan 2 mL EDTA 0,5 M (pH 8), kemudian ditandabatkan dengan ddH<sub>2</sub>O hingga total larutan menjadi 100 mL.

### 5. 10X Bufer TAE, pH 8

Tris-base sebanyak 48,4 gram dilarutkan dalam 20 mL EDTA 0,5 M (pH 8,0). Ditambahkan 11,44 mL asam asetat glasial, kemudian ditandabatkan dengan ddH<sub>2</sub>O hingga volumer larutan akhir mencapai 1L.

### 6. PCR Master Mix

**Tabel 4.1** Komposisi reagen dalam setiap 50  $\mu$ L master mix

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	Konsentrasi akhir
<i>Water, nuclease-free</i>	38,1	-
10X Vibuffer A	5,0	1X
2 mM dNTP mix	2,0	0,08 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5	1,5 mM
10 $\mu$ M primer <i>forward</i>	1,0	0,2 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer <i>reverse</i>	1,0	0,2 $\mu$ M
DNA control (5 ng/ $\mu$ L)	1,0	5 ng
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 u/ $\mu$ L)	0,4	2 unit
<b>Total Volume</b>	<b>50,0</b>	

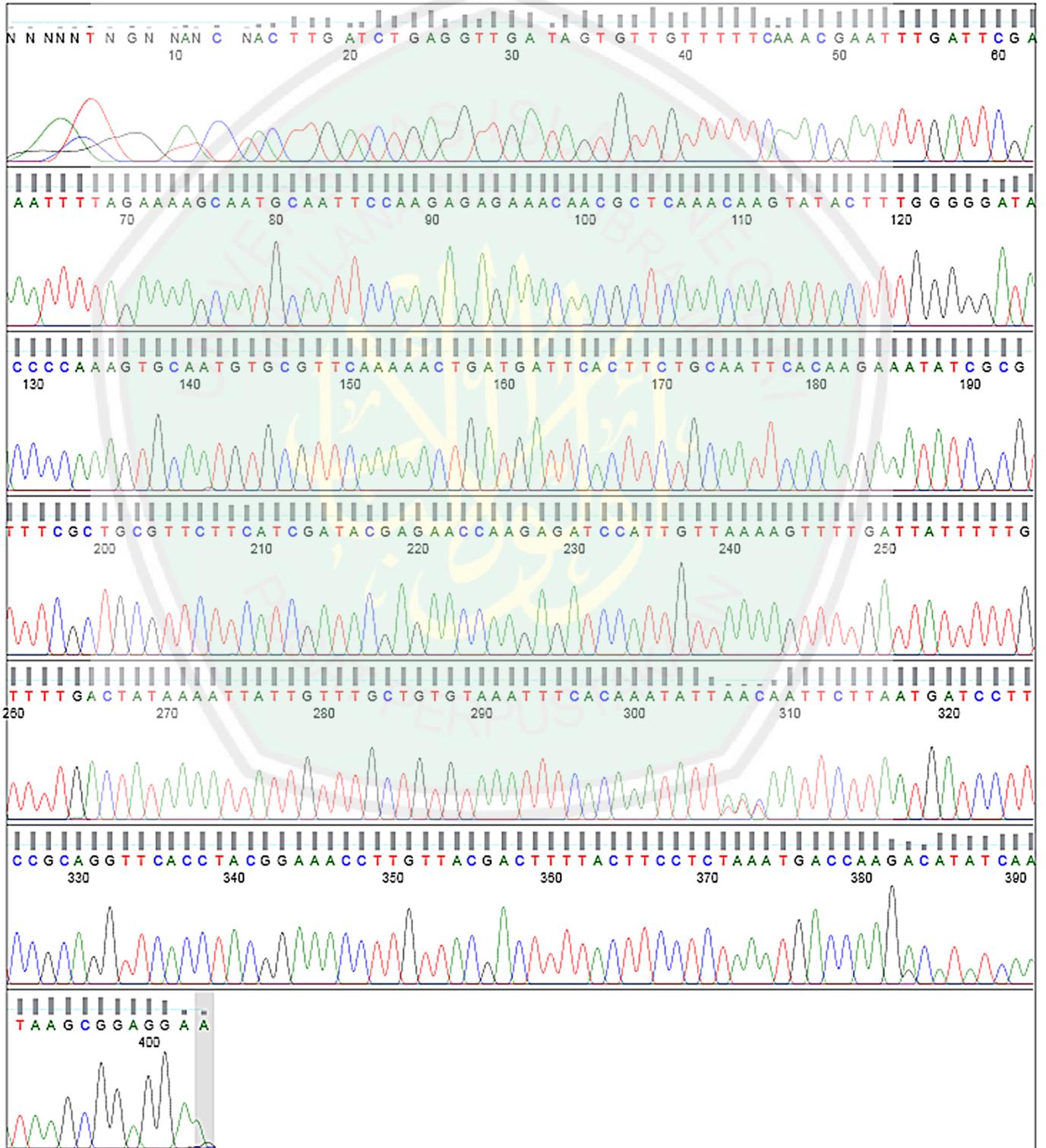
### Lampiran 4. Spektra DNA Hasil *Sequencing* Metode Dideoksi Sanger

File: 1st\_BASE\_3301984\_ITS-4.ab1

Geospiza  
www.geospiza.com

Sample Name: 3301984\_Aspergillus\_Sp\_1\_ITS-4  
Mobility: KB\_3730\_POP7\_BDTv3.mob  
Spacing: 14.9982  
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1580, C = 1056, G = 1171, T = 1138  
Lane/Cap#: 48  
Matrix: n/a  
Direction: Native

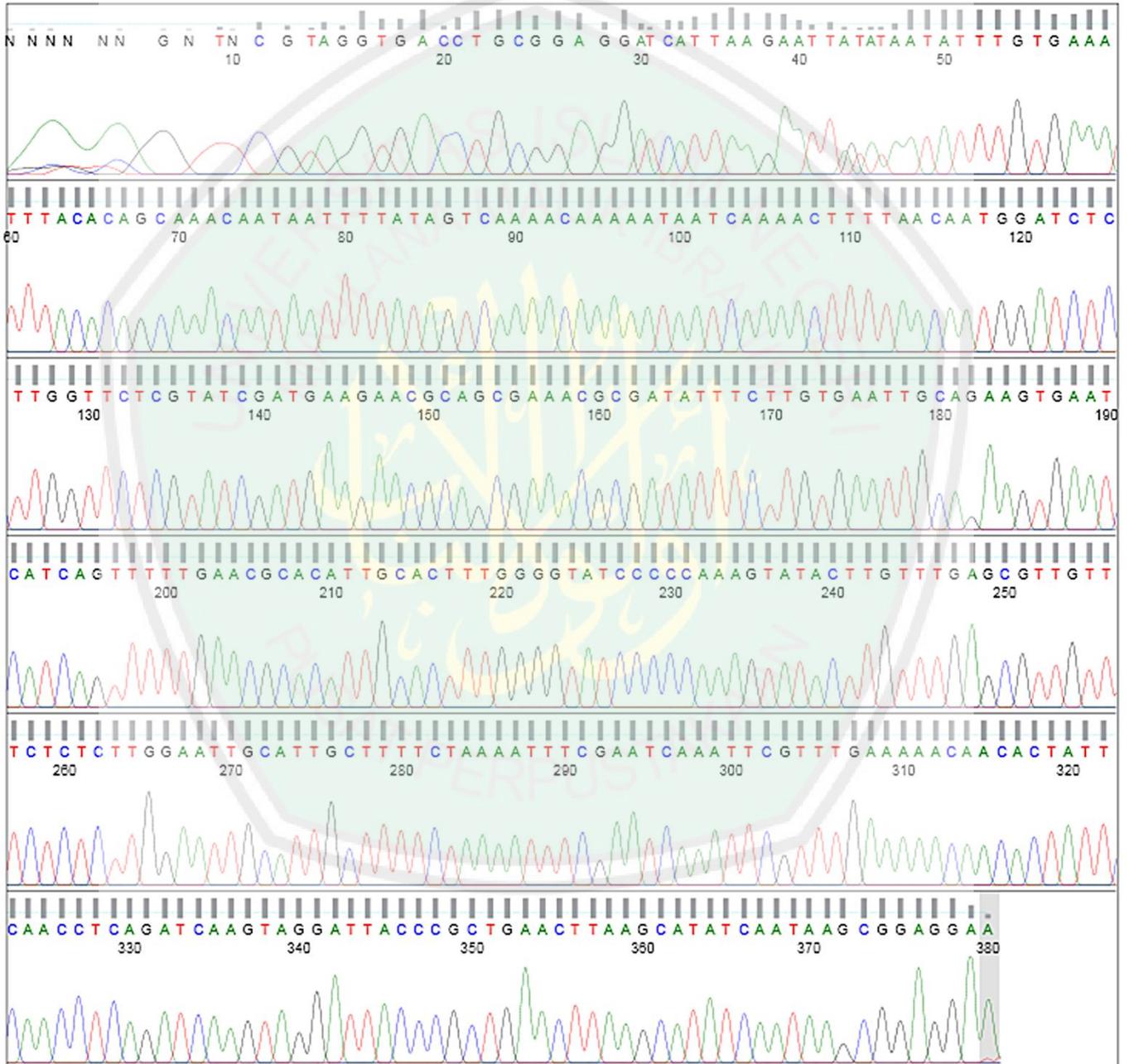


File: 1st\_BASE\_3301983\_ITS-1.ab1


  
www.geospiza.com

Sample Name: 3301983\_Aspergillus\_Sp\_1\_ITS-1  
 Mobility: KB\_3730\_POP7\_BDTv3.mob  
 Spacing: 15.0054  
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1497, C = 899, G = 1110, T = 963  
 Lane/Cap#: 33  
 Matrix: n/a  
 Direction: Native



**Lampiran 5. Hasil *alignment* sekuen ITS rDNA isolat HJL28 dan sekuen pembandingan menggunakan metode *align by ClustalW* program MEGA6**

```

HJL28
KR815826.1
JN974288.1
KY103456.1
GQ458034.1
KF010777.1
AJ279445.1
MF782775.1
KT828737.1
KJ706920.1
KT336518.1
GQ376093.1
AF157596.1
-----CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCC

```

```

HJL28
KR815826.1
JN974288.1
KY103456.1
GQ458034.1
KF010777.1
AJ279445.1
MF782775.1
KT828737.1
KJ706920.1
KT336518.1
GQ376093.1
AF157596.1
-----CCTCCGCTTATTGATATG
GGATTGATTAAGTGGAGAGGGCAACTTTTCTGGTTGAACGAGAAGCTAGTCAA
GGATTGATTAAGTGGAGAGGGCAACTTTTCTGGTTGAACGAGAAGCTAGTCAA
-----AA
GGATTGATTAAGTGGAGAGGGCAACTTTTCTGGTTGAACGAGAAGCTAGTCAA

```

```

HJL28
KR815826.1
JN974288.1
KY103456.1
GQ458034.1
KF010777.1
AJ279445.1
MF782775.1
KT828737.1
KJ706920.1
KT336518.1
GQ376093.1
AF157596.1
TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
-----TGTTTCCGTAGGTGAAC
TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
---TGGTTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
CTTCGGTAGGTTAACATGAGGAAGGATCAC-----TTCCGTAGGTGAAC
TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
----GGAAGTAAAAGTC--GTAACAAGGTT-----TTCCGTAGGTGAAC
-----GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC

```

```

HJL28
KR815826.1
JN974288.1
KY103456.1
GQ458034.1
KF010777.1
AJ279445.1
MF782775.1
KT828737.1
KJ706920.1
KT336518.1
GQ376093.1
AF157596.1
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTRWTAATATTTGTGAAATTTACACAGCMA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTATGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACCACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTGATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTGATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTATGAATTATAAATATTTGTGAAATTTACCACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTAGAATTGATAAATATTTGTGAAATTTACACAGCAA
CTGCGGAAGGATCATTATGAATTAWWAATATTTGTGAAATTTACCACAGCCA

```



GQ458034.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 KF010777.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 AJ279445.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 MF782775.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 KT828737.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 KJ706920.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 KT336518.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 GQ376093.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA  
 AF157596.1 TAAAATTTTGAATCAAATTCGTTTAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCA

HJL28 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----  
 KR815826.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA-----  
 JN974288.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 KY103456.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 GQ458034.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 KF010777.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 AJ279445.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 MF782775.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 KT828737.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 KJ706920.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 KT336518.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 GQ376093.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-  
 AF157596.1 AGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC-

HJL28 -----  
 KR815826.1 -----  
 JN974288.1 AACAGGGATT-----  
 KY103456.1 AACAGGGATT-----  
 GQ458034.1 AACAGGGATT-----  
 KF010777.1 AACAGGGATT-----  
 AJ279445.1 -----  
 MF782775.1 -----  
 KT828737.1 GCATATCATT-----  
 KJ706920.1 AACAGGGATT-----  
 KT336518.1 -----  
 GQ376093.1 -----  
 AF157596.1 AACAGGGATT-----

#### Keterangan:

Penentuan masing-masing daerah 18S, ITS1, 5,8S dan 28S dilakukan berdasarkan sekuen dari *Galactomyces candidum* strain CBS 557.83 (JN974288.1)

Warna coklat : daerah 18S  
 Warna merah muda : daerah ITS1  
 Warna biru : daerah 5,8S  
 Warna ungu : daerah ITS2  
 Warna hijau : daerah 28S