

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK LDPE HASIL ISOLASI DARI TPA PISANG
KIPAS MALANG**

SKRIPSI

Oleh:
HANIF NUR ROZAQ
NIM. 16630009



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK LDPE HASIL ISOLASI DARI TPA PISANG
KIPAS MALANG**

SKRIPSI

Oleh:
HANIF NUR ROZAQ
NIM. 16630009

Dijukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri 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
2020

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK LDPE HASIL ISOLASI DARI TPA PISANG
KIPAS MALANG**

SKRIPSI

Oleh:
HANIF NUR ROZAQ
NIM. 16630009

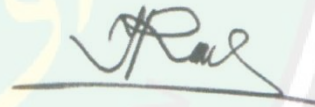
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 23 Desember 2020

Pembimbing I

Pembimbing II



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



Erna Herawati, M.Pd
NIDT. 19760723 20180201 2 222

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



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

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK LDPE HASIL ISOLASI DARI TPA PISANG
KIPAS MALANG**

SKRIPSI

Oleh:
HANIF NUR ROZAQ
NIM. 16630009

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 Desember 2020

| | | |
|---------------------------|---|--|
| Penguji Utama | : Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006 | (..... ) |
| Ketua Penguji | : Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067 | (..... ) |
| Sekretaris Penguji | : Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIP. 19750410 200501 2 009 | (..... ) |
| Anggota Penguji | : Erna Herawati, M.Pd NIDT. 19760723 20180201 2 222 | (..... ) |

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan**


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

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hanif Nur Rozaq
NIM : 16630009
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Aktivitas dan Identifikasi Genotip 16S rRNA Bakteri
Pendegradasi Plastik LDPE Hasil Isolasi dari TPA Pisang
Kipas Malang

menyatakan dengan sebenarnya bahwa naskah skripsi yang saya tulis adalah hasil penelitian saya sendiri tanpa adanya rekayasa data, pemikiran, serta tulisan orang lain yang saya klaim sebagai hasil pemikiran maupun tulisan saya pribadi, kecuali dengan adanya cantuman sumber yang saya cuplik pada daftar pustaka. Apabila suatu hari terdapat bukti atau mampu dibuktikan bahwasannya skripsi yang saya merupakan hasil plagiarisme, maka saya siap menerima sanksi atas perbuatan yang saya lakukan.

Malang, 30 Desember 2020
Yang membuat pernyataan,



Hanif Nur Rozaq
NIM.16630009

HALAMAN PESEMBAHAN

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan kesehatan serta kemampuan dalam melaksanakan serangkaian perjalanan kehidupan dalam mengenyam bangku sekolah. Tak lupa, sholawat serta salam yang selalu terpanjatkan kepada Nabi akhir zaman yang telah memberikan cahaya di seluruh elemen kehidupan, Nabi Muhammad SAW. Salah satu cendekiawan Indonesia, Almarhum Bapak Bacharuddin Jusuf Habibie berkata

"Dimanapun engkau berada selalu jadi yang terbaik dan berikan yang terbaik dari yang bisa kau berikan"

Atas dasar itulah saya mendedikasikan karya ini untuk orang-orang yang saya cintai sepenuh hati saya,

Bapak Nuryadi dan Ibu Sri Mulyowati yang tak hentinya melangitkan ribuan doa dalam sujud panjang mereka. Senantiasa memberikan semangat, dukungan, serta perhatian. Perjuangan ini saya persembahkan sebagai kado terindah untuk mereka di hari kelahiran saya dan pengujuh tahun 2020.

Adikku, Agniya Nur Rozaq yang menjadi peri kecil dalam keluarga dan membawa kebahagiaan serta tawa dalam keluarga. Semoga kelak mampu menjadi anak yang shalihah dan menjadi aset berharga bagi ayah dan ibu.

Panutan saya selama berada di tanah rantau, Bapak Bambang Purwanto, Ibu Eny Yulianti, serta keluarga. Beliaulah yang menjadi orang tua kedua saya selama saya tinggal di Pondok Pesantren Roudhotul Jannah yang selalu memberikan semangat serta perhatian melalui nasihat-nasihat baik di bidang agama maupun kesehatan.

Semua guru dan dosen yang telah ikhlas mengajarkan semua ilmunya tanpa kenal rasa lelah, khususnya Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P serta Ibu Dewi Yuliani, M.Si yang telah banyak meluangkan waktu, membantu, membimbing, serta membukakan pintu gerbang seluas-luasnya bagi saya untuk menyelami banyak hal baru terutama bidang Biokimia hingga menjadi seorang sarjana.

Untukmu, Rifqi Nasirun Nafis yang telah menemani, memberikan banyak nasihat untuk menjadi lebih kuat dan tegar menghadapi suatu masalah, serta semangat dalam menjalani arus kehidupan. Semoga Allah memberikan yang terbaik disetiap langkah serta untai doamu dan doaku.

Sahabat serta teman-teman khususnya Kak Mufliha, Atika Masrihanah, Niswatul Azizah, Diya Arifiya, dan Nisa Anisatin Qoimah yang selalu menemani dalam keadaan susah dan senang yang telah menjadi sahabat pelipur lara serta yang selalu menebar tawa di tengah kepayahan menelusuri berbagai proses pembelajaran.

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Penulis panjatkan puji syukur keharidat Allah SWT yang telah memberi penulis kesempatan untuk senantiasa memperbaiki diri serta bermuhasabah dengan semua waktu serta kesempatan yang Allah SWT berikan. Sungguh, karena sifat Rahman dan Rahim-Nya penulis diberikan kemudahan untuk dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “ **UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI GENOTIP 16S rRNA BAKTERI PENDEGRADASI PLASTIK LDPE HASIL ISOLASI DARI TPA PISANG KIPAS MALANG**”

Ribuan shalawat serta salam senantiasa terpanjatkan untuk baginda Nabi Muhammad SAW yang telah menuntun dari zaman kegelapan menuju ke zaman yang terang yaitu Agama Islam. Terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Ayah, ibu, mama, Agniya Nur Rozaq, dan semua keluarga yang telah memberikan doa, kasih sayang, serta menjadi semangat yang tiada tara
2. Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P serta Ibu Erna Herawati, M.PdI selaku pembimbing yang telah memberikan pengarahan serta kesabaran dalam menulis skripsi.
3. Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku penguji serta pembimbing yang senantiasa memberikan waktu luang untuk diskusi serta koreksi selama perjalanan menyelesaikan skripsi.
4. Ibu Eny Yulianti, M. Si selaku penguji dan pengasuh Pondok Pesantren Roudhotul Jannah yang menjadi orang tua serta senantiasa mengayomi dan memberikan saran selama menyelesaikan skripsi.

5. Rifqi Nasirun Nafis, Atika Masrihanah, Niswatul Azizah, dan rekan riset Biokimia 2016 yang telah menemani serta memberi motivasi, semangat dan doa selama pengerjaan skripsi.
8. Seluruh kawan Kimia angkatan 2016 terutama Kimia A yang saling memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

Tiada gading yang tak retak, suatu pribahasa bermakna bahwa tak ada manusia yang sempurna. Oleh karena ketidaksempurnaan tersebut, penulis meminta maaf kepada pihak yang berperan dalam penulisan naskah dan para pembaca terdapat banyak kesalahan dalam penulisan. Terakhir, dengan ridho dari Allah SWT, semoga naskah ini dapat bermanfaat bagi semua kalangan.

Malang, 22 Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN..... | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| LEMBAR ORISINALITAS | ii |
| HALAMAN PESEMBAHAN | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR TABEL..... | xi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| ABSTRAK | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| مستخلص البحث..... | xv |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 6 |
| 1.3 Tujuan | 6 |
| 1.4 Batasan Masalah..... | 6 |
| 1.5 Manfaat | 7 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1 Plastik Polietilen Berdensitas Rendah (<i>Low Density Polyethylene</i>)..... | 8 |
| 2.2 Bakteri Pendegradasi Plastik..... | 9 |
| 2.3 Identifikasi Gugus Fungsi Plastik dengan FTIR | 14 |
| 2.4 Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Plastik Secara Fenotip..... | 16 |
| 2.4.1 Pewarnaan Gram | 16 |
| 2.4.2 Endospora Bakteri | 17 |
| 2.4.3 Isolasi DNA Menggunakan <i>Vivantis Nucleic Extraction Kit</i> | 18 |
| 2.5 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa | 21 |
| 2.6 Amplifikasi DNA dengan PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) | 22 |
| 2.7 Gen Penanda Daerah 16S rRNA | 23 |
| 2.8 Analisis Sikuen DNA dan Bioinformatika..... | 24 |
| | |
| BAB III METODE PENELITIAN | 27 |
| 3.1 Waktu dan Tempat | 27 |
| 3.2 Alat dan Bahan Penelitian..... | 27 |
| 3.2.1 Alat Penelitian | 27 |
| 3.2.2 Bahan Penelitian..... | 28 |
| 3.3 Tahapan Penelitian | 28 |
| 3.4 Cara Kerja | 29 |
| 3.4.1 Pengambilan Sampel | 29 |
| 3.4.2 Preparasi Plastik LDPE | 29 |
| 3.4.3 Isolasi Bakteri Pendegradasi LDPE | 30 |
| 3.4.4 Identifikasi Bakteri Pendegradasi Plastik Secara Fenotip..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.5 Produksi Inokulum | 32 |
| 3.4.6 Uji Biodegradasi LDPE oleh Bakteri | 32 |
| 3.4.7 Identifikasi Gugus Fungsi LDPE Hasil Degradasi Menggunakan FTIR | 33 |
| 3.4.8 Isolasi DNA dengan Menggunakan Reagen Kit <i>Vivantis GF-1</i> | 33 |
| 3.4.9 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa | 34 |
| 3.4.10 Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR | 34 |
| 3.4.11 Analisa Data Hasil Sikuensing | 35 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 36 |
| 4.1 Isolasi Bakteri Pendegradasi LDPE | 36 |
| 4.2 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Biodegradasi LDPE | 39 |
| 4.3 Identifikasi Fenotip Bakteri Pendegradasi Plastik | 44 |
| 4.3.1 Pewarnaan Gram | 44 |
| 4.3.2 Pewarnaan Endospora | 45 |
| 4.4 Identifikasi Secara Genotip dan Fenotip Isolat PDB2 | 45 |
| 4.4.1 Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA | 45 |
| 4.4.2 Hasil Amplifikasi 16S rRNA dengan PCR | 47 |
| 4.4.3 Analisa bioinformatika isolat bakteri PDB2 | 49 |
| 4.5 Korelasi Materi Genetik DNA dengan Prespektif Islam | 52 |
| BAB V PENUTUP | 57 |
| 5.1 Kesimpulan | 57 |
| 5.2 Saran | 57 |
| DAFTAR PUSTAKA | 58 |
| LAMPIRAN..... | 68 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 2.1 Struktur kimia LDPE dan etilen | 9 |
| Gambar 2.2 Reaksi metabolisme bakteri aerob | 13 |
| Gambar 2.3 Spektra FTIR LDPE yang didegradasi oleh <i>Pseudomonas</i> sp..... | 15 |
| Gambar 2.4 Spektra FTIR LDPE yang didegradasi oleh <i>Bacillus cereus</i> | 15 |
| Gambar 2.5 FTIR LDPE oleh <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 16 |
| Gambar 2.6 Ilustrasi membrane sel bakteri | 17 |
| Gambar 2.7 Reaksi pengikatan DNA dalam membran silika..... | 19 |
| Gambar 2.8 Hasil elektroforegram Bakteri <i>E.coli</i> | 21 |
| Gambar 2.9 Proses terjadinya PCR pada DNA | 23 |
| Gambar 2.10 Tipe 16S-5S-23S rRNA..... | 24 |
| Gambar 2.11 Pohon filogenetik <i>Bacillus</i> sp | 26 |
| Gambar 4.1 Bakteri PDB1 dan PDB2 | 38 |
| Gambar 4.2 Spektra FTIR sebelum dan sesudah <i>treathment</i> dengan UV | 39 |
| Gambar 4.3 Spektra FTIR sesudah UV dan setelah degradasi..... | 41 |
| Gambar 4.4 Pengamatan pewarnaan gram PDB1 dan PDB2..... | 44 |
| Gambar 4.5 Hasil pewarnaan endospora PDB1 dan PDB2..... | 45 |
| Gambar 4.6 Hasil elektroforegram isolasi DNA bakteri PDB2 | 46 |
| Gambar 4.7 Hasil elektroforegram PCR | 48 |
| Gambar 4.8 Hasil <i>contig</i> sekuen 16S rRNA isolat bakteri PDB2 | 49 |
| Gambar 4.9 Hasil kontruksi pohon filogenetik isolat bakteri PDB2..... | 51 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Bakteri dengan potensi aktivitas degradasi tertinggi..... | 12 |
| Tabel 2.2 Hasil Kemurnian DNA bakteri hasil isolasi dengan kit | 20 |
| Tabel 4.1 Temperatur serta pH tanah | 36 |
| Tabel 4.2 Interpretasi spektra FTIR Plastik LDPE..... | 38 |
| Tabel 4.3 Hasil Uji biodegradasi plastik LDPE Isolat PDB1 dan PDB2 | 40 |
| Tabel 4.4 Interpretasi spektra plastik LDPE Setelah Degradasi..... | 41 |
| Tabel 4.5 Persentase Degradasi Plastik LDPE oleh Bakteri <i>Bacillus</i> sp | 42 |
| Tabel 4.6 Hasil isolasi DNA menggunakan <i>Kit Vivantis Nucleic Extraction</i> | 47 |
| Tabel 4.7 Data BLAST-n NCBI terhadap PDB2 | 50 |
| Tabel 4.8 Hasil Uji Fenotip Bakteri PDB2..... | 51 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1. Rancangan Penelitian | 68 |
| Lampiran 2. Diagram Alir | 69 |
| Lampiran 3. Perhitungan | 75 |
| Lampiran 4. Hasil FTIR..... | 78 |
| Lampiran 5. Hasil Elektroforesis PCR | 80 |
| Lampiran 6. Hasil Sikuensing Bagian <i>Forward</i> dengan Metode <i>Sanger</i> | 81 |
| Lampiran 7. Hasil Sikuensing Bagian <i>Reverse</i> dengan Metode <i>Sanger</i> | 84 |
| Lampiran 8. Hasil <i>Alignment</i> Isolat Bakteri PDB2 | 88 |
| Lampiran 9. Perhitungan <i>Distance</i> Bakteri PDB2..... | 96 |



ABSTRAK

Rozaq, Hanif Nur. 2020. **Uji Aktivitas Dan Identifikasi Genotip 16S rRNA Bakteri Pendegradasi Plastik LDPE Hasil Isolasi TPA Pisang Kipas Malang**. Pembimbing I: Dr. Akyunul Jannah, S.SI., M.P. Pembimbing II: Erna Herawati, M.Pd.

Kata Kunci: *Bakteri, biodegradasi LDPE, metode kit, gen 16S rRNA, sikuensing*

Penggunaan kantong plastik di masyarakat telah menjadi sesuatu yang umum. Terdapat banyak jenis plastik yang beredar di pasaran salah satunya adalah PE (*Polyethylene*). LDPE (*Low Density Polyethylene*) adalah plastik PE yang mempunyai banyak cabang pada strukturnya yang membuat gaya antar molekulnya lemah. Banyaknya masyarakat yang menggunakan plastik ini membuat pencemaran lingkungan terutama di tanah mengingat LDPE membutuhkan waktu lama untuk di degradasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengetahui potensi bakteri yang mampu mendegradasi plastik LDPE.

Metode isolasi bakteri yang digunakan adalah dengan menumbuhkannya dalam *Mineral Salt Media* (MSM) *broth*. Aktivitas biodegradasi bakteri ditentukan dengan mengetahui *weight loss* dan perubahan gugus fungsi pada FT-IR setelah 52 hari inkubasi. Identifikasi genotip bakteri dilakukan dengan isolasi DNA yang kemudian DNA di amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer 27F dan 1492R. Pengurutan DNA dilakukan dengan metode Sanger dan memanfaatkan *software* untuk analisa serta menentukan kekerabatan bakteri berdasarkan kedekatan hasil analisis dengan *database*.

Pada penelitian ini dihasilkan dua isolat yaitu PBD1 dan PBD2. aktivitas biodegradasi plastik LDPE PBD1 sebesar $0,75 \pm 0,0078\%$ sedangkan PDB2 mempunyai aktivitas biodegradasi sebesar $1,63 \pm 0,0008\%$. Uji genotip dengan isolasi DNA bakteri PDB2 mendapatkan kemurnian A_{260}/A_{280} sebesar 2,18. Proses amplifikasi isolat DNA bakteri dengan menggunakan suhu *annealing* PCR 58°C menghasilkan amplikon sebesar ~ 1500 bp. Hasil urutan DNA yang telah di sikuensing sebesar 1465 bp. Urutan nukleotida tersebut kemudian diolah dengan menggunakan *software* MEGA X untuk mengetahui rekonstruksi kedekatan filogeni. Berdasarkan hasil analisa dapat diketahui bahwa isolat bakteri PDB2 mempunyai kemiripan dengan spesies bakteri *Bacillus Subtilis* strain DSM 10 16S ribosomal RNA partial.

ABSTRACT

Rozaq, Hanif Nur. 2020. **Activity Test and Identification 16S rRNA Genotype of LDPE Plastic Degrading Bacteria Isolated from Pisang Kipas Malang Landfill**. Supervisor I: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P. Supervisor II: Erna Herawati, M.Pd.

Keywords: *Bacteria, LDPE biodegradation, kit method, 16S rRNA gene, sequencing*

The use of plastic bags in society has become commonplace. There are many types of plastics on the market, one of which is PE (Polyethylene). LDPE (Low-Density Polyethylene) is a PE plastic with many branches in its structure, which makes the forces between molecules weak. Many people who use this plastic causes environmental pollution, especially on the ground, considering that LDPE takes a long time to be degraded. This study aims to identify and determine the potential for bacteria that can degrade LDPE plastic.

The bacterial isolation method used is growing them in Mineral Salt Media (MSM) broth. The biodegradation activity of bacteria was determined by knowing the weight loss and changes in functional groups on FT-IR after 52 days of incubation. Identification of bacterial genotypes was carried out by DNA isolation, then DNA amplification with Polymerase Chain Reaction (PCR) using 27F and 1492R primers. DNA sequencing was carried out using the Sanger method and utilizing software to analyze and determine the relationship between bacteria based on the closeness of the analysis results to the database.

The result of this research are two isolates bacteria, they are PDB1 and PDB2. The PDB1 had biodegradation LDPE plastic of $0,75 \pm 0.0078\%$ while PDB2 had a biodegradation activity $1,63 \pm 0.0008\%$. Genotype test with BP2 bacterial DNA isolation brought A260/A280 purity of 2.18. The amplification process of bacterial DNA isolates using an annealing temperature of 58°C PCR produced an amplicon of ~1500 bp. The results of the sequenced DNA sequence were 1465 bp. The nucleotide sequence was then processed using MEGA X software to determine the reconstruction of phylogeny proximity. Based on the analysis, it can be seen that the BP2 bacterial isolate has similarities with the *Bacillus Subtilis* strain DSM 10 16S ribosomal RNA partial.

مستخلص البحث

رزاق ، حنيف نور. 2020. اختبار النشاط وتحديد النمط الجيني لبكتيريا 16S rRNA التي تعمل على تحلل بلاستيك LDPE (بولي إيثيلين منخفض الكثافة) تحصيل المأخوذ من مسبلة فيساع كيباس مالانج. المشرفة الأولى: الدكتور أعين الجنة، المشرفة الثانية : ايرنا حراواقي الماجستير

الكلمات الرئيسية: البكتيريا ، التحلل بلاستيك LDPE ، طريقة الكيت ، جين 16S rRNA ، التسلسل

استخدام الأكياس البلاستيكية في المجتمع أمرًا شائعًا. هناك العديد من أنواع البلاستيك التي تتم قياسها في السوق ، أحدها هو PE (البولي إيثيلين). LDPE (بولي إيثيلين منخفض الكثافة) هو بلاستيك البولي إيثيلين له العديد من الفروع في هيكله مما يجعل القوى بين الجزيئات الضعيفة. يسبب المجتمع عددا كبيرا الذين يستخدمون هذا البلاستيك في تلوث البيئة ، خاصة على الأرض ، مع الأخذ في الاعتبار أن البولي إيثيلين منخفض الكثافة يستغرق وقتًا طويلاً حتى يتحلل.الهدف هذه الدراسة لتحديد ولعرفة الإمكانيات التي يمكن أن تتحلل من بلاستيك البولي إيثيلين المنخفض الكثافة.

طريقة العزل البكتيري المستخدمة هي تنميتها في مرق ذو ملح معدني منخفض الكربون. تم تحديد نشاط التحلل البيولوجي للبكتيريا من خلال النظر في انخفاض وزن البلاستيك بعد 52 يومًا من الحضانة والتغيرات في المجموعات الوظيفية البلاستيكية من خلال مقياس الطيف الضوئي FT-IR. تم التعرف على الأنماط الجينية البكتيرية عن طريق استخراج الحمض النووي باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) باستخدام بادئات 27F و 1492R. تم إجراء تسلسل الحمض النووي باستخدام طريقة Sanger واستخدام برنامج لتسلسل الحمض النووي وتحديد ارتباط الأنواع بناءً على أقرب نتائج تسلسل تحليل قاعدة البيانات.

في هذه الدراسة تم إنتاج عزلتين هما PBD1 و PBD2. كان نشاط التحلل البيولوجي للبلاستيك LDPE PBD1 0.75 ± 0.0078 % بينما كان PBD2 نشاط تحلل حيوي 1.63 ± 0.0008 %.

اختبار الحمض النووي لبكتيريا PBD2 باستخدام طريقة المجموعة لها مستوى نقاء A260 / A280 من 2.18. حصلت عملية تضخيم عزلات الحمض النووي البكتيري باستخدام درجة حرارة تصلب تبلغ 58 درجة مئوية PCR على 1500 bp. تم تحديد تسلسل الحمض النووي باستخدام طريقة Sanger لإنتاج DNA بطول نيوكليوتيد يبلغ 1465 bp. تمت معالجة تسلسل النيوكليوتيدات بعد ذلك باستخدام برنامج MEGA X لاستخدام إعادة بناء القرب من التطور. بناءً على نتائج البيانات ، يمكن ملاحظة أن العزلة البكتيرية PBD2 لها أوجه تشابه مع سلالة الأنواع البكتيرية Bacillus Subtilis DSM 10 16S RNA الجزئي الريبوسومي.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Plastik polietilen (PE) adalah jenis plastik yang kerap digunakan sebagai pembungkus berbagai jenis produk olahan baik pada sektor industri maupun rumah tangga. Jenis plastik polietilen yang sering diaplikasikan untuk penggunaan kantong plastik yaitu LDPE (*Low Density Polyethylene*). Plastik jenis LDPE banyak digunakan sebagai tempat makanan, botol yang elastis, dan sebagainya. Plastik LDPE dipilih karena mempunyai sifat yang mudah diregangkan, tembus cahaya, ringan, dan rapuh sehingga mudah untuk diuraikan dibandingkan dengan jenis plastik PE yang lain (Trisunaryanti, 2018).

Data statistik mengungkapkan bahwasanya Indonesia adalah negara yang memproduksi plastik terbesar kedua setelah Tiongkok. Dirjen Pengelolaan Sampah, Limbah, dan B3 menyatakan bahwa jumlah sampah yang ada di Indonesia pada tahun 2019 presentase limbah plastik akan mencapai 755,6 ton (Sulistyarini dkk., 2017). Sekitar 311 milyar ton sampah plastik di produksi di seluruh dunia. Limbah sampah plastik yang telah dipakai 26% didaur ulang, 36% digunakan sebagai biomassa, dan 38% dibuang ke lingkungan (Wilkes dan Aristilde, 2017; Sharuddin dkk., 2016). Banyaknya plastik yang dibuang ke lingkungan akan menyebabkan kerusakan lingkungan serta mengganggu aktivitas makhluk hidup yang ada. Sebagaimana Allah SWT firmankan pada Surah al- A'raf ayat 56

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا ۗ إِنَّ رَحْمَةَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: “Dan janganlah kamu berbuat kerusakan setelah (diciptakan) dengan baik. Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang yang berbuat kebaikan” (Q.S al- A’raf: 56).

Tafsir Ibnu Katsir (2002) dan Quthb (1992) menjelaskan bahwa pada lafadz *wa lā tufsidu fil-arḍi ba’da iṣlāḥihā* mengandung makna bahwa Allah SWT melarang manusia untuk merusak bumi dengan mengutamakan hawa nafsu setelah Allah SWT memperbaikinya. Hal ini dikarenakan apabila segala urusan di dunia telah berjalan dengan baik berdasarkan kehendak-Nya kemudian terjadi kerusakan maka, akan menimbulkan bencana bagi manusia. Hal ini selaras dengan hadist yang diriwayatkan oleh H.R Muslim yang berbunyi (Al- Albani, 2007):

عَنْ شَدَّادِ بْنِ أَوْسٍ، قَالَ: حَصَلْتَانِ سَمِعْتُهُمَا مِنْ رَسُولِ اللَّهِ: إِنَّ اللَّهَ كَتَبَ الْإِحْسَانَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ، فَإِذَا قَتَلْتُمْ فَأَحْسِنُوا، قَالَ: غَيْرُ مُسْلِمٍ، يَقُولُ: فَأَحْسِنُوا الْقِتْلَةَ، وَإِذَا ذَبَحْتُمْ فَأَحْسِنُوا الذَّبْحَ وَ لِيُجِدَّ أَحَدُكُمْ شَفْرَتَهُ وَ لِيُرَخَّ ذَبِيحَتَهُ (رواه مسلم)

Artinya: “ Dari Syadad bin Aus, ia berkata: Dua perkara yang pernah kudengar dari Rasulullah SAW yaitu Sesungguhnya Allah SWT mewajibkan berbuat baik atas segala sesuatu. Oleh karena itu, apabila kamu membunuh, maka lakukanlah dengan cara yang baik dan apabila kamu menyembelih, maka lakukanlah dengan cara yang baik. Hendaklah kalian dalam penyembelihan itu menajamkan mata pisaunya agar tidak menyakiti hewan yang disembelih” (H.R Muslim).

Berdasarkan hadist diatas, Allah SWT menuntut manusia untuk berbuat baik dengan segala sesuatu yang telah Allah SWT ciptakan semisal dengan sesama manusia, tumbuhan, binatang, dan alam. Manusia yang diberi amanah oleh Allah SWT sepatutnya menjaga alam agar terhindar dari kerusakan-kerusakan seperti

pencemaran plastik yang nantinya akan berdampak pada ekosistem tanah, air, dan udara.

Penggunaan plastik LDPE yang besar merupakan faktor pencemaran lingkungan yang utama baik di ekosistem daratan maupun perairan. Salah satu upaya yang dilakukan dalam menanggulangi sampah plastik LDPE yaitu mengolah sampah tersebut baik secara fisika, kimia, maupun biologi. Pengolahan plastik secara fisika yaitu menggunakan proses penimbunan, pembakaran, serta daur ulang (Trisunaryanti, 2018). Metode kimia yang digunakan untuk mendegradasi plastik adalah adanya proses pemutusan rantai hidrokarbon polimer menjadi senyawa yang lebih sederhana (Herstek dkk., 2019). Akan tetapi terdapat kekurangan dari metode fisika dan kimia yaitu biaya yang mahal serta limbah sisa pengolahan sampah plastik yang dapat mencemari lingkungan. Metode degradasi secara biologis menggunakan mikroorganisme menjadi pilihan alternatif yang telah banyak dilakukan. Keuntungan menggunakan mikroorganisme dalam pengelolaan limbah sampah plastik yaitu membutuhkan biaya yang relatif kecil.

Mikroorganisme mampu hidup di berbagai ekosistem, baik tanah maupun perairan adalah bakteri. Tanah menjadi habitat bagi bakteri karena mengandung banyak nutrisi yang dibutuhkan bakteri untuk bertahan hidup. Salah satu contoh tanah yang menjadi habitat bakteri adalah tanah di Tempat Pembuangan Akhir (TPA) sampah Pisang Kipas Kota Malang. Pengelolaan sampah di TPA Pisang Kipas menggunakan proses konvensional yaitu *open dumping* atau pembuangan sampah di lahan terbuka dimana mempunyai beberapa kekurangan diantaranya kumuh dan berbau. TPA ini menampung kurang lebih 672 kg sampah per hari dengan hampir 80% terdiri dari sampah plastik. Hal ini disebabkan karena adanya

aktivitas bakteri dalam mendekomposisi sampah. Banyaknya sampah plastik membuat tanah yang berada di kawasan tersebut berpotensi menjadi habitat bagi bakteri pendegradasi plastik.

Bakteri termasuk mikroorganisme mudah untuk diisolasi, dikembang biakan, serta mempunyai persentase degradasi yang tinggi. Bakteri mampu mengsekresi enzim yang dapat memecah polimer organik menjadi monomer yang lebih sederhana. Monomer yang dihasilkan akan digunakan sebagai sumber karbon yang menghasilkan energi dan untuk reproduksi (Koorem dkk., 2014; Sharma dkk., 2014; Senthilkumar, 2015). Bakteri dalam tanah yang mempunyai potensi degradasi plastik diantaranya *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida* (Jyoti Singh, 2015), *Mycobacterium* sp. (Kanaly dan Harayama, 2000), *Bacillus cereus* (Dey dkk., 2016), *Staphylococcus* sp, *Azobacter* sp., *Halomonas* sp., *Ralstonia eutropha*, *Sphingomonas* sp. (Pangestu dkk., 2016), *Brevibacillus borstelensis* (Hadad dkk., 2005), *Paenibacillus amyloiticus*, dan *Bacillus pumilus* (Lee S, 2010).

Riset yang telah dilakukan membuktikan potensi bakteri tanah dalam menguraikan struktur hidrokarbon dalam plastik LDPE. Dey dkk. (2016) melakukan penelitian degradasi plastik LDPE oleh bakteri yang berasal dari spesies *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp, dan *Pseudomonas* sp selama 20, 30, dan 40 hari. Degradasi plastik LDPE tertinggi dilakukan oleh *Bacillus* sp. dengan waktu inkubasi 40 hari yang menghasilkan persentase degradasi plastik LDPE sebesar 21,42%. Vijaya dan Reddy (2008) melaporkan bahwa persen berat plastik LDPE yang terdegradasi oleh bakteri *Pseudomonas* sp. selama enam bulan sebesar 24,22 %, *Streptomyces* sebesar 46,7%. Begum dkk. (2015) telah meneliti

kemampuan bakteri *Desulforomaculum nigrificans* dan *Pseudomonas alcaligenes* dalam mendegradasi plastik LDPE dalam waktu 10, 20, dan 30 hari. Berdasarkan hasil penelitian, bakteri *Desulforomaculum nigrificans* mempunyai kemampuan mendegradasi plastik LDPE dengan persentase degradasi secara berurutan 10,2%, 13,2%, dan 16,2%. Bakteri *Pseudomonas alcaligenes* mempunyai persentase degradasi plastik LDPE sebesar 10,2%, 14,2%, dan 16,2%.

Tahap yang dilakukan untuk menentukan jenis bakteri yang berperan dalam mendegradasi plastik yaitu tahap identifikasi. Identifikasi bakteri pendegradasi plastik dapat dilakukan dengan dua metode diantaranya metode secara fenotip dan genotip. Identifikasi fenotip bakteri dapat dilakukan dengan pewarnaan gram, pewarnaan endospora, dan pengamatan secara morfologi baik bentuk, warna, tepi, dan elevasi koloni. Karakteristik bakteri yang mudah berubah sesuai kondisi lingkungan mendorong adanya identifikasi bakteri secara genotip untuk mendukung hasil identifikasi fenotip.

Identifikasi bakteri secara genotip yang melibatkan identifikasi filogenetik dan taksonomi menggunakan gen penanda 16S rRNA. Penanda 16S rRNA digunakan karena mempunyai *multi copy* dengan 150-300 *copy* genom. Selain itu, identifikasi bakteri pendegradasi plastik menggunakan 16S rRNA sudah banyak diaplikasikan sehingga memudahkan membuat perbandingan dalam identifikasi bakteri satu dengan bakteri yang lain (Muharni dkk., 2015; Nurkanto & Agusta, 2015; Sabbathini dkk., 2017).

Berlandaskan penjelasan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas bakteri pendegradasi plastik LDPE serta identifikasi genotip bakteri menggunakan gen 16S rRNA. Sampel tanah yang

diambil untuk isolasi bakteri merupakan sampel tanah yang berasal dari Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPA) Jalan Pisang Kipas Kecamatan Lowokwaru Kota Malang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, maka dapat dibuat rumusan masalah diantaranya:

1. Bagaimana potensi isolat bakteri dalam mendegradasi plastik LDPE?
2. Bagaimana hasil identifikasi genotip isolate bakteri menggunakan gen pengode 16 rRNA?

1.3 Tujuan

Berdasarkan paparan rumusan masalah yang telah dijelaskan di atas, maka tujuan dilakukan penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui potensi degradasi plastik LDPE oleh isolate bakteri.
2. Mengetahui hasil identifikasi genotype bakteri dengan menggunakan gen pengode 16S rRNA.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri diisolasi dari sampel tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Jalan Pisang Kipas Kecamatan Lowokwaru Kota Malang.
2. Pasangan primer yang digunakan dalam identifikasi genotip adalah 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') serta 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3')

1.5 Manfaat

1. Memberikan informasi yang berkenaan dengan potensi serta pemanfaatan bakteri dalam mendegradasi plastik sehingga mengurangi penggunaan bahan kimia dalam proses degradasi.
2. Memberi informasi tentang jenis bakteri yang mampu mendegradasi plastik sehingga menambah keberagaman plasma nutfah mikroorganisme yang mampu menguraikan limbah plastik di alam.



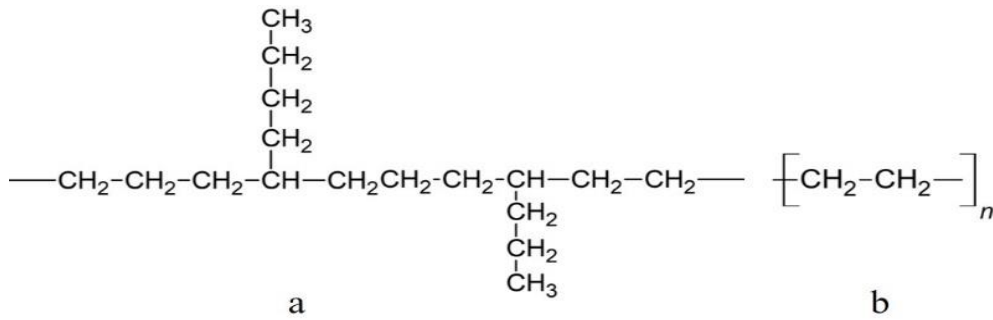
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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

Polietilen (PE) merupakan jenis plastik yang tersusun atas monomer etilen dengan densitas yang berbeda. Plastik polietilen banyak diaplikasikan di kehidupan masyarakat sehari-hari sebab plastik ini mempunyai sifat yang kuat, tahan lama, dan tahan terhadap kelembapan. Plastik jenis polietilen tersusun atas 1000 atom karbon sebagai rantai utamanya. Plastik polietilen digolongkan menjadi dua jenis yaitu *Low Density Polyethylene* (LDPE) dan *High Density Polyethylene* (HDPE). Polietilen yang memiliki struktur molekul dengan banyak cabang pada rantai hidrokarbonnya membuat kerapatan dari plastik jenis ini relatif rendah. Plastik yang memiliki karakteristik tersebut dinamakan plastik LDPE (*Low Density polyethylene*) (Senthilkumar dkk., 2015; Ernawati, 2011; Sastri, 2014).

Plastik LDPE mempunyai kepadatan molekul yang rendah dengan densitas 0,910 g/cm³ hingga 0,925 g/cm³. LDPE mempunyai gugus hidrofobik kompleks yang berasal dari rantai hidrokarbon bercabang yang dimiliki seperti **Gambar 2.1**. LDPE bersifat tembus pandang, fleksibel, tidak tahan panas, kekuatan daya tarik, tahan terhadap minyak serta lemak, dan permeabilitas kelembapan yang rendah (Shebani dkk., 2018; Jordan dkk., 2016; Kormin dkk., 2017).



Gambar 2.1 Struktur kimia (a) Polietilen densitas rendah (LDPE) dan (b) Monomer dari etilen (Tadimetri & Sutton, 2020)

Proses degradasi plastik LDPE di lingkungan dapat dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Proses degradasi plastik melalui tahap abiotik dipengaruhi keadaan lingkungan yang meliputi suhu, radiasi UV (foto oksidasi), oksidasi kimia, dan kelembapan. Sedangkan tahap biotik degradasi plastik dibantu oleh mikroorganisme seperti bakteri yang mampu mengeluarkan enzim ekstraseluler yang mampu mengubah struktur polimer plastik yang kompleks menjadi struktur yang lebih sederhana (Florez dkk., 2014; Gajendiran dkk., 2016).

2.2 Bakteri Pendegradasi Plastik

Allah SWT menciptakan dunia dengan isinya untuk kepentingan manusia di muka bumi. Manusia sebagai makhluk yang mempunyai akal dan khalifah sepantasnya untuk menjaga sumber daya alam yang telah diberikan. Hal ini dilakukan sebagai wujud syukur terhadap nikmat yang telah Allah SWT limpahkan.

Allah SWT berfirman dalam Surah Luqman ayat 20:

Lafadz *ba'ūḍatan* menurut Asy-Syaukani (2008) mempunyai makna nyamuk sedangkan *fa mā fauqahā* yang berarti atau yang lebih rendah dari itu (nyamuk). Al- Kisa'i, Abu Ubaidan, dan lainnya menafsirkan bahwa makna *fa mā fauqahā* adalah apa yang dibawahnya yang mempunyai arti lebih kecil lagi. Tafsir Ringkas Kementerian Agama Replubik Indonesia (2016) menjelaskan bahwa Allah SWT membuat perumpamaan baik kecil maupun besar.

Orang beriman yang mendengar perumpamaan ini akan mengetahui bahwa itu semua adalah kebenaran dan kuasa Allah SWT sehingga mereka diberi petunjuk untuk mencari kebenarannya. Ayat ini mengisyaratkan bahwasanya Allah SWT menciptakan makhluk yang berukuran lebih kecil dan ringan dari nyamuk atau sayapnya atau yang lebih ringan lagi yaitu ciptaan-Nya yang tidak mampu dilihat oleh mata secara langsung seperti mikroorganisme.

Bakteri adalah salah satu mikroorganisme prokariot uniseluler yang sederhana. Hal ini disebabkan karena bakteri memiliki materi genetik yang tidak diselubungi oleh selaput membran inti. Bakteri memerlukan bahan organik yang didapatkan secara alami baik berasal dari organisme mati maupun hidup. Terdapat beberapa bakteri yang mampu memanfaatkan bahan atau limbah seperti plastik sebagai sumber makanan seperti yang terdapat dalam **Tabel 2.1**. Bakteri tersebut adalah bakteri yang termasuk dalam golongan indigenous.

Bakteri indigenous adalah bakteri yang dapat diperoleh habitat asal atau yang berada di pembuangan akhir sampah. Bakteri tersebut mampu mengsekresi enzim hidrolitik depolimerisasi serta mengubah polimer menjadi struktur yang lebih sederhana seperti oligomer, dimer, maupun monomer senyawa radikal bebas yang

akan membantu proses degradasi plastik (Hoffman dkk., 2019; Senthilkumar, 2015; Dey dkk., 2016; Hersztek dkk., 2019; Octavianda dkk., 2016; Radji, 2009).

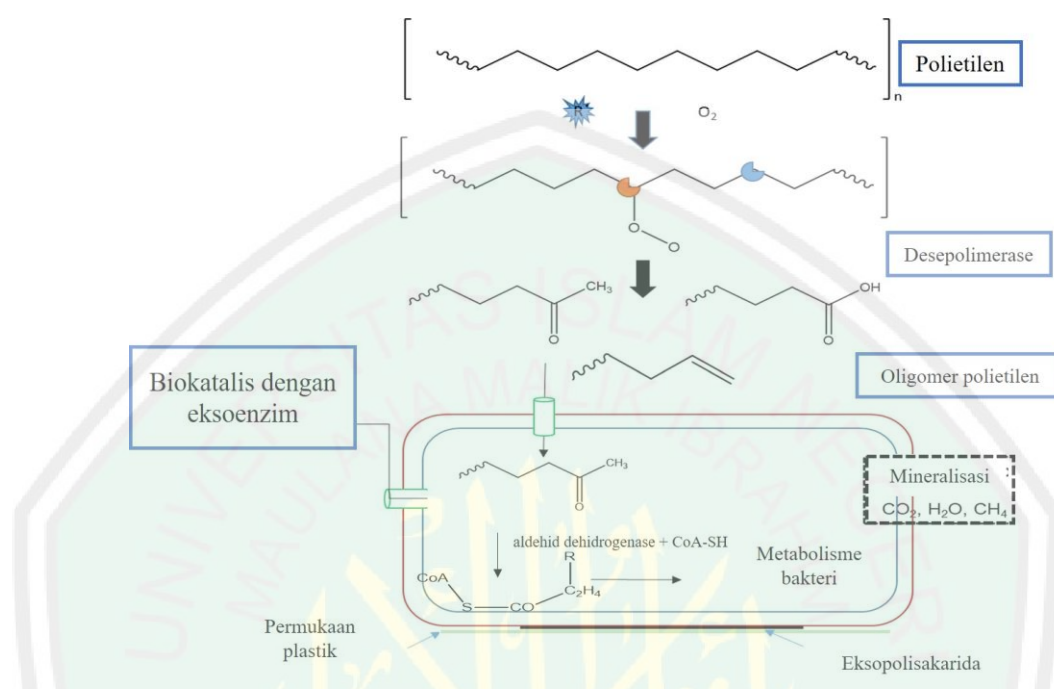
Tabel 2.1 Bakteri dengan potensi aktivitas degradasi tertinggi

| Jenis | Aktivitas degradasi (%) | Masa Inkubasi (Hari) | Referensi |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| <i>Pseudomonas putida</i> | 20 | 30 | Singh dkk., 2015 |
| <i>Bacillus sporothermoduran</i> | 36,54 | 60 | Shrestha dkk., 2019 |
| <i>Brevibacillus borstelensis</i> | 30 | 30 | Muhonja, 2018 |
| <i>Bacillus cereus strain</i> | 17,39 | 30 | Sharma dkk., 2014 |

Degradasi plastik merupakan perubahan struktur kimia senyawa polimer akibat adanya faktor abiotik (lingkungan) seperti cahaya, panas, kelembapan, kondisi kimia atau aktivitas biologi. Biodegradasi adalah proses biokimia yang mengacu pada degradasi dan penggabungan polimer yang dilakukan oleh mikroorganisme. Proses biodegradasi plastik LDPE oleh bakteri dibagi menjadi empat tahap yaitu biodeteriorasi, biofragmentasi, depolimerisasi, dan asimilasi.

Biodeteriorasi merupakan proses dimana bakteri akan menempel pada permukaan plastik. Kemudian terjadi biofragmentasi yang merupakan proses dimana bakteri akan mensekresi enzim hidrolitik polimerase untuk mengubah polimer menjadi monomer, oligomer, atau dimer. Struktur molekul yang lebih sederhana ini akan masuk ke dalam membran semi permeabel bakteri dan akan diserap untuk dijadikan sebagai sumber energi dalam pertumbuhan dan reproduksi. Proses ini disebut dengan depolimerisasi. Reaksi yang terjadi pada saat proses depolimerisasi dapat dilihat pada **Gambar 2.2**. Berdasarkan gambar tersebut,

struktur alkana dari alkana yang dimiliki polietilen akan diuraikan menjadi alkohol dengan bantuan enzim alkana monooksidase (Skariyachan dkk., 2019).



Gambar 2.2 Reaksi metabolisme bakteri aerob dalam proses biodegradasi (Ghatge dkk., 2020)

Alkohol selanjutnya mengalami reaksi oksidasi dengan bantuan enzim aldehyd dehidrogenase dan alkohol dehidrogenase membentuk asam lemak jenuh. Asam lemak jenuh ini selanjutnya masuk ke dalam siklus beta oksidasi dengan adanya penambahan dua koenzim-A yang nantinya akan masuk ke dalam tahap asimilasi dalam siklus TCA (*Tricarboxylic acid*) (Pathak and Navneet, 2017; Skariyachan dkk., 2019; Arutchelvi dkk., 2008).

Asimilasi melibatkan siklus TCA (*Tricarboxylic acid*) yang ada di dalam metabolisme bakteri. Siklus TCA ini akan berperan dalam proses ekskresi metabolisme dari bakteri. Bakteri akan melepaskan humus, CO_2 , dan H_2O apabila proses degradasi terjadi dalam kondisi aerob. Sedangkan apabila biodegradasi

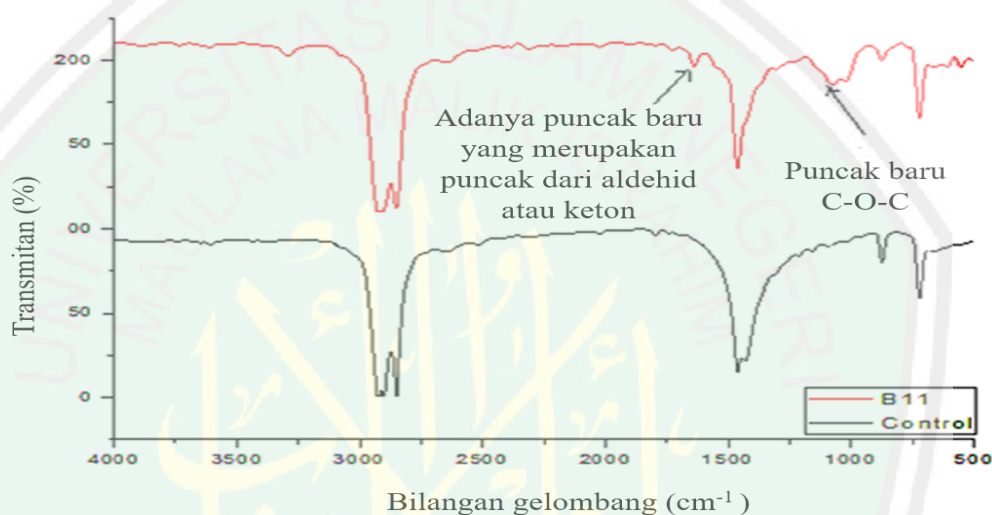
terjadi pada bakteri yang bersifat anaerob, hasil ekskresi bakteri tersebut adalah serta gas metana (CH_4), air, CO_2 , dan H_2S (**Gambar 2.2**) (Alshehrei, n.d; Hoffman dkk., 2019; Gewert dkk., 2015; Senthilkumar, 2015; Dey dkk., 2016; Hersztek dkk., 2019).

2.3 Identifikasi Gugus Fungsi Plastik dengan FTIR

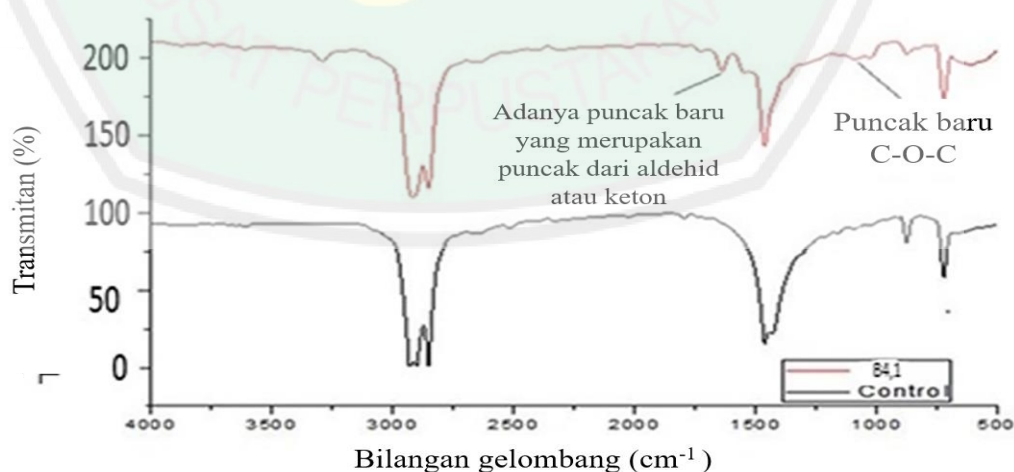
FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) merupakan instrumen untuk menentukan struktur suatu senyawa terutama struktur senyawa organik melalui ikatan kovalen antar atom yang akan di transformasi menjadi puncak yang berbeda (Khopkar, 1990). Prinsip kerja dari FTIR yaitu adanya interaksi antara radiasi inframerah dengan senyawa yang mengakibatkan terjadinya perubahan energi yang digunakan untuk proses vibrasi. Sedangkan cara kerja dari FTIR adalah radiasi inframerah yang berperan sebagai sumber energi akan melewati dua berkas. Berkas sinar pertama akan berinteraksi dengan sampel sedangkan berkas sinar kedua akan diarahkan menuju pembanding, Kemudian berkas sinar tersebut akan melewati *grating*. Selanjutnya akan diteruskan menuju detektor untuk diubah menjadi signal listrik yang nantinya akan diterjemahkan oleh detektor melalui puncak dengan intensitas tertentu (Pambudi dkk., 2017).

Penelitian biodegradasi plastik yang dilakukan Muhonja dkk. (2018) mendapatkan dua isolat bakteri yang mampu mendegradasi plastik dalam waktu 16 minggu yaitu *Pseudomonas* sp. dan *Bacillus cereus*. Berdasarkan spektra yang tertera dalam **Gambar 2.3** serta **Gambar 2.4** dapat diketahui bahwa adanya perbedaan puncak antara plastik LDPE kontrol dan plastik LDPE yang mengalami degradasi. Puncak baru muncul di bilangan gelombang 1700 cm^{-1} hingga 1650 cm^{-1}

¹ menunjukkan terbentuknya gugus aldehid serta keton yang termasuk dalam produk intermediat dari proses biodegradasi. Sedangkan serapan baru pada bilangan gelombang 1000 cm^{-1} - 1200 cm^{-1} adalah daerah alkohol primer dan sekunder yang tidak dimiliki oleh sampel kontrol. Pita utama dari LDPE yang telah mengalami proses degradasi terletak pada bilangan gelombang 2900 cm^{-1} yang termasuk serapan dari CH_2 asimetris.

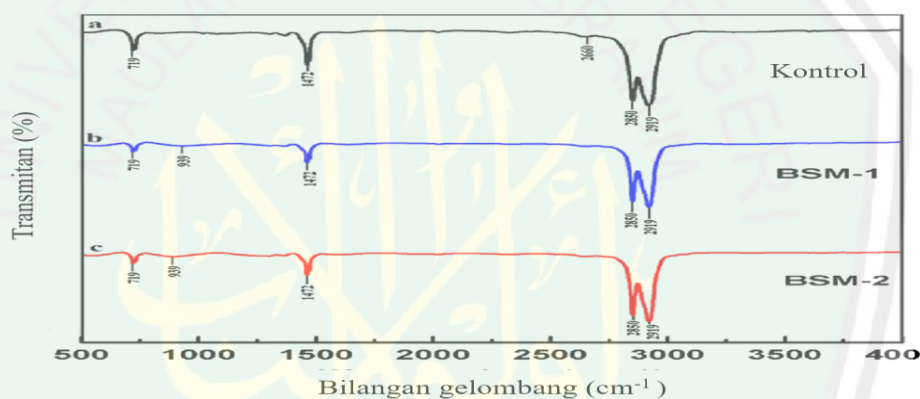


Gambar 2.3 Spektra FTIR plastik LDPE yang di degradasi oleh *Pseudomonas* sp dengan lama waktu inkubasi 16 minggu (Muhonja dkk., 2018).



Gambar 2.4 Spektra FTIR plastik LDPE yang didegradasi oleh *Bacillus cereus* dengan lama waktu inkubasi 16 minggu (Muhonja dkk., 2018)

Penelitian biodegradasi LDPE lain yang dilakukan oleh Das dan Kumar (2015) dengan *Bacillus amyloliquefaciens* (BSM-1 dan BSM-2) dengan waktu inkubasi 60 hari. Berdasarkan data dari spektra FTIR pada **Gambar 2.5** dapat diketahui bahwa pada kedua isolat menghasilkan spektrum yang sama. Serapan pada bilangan gelombang 719 cm^{-1} merupakan serapan ikatan C-H mono. Serapan pada bilangan gelombang 1472 cm^{-1} adalah vibrasi C=C *stretch*, 2660 cm^{-1} termasuk vibrasi dari CHO *stretch*, dan 2919 cm^{-1} serta 2850 cm^{-1} adalah vibrasi dari CH *stretch* yang intensitas dari kontrol lebih kecil daripada intensitas sampel.



Gambar 2.5 FTIR LDPE oleh *Bacillus amyloliquefaciens* (Das dan Kumar, 2015)

2.4 Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Plastik Secara Fenotip

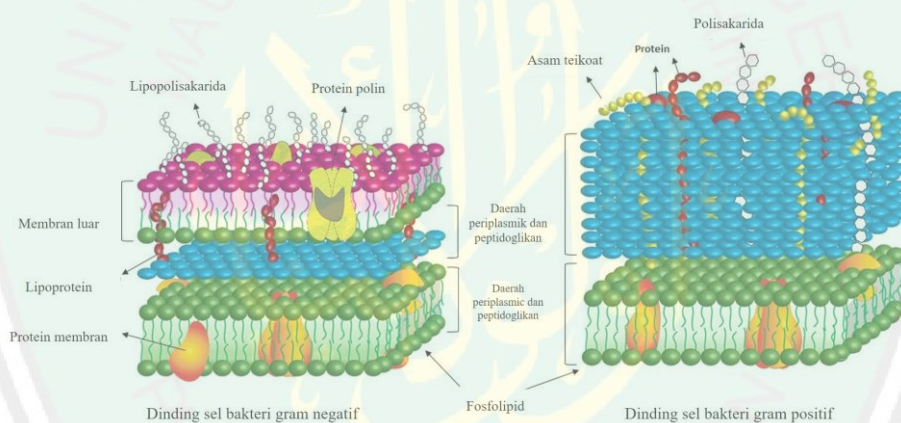
2.4.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah metode pewarnaan sederhana yang digunakan untuk mengklasifikasikan jenis bakteri berdasarkan dinding selnya. Dinding sel bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua jenis berdasarkan gramnya yaitu bakteri gram positif dan gram negatif.

Bakteri yang termasuk gram positif tersusun atas peptidoglikan kaku serta tebal. Lapisan peptidoglikan merupakan polisakarida yang terdiri dari asam N-asetil

glukosamin dan asam N-asetil muramik. Selain adanya kedua senyawa tersebut, bakteri gram positif mampu memproduksi asam lipoteikhoik yang bertindak sebagai pengatur enzim autolitik (Radji, 2009).

Lain halnya dengan bakteri yang bersifat gram negatif yang mempunyai dinding sel lebih tipis dengan peptidoglikan yang tersusun satu atau lebih. Hal ini yang menyebabkan dinding sel bakteri gram ini lebih sensitif. Struktur dari dinding sel bakteri tersusun atas lipopolisakarida, lipoprotein, dan fosfolipid. Ilustrasi bentuk sel bakteri gram positif dan negatif dapat diamati pada **Gambar 2.6** (Radji, 2009).



Gambar 2.6 Ilustrasi membrane sel bakteri (Liu dkk., 2015)

2.4.2 Endospora Bakteri

Endospora adalah salah satu struktur dinding sel yang dibentuk bakteri sehingga mampu *survive* pada keadaan lingkungannya yang ekstrem seperti panas, suasana asam, serta kering. Terdapat dua macam bakteri dari genus berbeda yang membentuk endospora adalah bakteri dari golongan *Clostridium* sp dan *Bacillus* sp (Oktari dkk., 2017 dan Pratita, 2012).

Struktur dinding sel endospora yang tebal membutuhkan perlakuan yang khusus sehingga pada proses pewarnaan reagen dapat menembus dinding sel bakteri. Terdapat metode konvensional yang umum dipakai dalam analisis laboratorium yaitu metode *Schaeffer Fulton* yang menggunakan reagen malasit hijau dan safranin. Malasit hijau berfungsi sebagai pewarna endospora karena mampu terikat kuat pada dinding sel bakteri pada saat proses fiksasi dengan pemanasan sedangkan safranin berperan sebagai pewarna dari sel vegetatif bakteri. Hasil positif uji pewarnaan endospora dengan metode ini yaitu adanya warna hijau pada koloni bakteri (Oktari dkk., 2017).

2.5 Identifikasi Bakteri Pendegradasi Plastik LDPE Secara Genotip

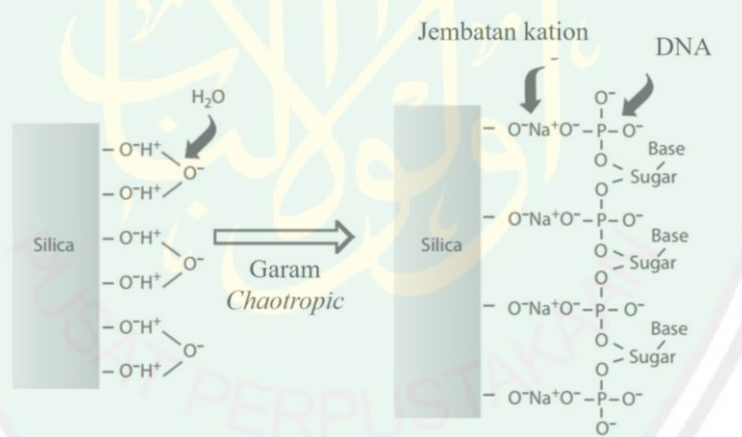
2.5.1 Isolasi DNA Menggunakan *Vivantis Nucleic Extraction Kit*

Isolasi DNA bakteri menggunakan salah satu reagen kit *vivantis* mempunyai prinsip adalah DNA yang berasal sampel akan berinteraksi dengan silika yang ada di dalam kolom. Adanya penambahan larutan garam dengan konsentrasi tinggi akan menyebabkan DNA terikat pada silika sehingga tidak mudah hilang pada saat pencucian maupun sentrifugasi. Penggunaan kit dalam isolasi DNA tidak memerlukan pengendapan DNA menggunakan pelarut organik sehingga lebih aman dan efisien. Terdapat empat tahapan yang diperlukan untuk isolasi DNA metode kit diantaranya lisis, pengikatan, pencucian, dan elusi (Lee dkk., 2018; Ayu dkk., 2011; Shi dkk., 2018).

Proses lisis dinding sel bakteri diawali dengan penambahan *buffer* R1 yang bertujuan untuk meresuspensi kembali sel bakteri. Selanjutnya, dinding sel bakteri dipecah dengan menggunakan lisozim. Menurut Nasution dkk. (2018) lisozim

mampu menembus dan merusak dinding sel bakteri karena mampu berinteraksi dengan lapisan membran luar dinding sel dan kemudian melekat pada lipopolisakarida. Lisozim akan memutus ikatan β 1-4 karbon heteropolymer N-asetilglukosiamin serta ikatan karbon heteropolymer milik N-asam asetilmuramik yang terdapat di lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri.

Proses pemisahan molekul DNA dari pengotor lainnya dilakukan dengan penambahan *buffer* R2 serta RNase. Penambahan *buffer* R2 bertujuan untuk mendenaturasi protein yang ada di dalam sel sedangkan RNA akan di degradasi oleh enzim RNase. Campuran kedua reagen disertai adanya temperatur yang tinggi menghasilkan pelet yang nantinya akan dihomogenisasi menggunakan *buffer* BG dan etanol.



Gambar 2.7 Reaksi pengikatan DNA dalam membran silika dalam kadar garam yang tinggi (Binsen,2015)

Penambahan *buffer* BG sebagai *chaotropic agent* akan meningkatkan denaturasi makromolekul karena kadar garamnya yang tinggi. Aini dkk. (2011) menyatakan bahwa lingkungan dengan konsentrasi garam yang tinggi akan menyebabkan DNA yang memiliki muatan negatif akan terikat di dalam silika

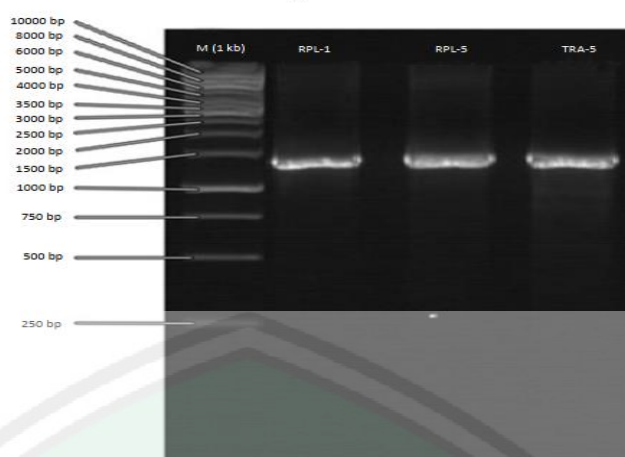
berdasarkan prinsip *anion exchange* seperti pada **Gambar 2.7**. Komponen pengotor lainnya seperti protein, RNA, maupun komponen lainnya akan melewati membran silika sehingga DNA dapat terpisah dari pengotornya (Numanta, 2004).

Molekul DNA yang terikat pada silika kemudian dicuci dengan menggunakan *wash buffer* untuk menghilangkan sisa-sisa protein, garam, serta kontaminan yang ada di dalam sampel. Adanya etanol yang ditambahkan sebelumnya akan membantu pengendapan DNA pada silika. DNA yang mengendap kemudian di elusi dengan menggunakan *elution buffer* yang mempunyai kekuatan ionik rendah. Hal ini yang menyebabkan DNA mampu terelusi dari membrane silika.

Tabel 2.2 Hasil Kemurnian DNA bakteri hasil isolasi dengan kit

| Jenis Bakteri | Nilai A_{260}/A_{280} |
|---------------------------------|-------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,49 |
| <i>Staphylococcus dysentery</i> | 2,01 |
| <i>Staphylococcus</i> | 1,95 |
| <i>Escherichia coli</i> | 1,92 |
| <i>Salmonella sp</i> | 1,49 |

Kuantitas serta kualitas DNA yang telah diisolasi dapat dilihat dengan menggunakan dua metode yaitu metode spektrofotometri dan elektroforesis. Spektrofotometri digunakan untuk menentukan kualitas DNA yang telah dihasilkan. Kemurnian DNA bakteri yang diperoleh dapat dihitung dengan menggunakan perbandingan A_{260}/A_{280} dengan rentang kemurnian DNA sebesar 1,8-2,0 seperti yang tertera pada **Tabel 2.2**. Kuantitas DNA bakteri diamati dengan menggunakan elektroforesis gel (**Gambar 2.8**) (Syarifaruddin dkk., 2011).



Gambar 2.8 Hasil elektroforegram yang terbentuk setelah proses isolasi DNA *E. Coli* (Isworo dkk., 2016).

2.5.2 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis merupakan suatu metode analisis berdasarkan gerakan DNA yang mempunyai muatan dalam suatu medan listrik. Proses pemisahan menggunakan gel agarosa yaitu adanya aliran arus listrik. Arus tersebut mendorong pergerakan molekul DNA melewati gel matriks sehingga DNA akan bergerak berdasarkan berat, ukuran, serta muatan yang terkandung dalam molekulnya. Molekul DNA yang mempunyai berat molekul kecil bergerak lebih cepat dari pada DNA dengan berat molekul lebih besar yang ditunjukkan lewat pita yang terbentuk selama pemisahan. **Gambar 2.8** menunjukkan hasil elektroforegram dari bakteri *E. Coli*. Berdasarkan gambar tersebut dapat diketahui bahwa berat molekul yang dihasilkan isolat bakteri hasil isolasi dengan marker menunjukkan kemiripan yaitu berada di daerah 1500 bp. (Lee dkk., 2012; Isworo dkk., 2016; Sanderson dkk., 2014).

Etidium Bromida (EtBr) adalah sebuah reagen yang sering digunakan dalam bidang biologi molekular salah satunya adalah elektroforesis agarosa. EtBr akan

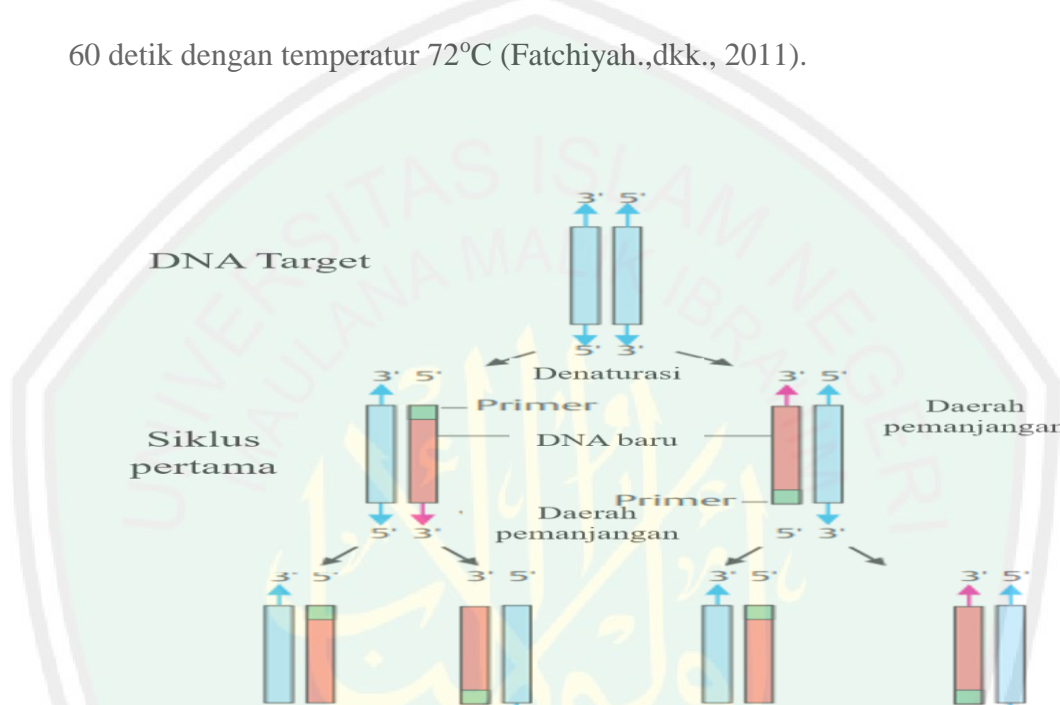
membentuk khelat asam nukleat melalui cincin aromatik yang dimilikinya. Adanya energi dari sinar UV, akan membuat cincin aromatis etidium mengalami aktivasi sehingga elektron dalam cincin etidium akan tereksitasi. Pada saat elektron kembali ke keadaan dasar, elektron tersebut akan memancarkan cahaya berwarna jingga atau disebut dengan flouoresense (Lee dkk., 2012; Saeidna dan Mohammad, 2013).

2.5.3 Amplifikasi DNA Menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR merupakan metode yang sering digunakan dalam analisis mikrobiologi yang berkenaan dengan replikasi DNA dengan waktu yang singkat. Proses PCR memerlukan templat DNA, nukleotida, DNA polymerase, dan primer. DNA polimerase merupakan enzim yang digunakan dalam menghubungkan satu nukleotida dengan nukleotida lain sepanjang proses PCR. Nukleotida yang digunakan mencakup empat basa nitrogen yaitu adenin, guanin, timin, dan sitosin (A, G, T, dan C). Keempat basa nitrogen ini akan digunakan sebagai kerangka pembangun polinukleotida pada proses PCR dengan bantuan polimerase. Primer yaitu fragmen DNA dengan ukuran pendek yang nantinya akan melengkapi basa nitrogen yang dimiliki oleh DNA target (Garibyan dkk., 2013; Handayono dan Rudiretna, 2001).

PCR melibatkan beberapa tahapan diantaranya denaturasi DNA *template*, penempelan primer, pemanjangan untaian DNA, dan pematapan seperti yang tertera pada **Gambar 2.9** (Handoyo dan Rudiretna, n.d.). Tahap awal PCR yaitu denaturasi. Denaturasi adalah tahap terjadinya pemisahan untaian DNA *double helix* menjadi untaian tunggal. Proses ini terjadi pada suhu 90°C hingga 95°C. Kemudian DNA primer atau DNA yang berukuran pendek akan menempel pada

DNA target dengan bantuan enzim *Taq polymerase*. Waktu yang dibutuhkan pada proses ini relative singkat dan menggunakan suhu 55°C. Tahap terakhir dari PCR yaitu eksistensi atau pemanjangan. DNA primer yang tertempel pada DNA target akan mengalami perpanjangan pada bagian 3'. Selain terjadi pemanjangan, terjadi pula proses penambahan dNTP. Pemanjangan DNA membutuhkan waktu selama 60 detik dengan temperatur 72°C (Fatchiyah.,dkk., 2011).



Gambar 2.9 Proses terjadinya PCR pada DNA (Passarge, 2007)

2.5.4 Gen Penanda Daerah 16S rRNA

Gen 16S rRNA merupakan metode identifikasi molekuler yang telah melalui tahapan karakterisasi sehingga efektif dalam penentuan mikroorganisme. Identifikasi dengan menggunakan 16S rRNA memiliki 150-300 *copy* dalam genom sehingga sering disebut dengan *multi copy*. Gen 16S rRNA mempunyai kawasan varitif serta konservatif yang bermacam. Urutan basa yang terletak pada daerah konservatif digunakan untuk membangun konstruksi pohon filogenik sedangkan

pada daerah variatif digunakan untuk menentukan keragaman serta tipe antar spesies yang belum dikenal.

Analisis prokariota seperti bakteri mempunyai tiga macam RNA ribosomal, diantaranya 5S, 16S, dan 23S seperti yang terlihat di **Gambar 2.10**. Akan tetapi, RNA ribosomal dengan tipe 16S adalah yang sering diaplikasikan. RNA ribosomal 5S mempunyai ukuran basa nitrogen yang terlalu pendek sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan analisis filogenik menggunakan rRNA jenis ini. Pada unit ribosomal 23S rRNA memiliki bentuk molekul tersier serta sekunder yang terlalu kompleks dan panjang. Hal ini menyebabkan analisis dengan 23S jarang digunakan. Gen penyandi 16S rRNA adalah ribosomal RNA yang telah dibakukan untuk analisis hubungan kekerabatan filogenetik (Pangastuti, 2006).



Gambar 2.10 Tipe 16S-5S-23S rRNA pada bakteri *Butyrivibrio proteoclasticus* (Li dkk., 2014)

2.5.5 Analisis Sikuen DNA dan Bioinformatika

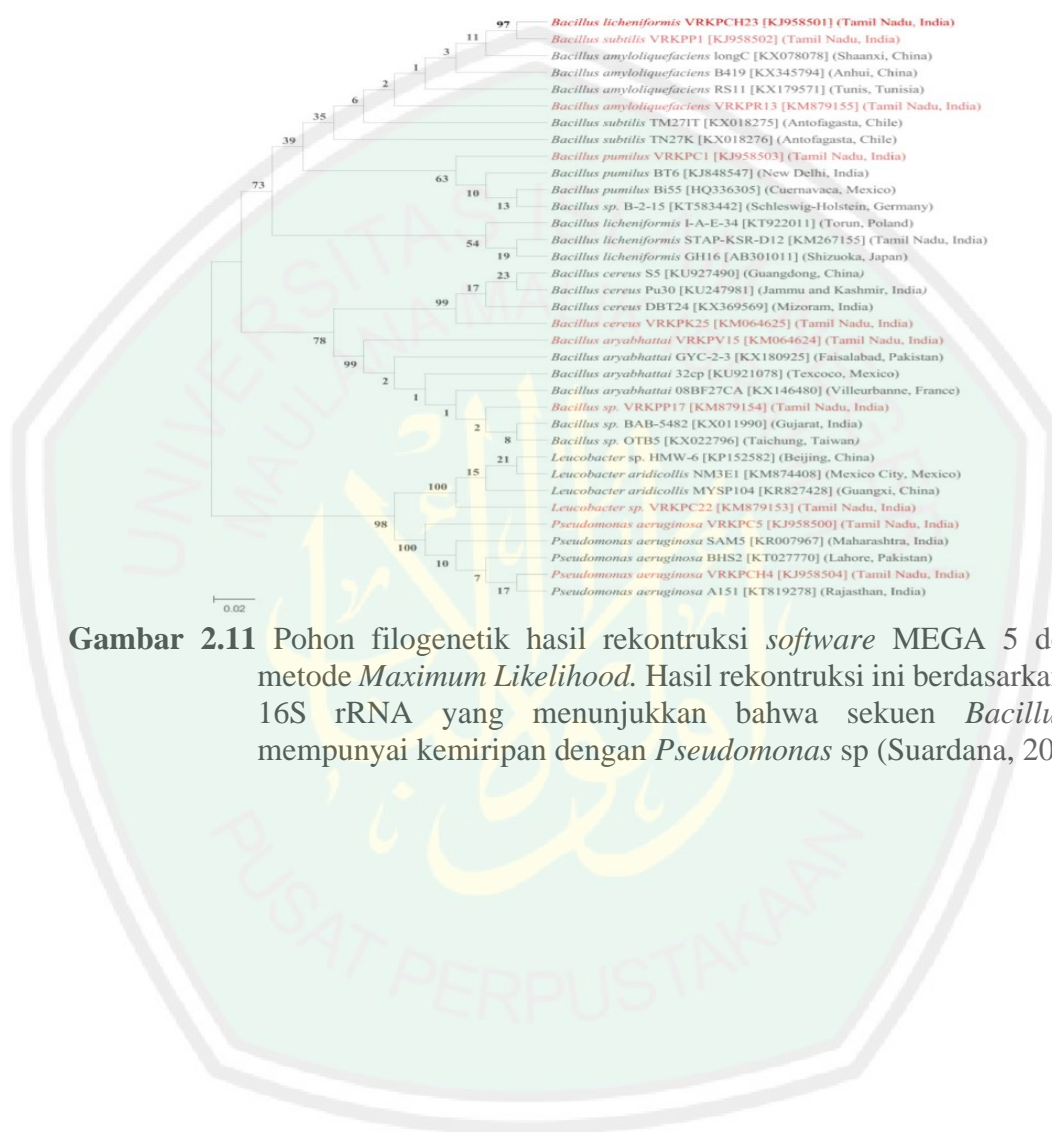
Sikuensing DNA adalah salah satu metode yang dibuat untuk identifikasi spesies secara lebih akurat, cepat, dan lengkap. Proses sikuensing ini menggunakan daerah gen yang pendek serta standart sehingga digunakan sebagai standart internal yang memudahkan dalam penentuan taksonomi spesies disebut dengan DNA *barcode*. Prinsip DNA *barcode* yaitu penentuan sekuen DNA dengan memilih sekuen yang mempunyai ukuran pendek yang berasal dari standart genom spesies yang diteliti. *Barcode* spesies yang tidak diketahui nantinya akan dibandingkan

dengan *barcode* yang telah diketahui melalui pustaka yang telah ada. Jika perbandingan sekuen spesies yang diteliti sama dengan sekuen *barcode* yang ada dalam pustaka maka identifikasi spesimen disesuaikan dengan yang telah ada di dalamnya. Sebaliknya, apabila sekuen spesies tidak tersedia dalam pustaka maka, spesies tersebut merupakan sekuen untuk spesies yang baru (Hebert & Gregory, 2005; Rohimah dkk., 2018).

Terdapat beberapa metode yang dapat diterapkan dalam analisis sekuen DNA, salah satunya adalah metode Sanger. Metode Sanger merupakan metode yang menggunakan DNA primer spesifik dalam analisis sekuensingnya. Hasil yang diperoleh dari metode ini yaitu kromatogram yang menunjukkan urutan basa nitrogen yang ada dalam DNA. Urutan basa nitrogen tersebut dibedakan berdasarkan warna yang berbeda di setiap basa nitrogen. Kemudian setiap untai basa DNA tersebut akan disusun kembali menggunakan program yang ada di dalam komputer yang membuat seluruh DNA sel teridentifikasi (Tasma, 2015; Tenney dkk., 2007).

Kromatogram hasil sekuensing selanjutnya diedit menggunakan *software BioEdit* serta dibandingkan dengan data yang telah dimiliki oleh *GenBank*. Dalam *Gen Bank* akan muncul *output* data yang berupa panjang nukleotida, aksesi, susunan sekuen nukleotida, dan sekuen lengkap atau parsial. Sekuen DNA yang telah diseleksi oleh NCBI disejajarkan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (program BLAST-N). Pensejajaran dengan *software* ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen yang cocok untuk dijadikan *barcode*, dimana sekuen tersebut merupakan ciri khas dari spesies tersebut sehingga dapat diketahui homologi dan spesies bakteri. Data hasil pensejajaran kemudian diaplikasikan

dalam pembuatan pohon filogenetik. Pohon filogenetik (**Gambar 2.11**) adalah ilustrasi evolusi yang terjadi pada makhluk hidup yang mempunyai nenek moyang yang sama (Rohimah dkk., 2018; Suardana, 2014).



Gambar 2.11 Pohon filogenetik hasil rekontruksi *software* MEGA 5 dengan metode *Maximum Likelihood*. Hasil rekontruksi ini berdasarkan data 16S rRNA yang menunjukkan bahwa sekuen *Bacillus* sp mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp (Suardana, 2014)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Riset ini dilakukan pada Bulan Juni hingga Oktober 2020 di Laboratorium Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia serta Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang diperlukan untuk pengambilan sampel diantara lain *ziplog* steril, sendok steril, dan *icebox*. Preparasi plastik LDPE membutuhkan seperangkat peralatan gelas yang terdiri dari lampu UV, oven, dan neraca analitik. Peralatan gelas yang diperlukan dalam isolasi bakteri dan uji aktivitas bakteri pendegradasi plastik yaitu jarum ose, seperangkat peralatan gelas, neraca analitik, cawan petri, *micro tube* 1,5 mL, *vortex*, *hotplate*, *shaker*, dan *incubator* (*Thermoscientific*).

Identifikasi bakteri secara fenotip membutuhkan peralatan seperti jarum ose, preparat kaca objektif, mikroskop, bunsen, dan pipet tetes. Identifikasi dengan FTIR memerlukan peralatan yaitu spektroskopi FTIR. Isolasi DNA bakteri menggunakan peralatan yang meliputi *autoclave*, Bunsen, tip mikropipet, *centrifuge*, *collection tube*, minispin kolom, dan mikropipet. Uji kualitatif DNA menggunakan seperangkat peralatan elektroforesis, spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), dan lampu UV transluminator. Sedangkan tahap

amplifikasi DNA menggunakan seperangkat alat PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian degradasi plastik oleh bakteri diantaranya yaitu sampel tanah di dapatkan dari Tempat Pembuangan Akhir Sampah di Jalan Pisang. Isolasi bakteri membutuhkan bahan yang berupa MSM yang mengandung akuades, KH_2PO_4 0,02 %, KH_2PO_4 0,25%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, NaCl 0,05 %, FeSO_4 0,0005%, glukosa, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%. Identifikasi bakteri secara fenotip membutuhkan bahan antara lain kristal violet, iodin, akuades, alkohol 95%, malasit hijau, dan safranin.

Proses Isolasi DNA bakteri menggunakan peralatan yang meliputi *autoclave*, Bunsen, tip mikropipet, *centrifuge*, *collection tube*, minispin kolom, dan mikropipet. Proses elektroforesis membutuhkan bahan diantaranya agarose, buffer TAE, larutan buffer, etidium bromide, seperangkat peralatan elektroforesis, spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), dan lampu UV transluminator.. Sedangkan proses amplifikasi DNA menggunakan bahan master pcr mix, *forward primer*, *reverse primer*, dan ekstrak DNA.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan beberapa tahap, diantaranya:

1. Pengambilan sampel
2. Preparasi plastik LDPE
3. Isolasi bakteri pendegradasi plastik LDPE

4. Identifikasi Bakteri Pendegradasi Plastik secara Fenotip
5. Produksi Inokulum
6. Uji biodegradasi LDPE
7. Identifikasi dengan FTIR
8. Isolasi DNA dengan Kit
9. Uji kualitatif DNA dengan elektroforesis gel agarosa
10. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR
11. Analisis Data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari kawasan Tempat Pembuangan Akhir Sampah Jalan Pisang Kota Malang. Sampel tanah yang diambil berada pada daerah timbunan plastik terburuk di tiga area yang berbeda. Kedalaman tanah yang diambil berkisar ± 5 cm. Masing-masing sampel tanah diukur pH dan suhu kemudian diambil sebanyak 100 gram. Setelah itu, tanah dimasukkan ke dalam *ziplog* steril yang berbeda dan dimasukkan *ice box* dan dibawa ke laboratorim untuk dihomogenkan (Muhonja, 2018, 2018; Sulistyarini dkk., 2017).

3.4.2 Preparasi Plastik LDPE

Preparasi sampel plastik dilakukan dengan menggabungkan metode Ainiyah (2014) serta Rosario dan Baburaj (2017). Plastik dengan ukuran 2 x 2 cm. Kemudian disterilisasi menggunakan alkohol 70 % selama ± 24 jam. Selanjutnya

plastik diletakkan dibawah lampu UV pada *laminar air flow* selama 24 jam. Kemudian sampel ditimbang menggunakan neraca analitik.

3.4.3 Isolasi Bakteri Pendegradasi LDPE

Tanah 10 gram dimasukkan dalam botol kaca steril. Kemudian dimasukkan 30 mL *Mineral Salt Media* (MSM) *broth* steril dengan kadar glukosa 1%. Potongan plastik dimasukkan dalam botol steril dengan menggunakan pinset steril hingga dipastikan potongan plastik tertanam secara keseluruhan dalam tanah. Selanjutnya, diinkubasi plastik LDPE selama 7 hari dalam suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, plastik diambil dengan menggunakan pinset steril dan dimasukkan dalam tabung reaksi steril. Selanjutnya, dilakukan seri pengenceran sebanyak delapan kali (10^{-8}). Hasil pengenceran dipindahkan ke cawan petri yang diisi medium *Mineral Salt Media* (MSM) agar 1% glukosa sebelumnya secara *pour plate* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Vignesh dkk., 2016; Ainiyah, 2014).

3.4.4 Pengamatan Morfologi Bakteri Hasil Isolasi

3.4.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Satu ose inokulum hasil isolasi diambil kemudian ditumbuhkan pada NA (*Nutrient Agar*) dalam cawan petri steril. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan temperatur 37°C. Koloni yang tumbuh diamati morfologinya meliputi permukaan koloni bakteri (halus atau kasar), elevasi, tepi koloni, serta pewarnaan gram bakteri (Wantania dkk., 2016; Firdausi dkk., 2016).

3.4.4.2 Pewarnaan Gram

Perlakuan dalam pewarnaan gram bakteri yaitu ditambahkan 2 tetes aquades steril diatas kaca preparat. Satu ose koloni bakteri diambil dan diinokulasikan dalam kaca preparat. Dilewatkan kaca preparat diatas api bunsen secara cepat dan hati-hati hingga tidak ada aquades yang tersisa. Selanjutnya, sebanyak satu tetes kristal violet di teteskan pada kaca preparat dan diinkubasi satu menit. Kaca preparat dibilas dengan akuades steril dan dikeringkan. Kemudian ditambahkan dua tetes larutan iodin dan didiamkan dua menit. Setelah dua menit, ditetesi dengan alkohol 95%, didiamkan selama satu menit, dan dibilas kembali dengan menggunakan akuades steril. Larutan safranin ditambahkan sebanyak dua tetes, didiamkan satu menit, dicuci kembali dengan akuades, dan dikeringkan (Nurhidayati dkk., 2015).

Tahapan terakhir adalah diamati dengan menggunakan mikroskop. Apabila koloni bakteri yang teramati oleh mikroskop menunjukkan warna violet menandakan bakteri hasil isolasi merupakan bakteri gram positif, akan tetapi apabila menunjukkan warna merah menandakan isolate bakteri termasuk dalam kelompok gram negatif. Hasil pengamatan difoto dan dicatat bentuk koloni sel bakteri (Nurhidayati dkk., 2015).

3.4.4.3 Pewarnaan Endospora

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose kemudian digoreskan diatas *object glass* steril. Setelah itu, kaca preparat dilewatkan diatas api bunsen untuk fiksasi. Kaca preparat kemudian dibungkus dengan kertas saring dan ditetesi satu tetes malasit hijau untuk kemudian dibiarkan selama 4 menit. Selanjutnya, kertas saring dilepaskan dan dibilas kaca preparat dengan menggunakan akuades steril yang mengalir. Preparat dikeringkan diatas api busen. Kaca preparat yang telah kering

ditetesi 1 tetes safranin dan didiamkan selama 5 menit. Setelah 5 menit kaca preparat diamati dibawah mikroskop menggunakan perbesaran 1000x (Pratita dan Surya, 2012).

3.4.5 Produksi Inokulum

Satu ose bakteri hasil pemurnian diinokulasikan dalam 10 mL *Nutrient Broth*. Kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* menggunakan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada temperatur 37°C (Mahmudah, 2009).

3.4.6 Uji Biodegradasi LDPE oleh Bakteri

Inokulum diambil 100 µL dan diinokulasikan ke dalam media MSM *broth* 0,5% glukosa 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian dimasukkan plastik LDPE yang telah dipreparasi ke dalam media kultur. Sebagai kontrol negatif, digunakan plastik LDPE yang dimasukkan ke dalam media MSM *broth* 0,5% glukosa tanpa adanya penambahan inokulum bakteri. Erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup dengan *plastik wrap*. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang dan di *shaker* menggunakan kecepatan 120 rpm selama 52 hari. Setelah itu, plastik LDPE yang ada di dalam erlenmeyer 250 mL diambil, dicuci, dan dikeringkan. Ditimbang plastik untuk mengetahui berat akhir setelah mengalami biodegradasi dan dihitung persentase degradasi plastik dengan menggunakan persamaan (1): (Mukred dkk., 2008; Sangeetha dkk., 2019; Singh dkk., 2015; Tri dkk., 2016).

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

3.4.7 Identifikasi Gugus Fungsi LDPE Hasil Degradasi Menggunakan FTIR

Analisis kualitatif degradasi plastik oleh bakteri digunakan identifikasi gugus fungsi dari plastik LDPE menggunakan FTIR. Lembaran plastik LDPE sebelum dan sesudah degradasi dimasukkan dalam *sample holder*. Selanjutnya *sample holder* dimasukkan dalam instrument FTIR. Bilangan gelombang yang digunakan dalam analisa gugus fungsi dalam plastik LDPE 4000-400 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} .

3.4.8 Isolasi DNA dengan Menggunakan Reagen Kit *Vivantis GF-1*

Kultur bakteri yang berusia semalam diambil 1 sampai 3 mL, kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifuse. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, ditambahkan 100 μL *buffer R1* ke dalam mikrotube dan diresuspensi dengan diaduk menggunakan mikropipet. Ditambahkan 20 μL lisozim ke dalam suspensi dan di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit.

Protein dalam DNA diresuspensi dengan ditambahkan *buffer R2* 200 μL kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit dalam *waterbath*. Setelah itu, untuk menghilangkan RNA, ditambahkan RNase sebanyak 20 μL lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Ditambahkan *buffer BG* sebanyak 440 μL untuk proses homogenisasi kemudian diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 10 menit dan ditambahkan etanol absolut sebanyak 200 μL .

Sampel dari tabung sentrifugasi kemudian dipindahkan ke dalam kolom sebanyak 650 μL dan disentrifugasi 15 menit menggunakan kecepatan 5000 rpm.

Kolom selanjutnya dicuci dengan menggunakan *wash buffer* 650 μL lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Elusi DNA dari kolom dilakukan dengan menambahkan 50 μL *elution buffer*. Hasil DNA yang terelusi selanjutnya dipindahkan ke dalam mikrotube baru untuk disimpan di suhu 4°C (Vivantis).

3.4.9 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Proses pembuatan gel agarosa dilakukan dengan ditimbang 0,4 gram agarosa yang kemudian ditambahkan buffer TAE 1x. Komposisi buffer ini yaitu EDTA 0,5 M pH 8,0 dengan volume akhir larutan 40 mL (1% b/v). Setelah itu, larutan dipanaskan dalam *microwave* hingga agarose terlarut secara sempurna. Larutan gel agarose yang telah larut dicetak dalam landasan gel yang dilengkapi sisir untuk membentuk sumur yang berukuran 1 cm dan ditambahkan 0,5 μL larutan etidium bromide. Gel kemudian didiamkan selama 1 jam agar berubah menjadi bentuk padatan. Setelah memadat, sisir yang ada di dalam cetakan dilepas secara perlahan untuk kemudian dimasukkan ke dalam sel elektroforesis.

Sel elektroforesis diisi dengan buffer TAE 1x hingga gel agarosa tenggelam dalam buffer. Selanjutnya, dipipet sampel sebanyak 10 μL dan dimasukkan dalam sumur. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 60 volt selama 1 jam. Gel hasil elektroforesis diamati dibawah sinar UV untuk mengamati pita yang terbentuk (Aslinda & Ahyar, 2016).

3.4.10 Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR

Amplifikasi gen 16rRNA dilakukan menggunakan metode PCR. Pembuatan PCR dilakukan berdasarkan Asmawati (2016) yakni dengan menambahkan DNA

templat 2 μL , *distilled water* 16 μL , primer F (*forward*) 1 μL (10 pmol/ μL), R (*reverse*) 1 μL (10 pmol/ μL), PCR *reaction mixture* yang mengandung DNA *polymerase*, dNTPs, *gel loading buffer*, dan *reaction buffer*. Pasangan primer yang dibutuhkan dalam proses PCR yaitu 27F (5'-AGAGTTTGACA TGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGA-3').

Reaksi amplifikasi terjadi dalam 35 siklus dengan rincian dalam satu kali siklus terdiri dari tiga tahapan. Tahapan antar siklus diantaranya denaturasi awal dilakukan dengan suhu 94°C selama 4 menit, denaturasi 94°C selama 40 detik, *annealing* pada temperature 56 dan 58°C selama 30 detik, eksistensi 72°C selama 2 menit dan elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi DNA disekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan metode *deoxynucleotide chain termination* Sanger di BASE Singapura (Sangeetha Devi dkk., 2019).

3.4.11 Analisa Data Hasil Sikuensing

Hasil sikuensing DNA disusun dengan menggunakan aplikasi Bioedit. Setelah itu, dianalisa urutan basa nitrogen sikuen dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>). Untuk mengetahui jenis bakteri yang mempunyai daya degradasi plastik tertinggi serta hubungan famili antar bakteri dibuat pohon filogenik dengan menggunakan bantuan program bioinformatika MEGA 10 (Rau dkk., 2018; Sangeetha Devi dkk., 2019; Pananjung dkk., 2016).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Plastik LDPE (*Low Density Polyethylene*) adalah salah satu yang sulit terdekomposisi secara alami. Dekomposisi plastik LDPE secara alami dibantu oleh aktivitas bakteri dalam tanah. Bakteri pendegradasi plastik LDPE diisolasi dari tanah daerah penimbunan sampah plastik, seperti TPA Jalan Pisang Kipas Kota Malang. Spesies bakteri pendegradasi plastik dapat diketahui dengan menggunakan analisis fenotip yang dikuatkan dengan uji genotip menggunakan penanda 16S rRNA. Selanjutnya hasil analisa akan dibuat pohon filogenetik sehingga didapatkan hubungan kekerabatan antar spesies.

4.1 Isolasi Bakteri Pendegradasi LDPE

Isolasi bakteri indigenus tanah TPA dilakukan untuk memperoleh isolat bakteri yang menjadikan LDPE sebagai sumber makanan utama. Kriteria sampel tanah yang dipertimbangkan yaitu kepadatan dan kedalaman tanah yang tertimbun sampah plastik. Uji pendahuluan yang dilakukan yaitu dengan mengukur derajat keasaman secara *ex situ* menggunakan pH universal serta temperatur tanah. **Tabel 4.1** merupakan tabel yang menunjukkan bahwa temperatur tanah sampeling dikategorikan hangat dengan suhu 30°C, 32°C, dan 36°C serta pH tanah sebesar 6.

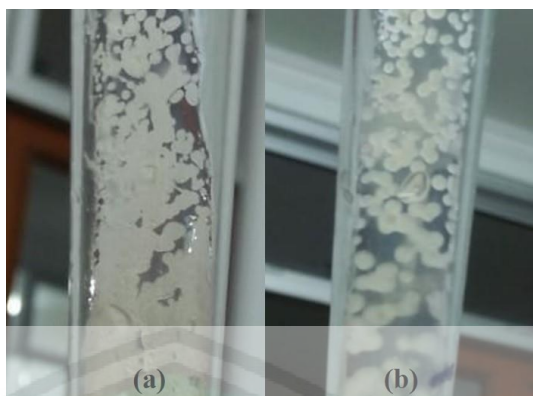
Tabel 4.1 Hasil pengukuran temperatur dan pH tanah

| Titik Sampling | Temperatur (°C) | pH |
|----------------|-----------------|----|
| 1 | 32°C | 6 |
| 2 | 30°C | 6 |
| 3 | 36°C | 6 |

Tahap isolasi bakteri indigen pendegradasi plastik yaitu dengan memasukkan tanah ke dalam media MSM (*Mineral Salt Medium*) cair. MSM dipilih karena merupakan media yang digunakan sebagai tempat pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri yang berperan dalam degradasi cemaran polimer. Adanya penambahan plastik LDPE pada tanah yaitu untuk *screening* awal bakteri yang mampu menguraikan struktur polimer plastik LDPE.

Sampel tanah diinkubasi selama 7 hari untuk memaksimalkan pertumbuhan bakteri dalam media. Kultur cair tersebut diencerkan sebanyak delapan kali pengenceran (10^{-8}). Pengenceran bertingkat ini dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kepadatan koloni bakteri pendegradasi plastik. Setiap hasil pengenceran diinokulasikan ke media MSM agar dengan kadar glukosa 1%. Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan kultivasi ke dalam media MSM agar 1% baru. Berdasarkan hasil isolasi, didapatkan dua isolat bakteri yaitu isolat bakteri PDB1 dan PDB2. **Gambar 4.1** menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut mempunyai bentuk sel serta morfologi koloni yang berbeda.

Pengamatan morfologi yang dilakukan meliputi pengamatan bentuk, tepian, elevasi, serta warna koloni. Isolat bakteri PDB1 mempunyai bentuk dan tepian yang berfilamen, elevasi rata dengan media, ukuran besar, tembus cahaya, dan warna koloni krem. Koloni isolat bakteri PDB2 mempunyai karakteristik fisik dengan bentuk yang bulat dengan tepian rata, elevasi yang rata dengan media, ukuran koloni sedang, tembus cahaya, dan berwarna krem.



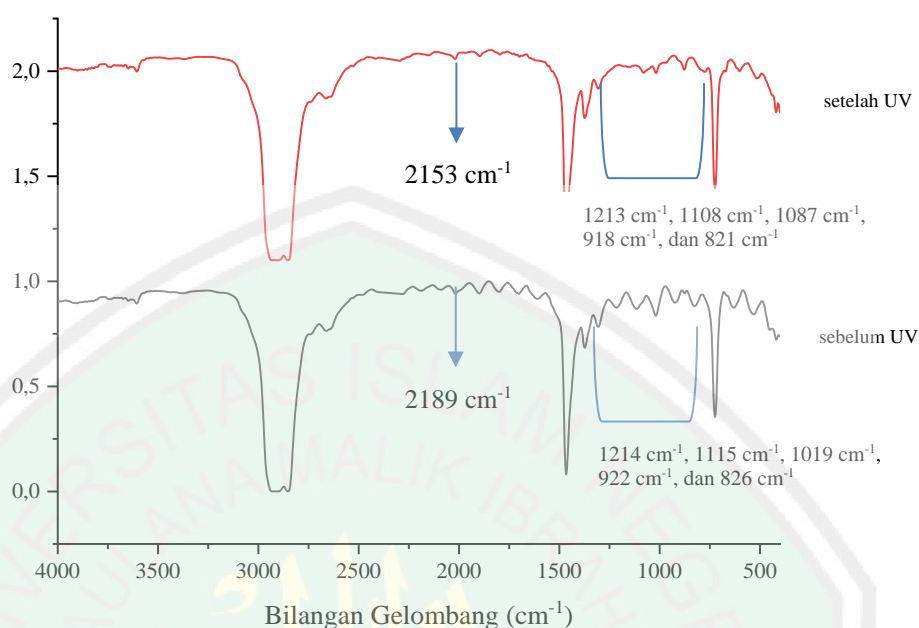
Gambar 4.1 Isolat bakteri yang telah diisolasi dan berpotensi menjadi bakteri pendegradasi plastik. (a) Isolat PDB1; (b) Isolat PDB2

4.2 Treatment Fisik Plastik LDPE

Perlakuan awal terhadap plastik LDPE yang akan didegradasi yaitu menggunakan paparan sinar UV. Sinar UV mampu diserap oleh molekul plastik sehingga membuat kerusakan struktur kimia padanya (Sarengat, 2011). Identifikasi adanya perubahan gugus fungsi pada struktur plastik LDPE sebelum dan sesudah proses degradasi dilakukan dengan menggunakan instrumentasi FTIR. Gugus fungsi yang terbentuk mampu meningkatkan adanya dugaan bahwa telah terjadi proses fotodegradasi oleh sinar UV.

Tabel 4.2 Interpretasi spektra FTIR Plastik LDPE

| Spektra sebelum UV | Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) | | Intensitas Socrates (1994) | Jenis Vibrasi |
|--------------------|--|-----------------|----------------------------|--|
| | Serapan spektra | Socrates (1994) | | |
| 2852 | 2852 | 2975-2950 | Tajam | -CH ₃ (ulur) |
| 1465 | 1466 | 1480 – 1440 | Tajam | C-H pada CH ₂ (bending) |
| 1373 | 1373 | 1395 – 1365 | Lemah | -CH(CH ₂) ₃ (bending) |
| 1306 | 1305 | 1350 – 1280 | Lemah | C-H (weak) |
| 1214 | 1221 | 1370-1220 | Lemah | C-H (stretch sym) |
| 826-1019 | 1087- 821 | 1200-800 | Lemah | C-C (stretch) |
| 724 | 723 | 750-720 | Medium | C-H (goyang) |



Gambar 4.2 Spektra FTIR sebelum *treatment* dengan UV dan sesudah *treatment* UV terlihat adanya pengurangan intensitas

Berdasarkan **Gambar 4.2** dan **Tabel 4.2** diatas yang memperlihatkan adanya pengurangan intensitas plastik LDPE setelah UV yaitu pada bilangan gelombang 2153 yang merupakan vibrasi $C \equiv C$ (*stretch*). Selain itu, pengurangan intensitas serapan juga terjadi pada daerah bilangan gelombang 1213 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 918 cm^{-1} , 876 cm^{-1} , dan 821 cm^{-1} yang merupakan serapan dari vibrasi rantai karbon.

4.2 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Biodegradasi LDPE

Uji kuantitatif secara gravimetri dan uji kualitatif dengan spektrofotometer FTIR dilakukan untuk mengetahui potensi isolat bakteri dalam mendegradasi plastik LDPE selama 52 hari. Adanya kekeruhan pada media menunjukkan bahwa

kedua isolat bakteri mampu tumbuh dalam media MSM *broth* dengan kadar glukosa 0,5% .

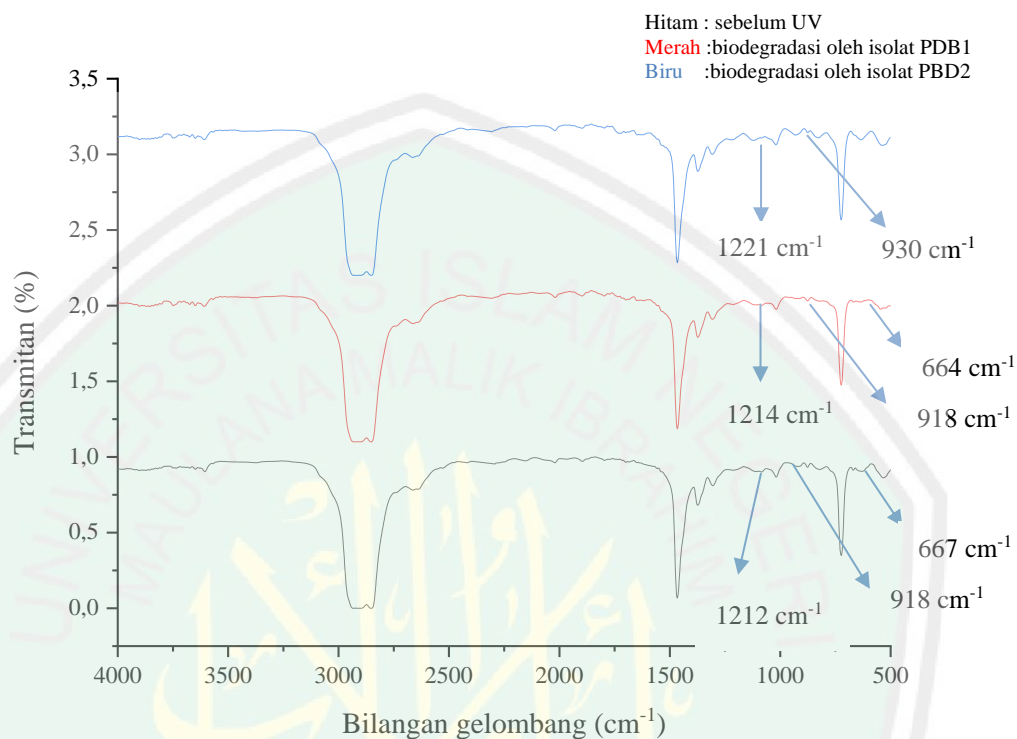
Tabel 4.3 Hasil Uji biodegradasi plastik LDPE Isolat PDB1 dan PDB2

| Isolat bakteri | Pengulangan | Berat awal (gram) | Berat akhir (gram) | Weigh loss (gram) | Persentase degradasi (%) |
|----------------------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
| PDB1 | Ulangan 1 | 0,014 | 0,0139 | 0,0001 | 0,71% |
| | Ulangan 2 | 0,013 | 0,0128 | 0,0002 | 1,54% |
| | Ulangan 3 | 0,013 | 0,0130 | 0 | 0 |
| Persen degradasi rata-rata | | | | | 0,75±0,0078 |
| PDB2 | Ulangan 1 | 0,0116 | 0,0119 | 0,0259 | 2,586 |
| | Ulangan 2 | 0,0123 | 0,0122 | 0,00813 | 0,8130 |
| | Ulangan 3 | 0,0132 | 0,0123 | 0,0151 | 1,5151 |
| Persen degradasi rata-rata | | | | | 1,63±0,0080 |

Perolehan nilai berat plastik LDPE yang telah di degradasi oleh isolat PDB1 dan PDB2 disajikan dalam **Tabel 4.3** Berdasarkan hasil kuantitatif dengan gravimetri diperoleh presentase degradasi plastik oleh isolat bakteri PDB2 lebih besar dari pada isolat bakteri PDB1 dengan nilai rata-rata masing-masing isolat 0,75±0,0078% dan 1,63±0,0080%. Hasil uji kualitatif menggunakan FTIR pada **Gambar 4.3** dan **Tabel 4.4** dapat dipahami bahwa plastik LDPE yang didegradasi oleh isolat PDB1 menunjukkan adanya perbedaan intensitas spektra setelah di UV dan setelah di degradasi baik oleh isolat PDB1 dan PDB2.

Pada spektra FTIR plastik LDPE oleh isolat PDB1 menunjukkan adanya kesamaan intensitas pada bilangan gelombang 918 cm⁻¹ yang termasuk vibrasi C-C *stretch* sedangkan pada isolat PDB2 pada bilangan gelombang yang sama terjadi penambahan intensitas yaitu 930 cm⁻¹. Selain itu, perbedaan terlihat pula pada bilangan gelombang 667 cm⁻¹ pada spektra FTIR setelah UV dan PDB1 yang

merupakan vibrasi dari C-H dimana vibrasi tersebut hilang pada spektra plastik LDPE pada PDB2.



Gambar 4.3 Spektra FTIR sesudah UV dan setelah degradasi

Tabel 4.4 Interpretasi spektra plastik LDPE setelah degradasi

| Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---|
| Setelah UV | Hasil degradasi isolat PDB1 | Hasil degradasi isolat PDB2 | Referensi (Socrates 1994) | Intensitas (Socrates, 1994) | Jenis Vibrasi |
| 1466 | 1465 | 1466 | 1480-1440 | Tajam | -CH ₂ (gunting) |
| 1372 | 1372 | 1372 | 1395 – 1365 | Sedang | C-H pada CH ₃ (<i>bending</i>) |
| 1307 | 1306 | 1307 | 1350 - 1280 | Lemah | C-H (<i>weak</i>) |
| 1221 | 1214 | 1221 | 1370-1220 | Lemah | C-H (<i>stretch sym</i>) |
| 930 dan 872 | - | 930 dan 872 | 1200-800 | Lemah | C-C (<i>stretch</i>) |
| 724 | 723 | 724 | 750-720 | Medium | C-H (<i>goyang</i>) |

Berdasarkan hasil uji kuantitatif dan kualitatif dapat diketahui bahwa isolat bakteri baik isolat PDB1 dan PDB2 belum mampu memanfaatkan rantai karbon yang ada di dalam struktur molekul plastik LDPE secara optimal. Penelitian yang dilakukan oleh Shrestha dkk (2019) pada **Tabel 4.5** melaporkan bahwa bakteri *Bacillus coagulans* mempunyai presentase degradasi LDPE sebesar 8% dengan masa inkubasi 60 hari. Penelitian lain yang dilakukan oleh Vimala dan Mathew (2016) menggunakan plastik LDPE setelah *treatment* UV 72 jam yang didegradasi oleh isolat tunggal *Bacillus substilis* mendapatkan persentase degradasi sebesar 0,03% selama 30 hari. Berdasarkan hal tersebut, dapat diketahui bahwa presentase degradasi plastik LDPE isolat bakteri PDB1 dan PDB2 tergolong rendah.

Tabel 4.5 Persentase degradasi plastik LDPE oleh bakteri *Bacillus* sp

| Jenis Bakteri | Lama Inkubasi | Persentase Degradasi (%) | Referensi |
|---------------------------|---------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Bacillus coagulans</i> | 60 hari | 8 | Shrestha, dkk (2019) |
| <i>Bacillus substilis</i> | 30 hari | 0,03 | Vimala, dkk (2016) |

Perbedaan lingkungan menyebabkan persentase kehilangan berat pada plastik LDPE dan spektra FTIR tidak berubah secara signifikan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi diantaranya jenis bakteri, paparan sinar UV yang kurang, suhu inkubasi yang tidak stabil, dan penempatan inokulum diluar *shaker incubator*.

Sinar UV mampu menurunkan sifat hidrofobilitas plastik LDPE. Lama paparan sinar UV yang diberikan pada permukaan plastik, maka sifat hidrofobilitas plastik LDPE akan diubah menjadi struktur yang bersifat hidrofilik. Permukaan yang telah bersifat hidrofilik akan membuat lebih mudah koloni bakteri menempel pada permukaan plastik (Kumar & Raut, 2015). Triasita dan Maya (2015)

menjelaskan bahwa hasil dari biodegradasi akan lebih maksimal apabila bakteri mampu membentuk lapisan biofilm di permukaan plastik. Proses penempelan bakteri pendegradasi plastik di permukaan plastik juga dipengaruhi oleh proses pengocokan serta suhu pada media inokulasi.

Adanya *shaker* dalam proses inkubasi mampu meningkatkan kemampuan bakteri dalam menempel pada permukaan plastik dan mencegah sel koloni bakteri tertimbun dasar media biakan. Sihalono (2011) dan Vadiska (2015) menyatakan bahwa pengocokan akan membuat sel bakteri mengapung sehingga nutrisi yang terkandung dalam media mampu dimanfaatkan secara optimal. Suhu inkubasi berpengaruh pesat pada pertumbuhan bakteri. Apabila suhu inkubasi degradasi LDPE tinggi atau rendah mampu menyebabkan terhambatnya proses pertumbuhan serta perkembangan sel bakteri. Riset Vimala dan Mathew (2016), Bhatia, dkk (2014), Das dan Kumar (2015), dan Muhonja, dkk (2018) menunjukkan bahwa perlakuan dalam proses degradasi plastik menggunakan media cair dilakukan dalam *shaker incubator* dengan suhu 37°C pada kecepatan 150 rpm.

Selain ketiga faktor diatas, spesies bakteri berperan dalam proses penempelan pada permukaan plastik. Menurut Nur (2020), spesies bakteri yang mampu mendegradasi plastik mempengaruhi kecepatan plastik untuk didegradasi. Kondisi pendukung pertumbuhan media berupa oksigen, pH, suhu, nutrisi, kelembapan, serta mineral harus disesuaikan dengan karakteristik bakteri pendegradasi plastik. Selain itu, bakteri yang mempunyai flagella, fimbri, serta polisakarida akan memperbesar peluang pelekatan bakteri pada permukaan plastik.

4.3 Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Hasil Isolasi

4.3.1 Pewarnaan Gram

Identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram digunakan untuk membedakan spesies bakteri pendegradasi plasti LDPE berdasarkan gramnya yaitu bakteri gram positif (+) dan bakteri gram negatif (-). Bakteri gram positif akan menampilkan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif akan terlihat berwarna merah.



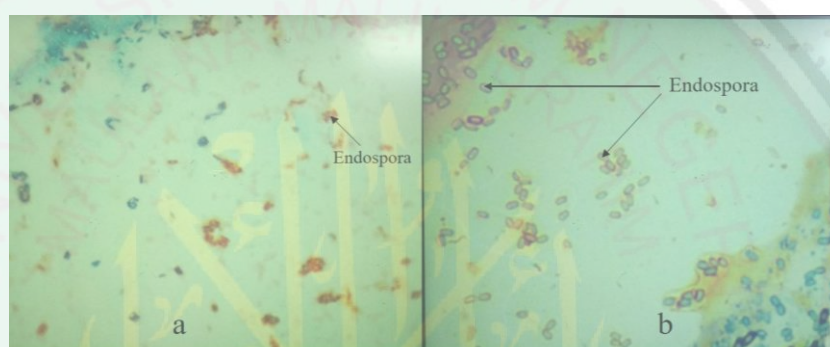
Gambar 4.4 Pengamatan pewarnaan gram PDB1 dan PDB2 dengan perbesaran 1000x

Berdasarkan **Gambar 4.4** dapat diketahui bahwa isolat bakteri PDB1 dan PDB2 berwarna ungu sehingga dapat diindikasikan bahwa bakteri tersebut bersifat gram positif dengan bentuk koloni basil. Safrida, dkk (2012) menjelaskan bahwa warna ungu yang terbentuk disebabkan adanya pengikatan kristal violet sebagai pemberi warna primer di dinding sel bakteri gram positif yang lebih kompleks .

Terdapat beberapa bakteri yang mampu mendegradasi plastik LDPE. Bakteri tersebut berasal baik dari spesies gram positif maupun gram negatif. Beberapa bakteri pendegradasi plastik dari kelompok gram positif diantaranya *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus cereus* (Muhonja dkk., 2018), *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus fermus* (Patil, 2018), dan *Bacillus substilis* (Vimala dan Mathew, 2016).

4.3.2 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora digunakan untuk mengamati genus bakteri yang mampu memproduksi endospora pada kondisi ekstrem. Keberadaan spora bakteri dapat diamati dengan menggunakan metode *Schaeffer Fulton* yang menggunakan malasit hijau dan safranin sebagai pewarna dalam proses *staining* (Pratita dkk., 2012 dan Oktari dkk., 2017).



Gambar 4.5 Hasil pewarnaan endospora (a) Isolat bakteri PDB1 (b) Isolat bakteri PDB2

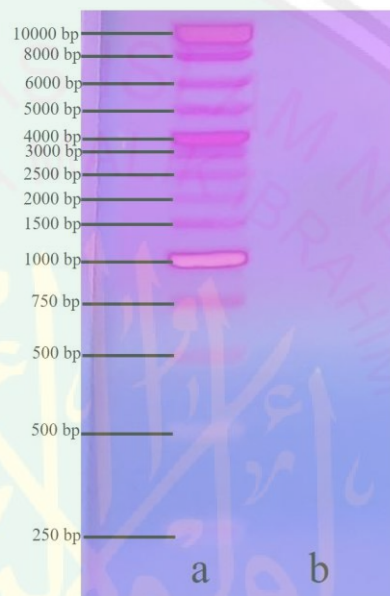
Berdasarkan **Gambar 4.5** dapat diketahui bahwa isolat PDB1 dan PDB2 mampu membentuk endospora berbentuk elips. Endospora berfungsi sebagai pelindung bakteri pada saat berada dalam kondisi ekstrim. Esmaeili, dkk (2013) dan Matjastic (2020) menyatakan bahwa terdapat 15% bakteri pendegradasi plastik yang mempunyai karakteristik mampu membentuk endospora mayoritas berasal dari genus *Bacillus* sp. dengan spora yang berbentuk silinder.

4.4 Identifikasi Secara Genotip dan Fenotip Isolat PDB2

4.4.1 Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Identifikasi spesies bakteri pendegradasi plastik hasil isolasi secara genetik dilakukan pada sampel PDB2. Hal tersebut disebabkan persentase degradasi PDB2

yang lebih tinggi dibandingkan dengan PDB1. Prinsip isolasi DNA yaitu untuk memisahkan DNA dari kontaminan sel seperti RNA, protein, dan biomolekul lainnya. Kualitas DNA dapat diketahui dari terbentuknya pita pada elektroforegram hasil elektroforesis sedangkan kuantitasnya yang dapat dilihat dari hasil spektrofotometer dengan *range* absorbansi 1,8-2,0.



Gambar 4.6 Hasil elektroforegram isolasi DNA bakteri PDB2 menggunakan *Kit Vivantis Nucleic Extraction*. Lajur a merupakan penanda dengan ukuran 10000 bp sedangkan lajur b adalah hasil isolasi DNA pengulangan 1 dengan kemurnian 2,18

Uji kualitatif hasil isolasi DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%.

Berdasarkan hasil elektroforegram pada **Gambar 4.6** isolat DNA pengulangan 1 menunjukkan tidak ada pita yang tampak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi DNA yang rendah seperti yang diketahui dalam hasil uji pada spektrofotometer NanoDrop pada **Tabel 4.6**. Menurut Sari dkk. (2009), konsentrasi DNA yang rendah disebabkan oleh proses pemisahan DNA pada sel serta pengikatan isolat DNA pada kolom silika kurang optimal.

Hasil uji kuantitatif secara spektroskopi dilakukan untuk mengetahui kadar kemurnian serta konsentrasi DNA hasil isolasi. **Tabel 4.6** menunjukkan nilai kemurnian DNA hasil isolasi yang beragam.

Tabel 4. 6 Hasil uji kuantitatif isolasi DNA menggunakan *Kit Vivantis Nucleic Extraction*

| Pengulangan | Absorbansi $A_{260/280}$ | Konsentrasi (ng/uL) |
|-------------|-----------------------------|------------------------|
| 1 | 2,18 | 43,39 |
| 2 | 1,34 | 19,06 |
| 3 | 1,51 | 164,41 |
| 4 | 1,56 | 112,52 |

Berdasarkan **Tabel 4.6** dapat diketahui bahwa pengulangan 1 mendapatkan isolat DNA yang memiliki nilai kemurnian yang cukup baik yaitu dengan nilai absorbansi A_{260}/A_{280} sebesar 2,18 dengan konsentrasi DNA 43,39 ng/uL walaupun menurut Pratiwi dan Widodo (2020) masih terdapat kontaminan RNA. Sedangkan pada pengulangan 2, 3, dan 4 menunjukkan nilai absorbansi A_{260}/A_{280} sebesar 1,34; 1,51; dan 1,56. Menurut Kartini (2012) absorbansi dibawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein. Hal ini disebabkan karena protein menyerap pancaran sinar UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Berbeda dengan DNA dan RNA yang menyerap sinar UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm. Berdasarkan hasil uji kualitatif serta kuantitatif dapat dipahami bahwa isolasi DNA menggunakan metode kit mempunyai efektivitas yang cukup baik.

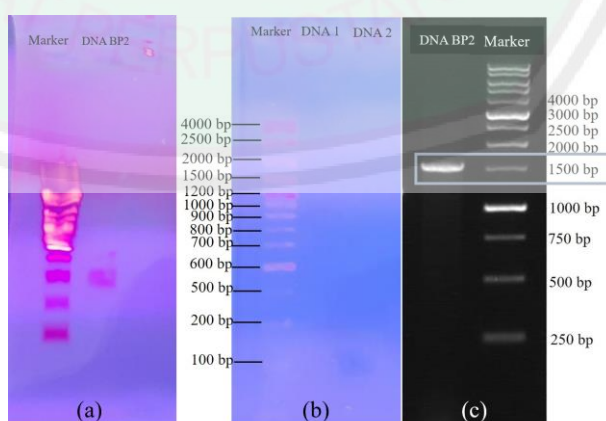
4.4.2 Hasil Amplifikasi 16S rRNA dengan *Thermal Cycler Polymerase Chain*

Reaction

Polymerase Chain Reaction merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memperbanyak jumlah DNA menggunakan fragmen DNA serta temperatur

yang spesifik. Temperatur yang digunakan dalam proses penempelan primer atau amplifikasi pada DNA *template* didasarkan pada *temperature melting* (T_m) pada suhu kisaran 55 hingga 60°C. Proses amplifikasi DNA *template* yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu 56°C serta 58°C. Panjang target amplifikasi gen penanda 16S rRNA dengan pasangan primer 27 F dan 1492 R menurut Nurkanto dan Agustia (2015) adalah 1500 bp.

Berdasarkan **Gambar 4.7** menunjukkan bahwa suhu *annealing* PCR 52°C membentuk elektroforegram yang tipis serta tidak terpisah secara sempurna yang disebabkan amplifikasi yang tidak sempurna. Lain halnya dengan suhu *annealing* 56°C yang menghasilkan elektroforegram tanpa adanya *bend* atau pita. Hal ini dapat disebabkan karena proses amplifikasi DNA tidak terjadi. Menurut Azizah (2009), pengaturan suhu denaturasi dan *annealing* yang tidak sesuai akan menyebabkan untai *double helix* DNA tidak terbuka sehingga nukleotida primer tidak mampu menempel pada DNA *template*. Penggunaan suhu *annealing* 58°C menghasilkan pita DNA tunggal yang linier dengan marker dengan berat molekul ~1500 bp. Ukuran nukleotida yang mencapai 1500 bp menandakan bahwa pasangan primer telah berhasil mengamplifikasi daerah 16S rRNA secara keseluruhan.



Gambar 4.7 Hasil elektroforegram PCR (a) dengan suhu *annealing* 52°C (b) suhu *annealing* 56°C (c) suhu *annealing* 58°C menghasilkan amplikon dengan ukuran ~1500 bp

4.4.3 Keragaman Spesies Bakteri PDB2 Berdasarkan Analisa Bioinformatika

Sekuen nukleotida DNA ditentukan secara *in vitro* menggunakan metode Sanger yang memanfaatkan floresensi dideoksinukleotida (ddNTP) (Jamuar dkk., 2016). Proses sikuensing DNA sampel PDB2 terhadap daerah 16S rRNA menghasilkan ukuran 1465 bp yang ditunjukkan pada **Gambar 4.8**

```
ACNTTACAAGANTGGGCTTCNCCGACAATCCAAAACCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCC
CTGATGTIAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACTTACAGATGG
ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTIAGGGAAGA
ACAAGTACCCTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTYTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAATTCACCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
CTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
GATGAGTCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGAYTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCMCARSCGSYGRKAGCAYGYGGTTTTAATCGA
ARCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGA
AACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTCGGTGAAGC
TGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCACGAGAGTTTTAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCAAG
```

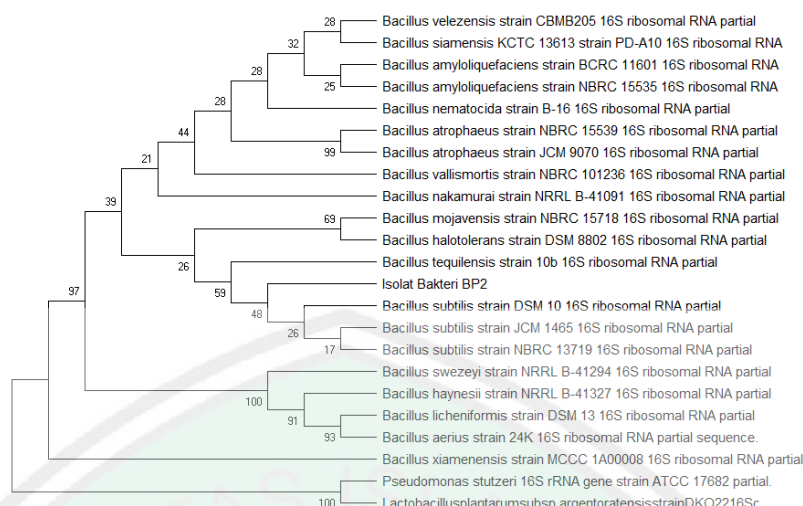
Gambar 4.8 Hasil *contig* sekuen 16S rRNA isolat bakteri PDB2 dengan panjang 1465 bp

Hasil DNA *contig* selanjutnya dianalisa kemiripannya dengan menggunakan program BLAST-n dalam NCBI. Nilai similaritas sikuen DNA bakteri PDB2 pada **Tabel 4.7** berdasarkan data gen yang terdapat dalam BLAST-n menunjukkan adanya kemiripan yang tinggi berdasarkan nilai *Identity* serta *Max Score*. Perolehan *percent identity* sebesar 100% menunjukkan adanya kekerabatan spesies bakteri PDB2 dengan genus bakteri *Bacillus* sp.

Tabel 4.7 Data BLAST-n NCBI terhadap PDB2

| No | Spesies Bakteri Hasil dari NCBI | Nilai Maksimum | Persentase Kekerabatan |
|----|---|----------------|------------------------|
| 1. | <i>Bacillus subtilis</i> strain JCM 1465 | 2595 | 99,58% |
| 2 | <i>Bacillus subtilis</i> strain NBRC 13719 | 2595 | 99,58% |
| 3 | <i>Bacillus subtilis</i> strain DSM 10 | 2595 | 99,58% |
| 4 | <i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b | 2577 | 99,37% |
| 5 | <i>Bacillus vallismortis</i> strain NBRC 101236 | 2569 | 99,23% |
| 6 | <i>Bacillus mojavensis</i> strain NBRC 15718 | 2569 | 99,23% |
| 7 | <i>Bacillus halotolerans</i> strain DSM 8802 | 2569 | 99,23% |
| 8 | <i>Bacillus velezensis</i> strain CBMB205 | 2564 | 99,16% |
| 9 | <i>Bacillus nakamurai</i> strain NRRL B-41091 | 2562 | 99,16% |
| 10 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain BCRC 11601 | 2556 | 99,09% |
| 11 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NBRC 15535 | 2553 | 99,02% |
| 12 | <i>Bacillus nematocida</i> strain B-161 | 2545 | 98,95% |
| 13 | <i>Bacillus atrophaeus</i> strain NBRC 15539 | 2536 | 98,81% |
| 14 | <i>Bacillus atrophaeus</i> strain JCM 9070 | 2534 | 98,81% |
| 15 | <i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 | 2531 | 98,74% |
| 16 | <i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327 | 2466 | 97,96% |
| 17 | <i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13 | 2462 | 97,89% |
| 18 | <i>Bacillus swezeyi</i> strain NRRL B-41294 | 2440 | 97,61% |
| 19 | <i>Bacillus aerius</i> strain 24K 16S ribosomal | 2431 | 97,48% |
| 20 | <i>Bacillus xiamenensis</i> strain MCCC 1A00008 | 2362 | 96,63% |

Metode lain yang digunakan dalam identifikasi kekerabatan antar spesies bakteri dilakukan dengan menggunakan pohon filogenetik melalui *software* MEGA X. Berdasarkan nilai kesamaan dalam **Tabel 4.7** dapat diketahui bahwa isolat PDB2 mempunyai kedekatan genetik dengan spesies bakteri *Bacillus subtilis* strain DSM 10 ribosomal RNA partial. Hasil yang sama ditunjukkan oleh rekonstruksi pohon filogenetik pada **Gambar 4.9** dengan persentase *similarity* sebesar 99%. Kedua metode tersebut menunjukkan adanya kesamaan analisis spesies bakteri menggunakan BLAST-n dan MEGA X.



Gambar 4.9 Hasil kontruksi pohon filogenetik isolat bakteri PDB2. Pembuatan pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA X dengan model K2 (Kimura-2- parameter). Berdasarkan gambar terlihat bahwa isolat bakteri PDB2 mempunyai kedekatan genetic dengan *Bacillus subtilis* strain DSM 10 16S ribosomal RNA partial

4.5.3 Keterkaitan Hasil Uji Genotip terhadap Uji Fenotip Isolat PDB2

Proses awal identifikasi sebelum analisa spesies dengan DNA yaitu dengan mencari kekerabatan takson isolat berdasarkan sifat fenotip yang dimiliki. Uji fenotip tersebut meliputi uji karakteristik koloni serta uji morfologi bakteri. Hasil uji tersebut kemudian dibandingkan dengan referensi yang ada di dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* yang tertera pada **Tabel 4.8**

Tabel 4.8 Hasil uji fenotip Bakteri PDB2

| Karakter Bakteri | Isolat PDB2 | <i>Bacillus subtilis a</i> |
|-----------------------------|-----------------|----------------------------|
| Karakteristik Koloni | | |
| Bentuk | Tidak rata | Tidak rata |
| Tepian | Tidak rata | Tidak rata |
| Elevasi | Rata | Rata |
| Ukuran koloni | Sedang | Sedang |
| Warna Koloni | Putih pucat | Putih pucat |
| Konsistensi | Tidak berlendir | Tidak berlendir |
| Uji Morfologi | | |
| Bentuk sel batang | + | + |
| Pewarnaan Gram | + | + |
| Pewarnaan endospore | + | + |

a: Bergeys (1984)

Berdasarkan **Tabel 4.8** bakteri PDB2 mempunyai bentuk basil atau batang, bersifat gram positif, serta menghasilkan endospora. Karakteristik koloni pada PDB2 diantara lain mempunyai bentuk koloni dan elevasi yang tidak rata, elevasi rata dengan media, ukuran koloni sedang, warna koloni putih pucat, serta berlendir. Menurut pedoman *Bergey's Manual Bacteriology* bakteri dari jenis *Bacillus subtilis* mempunyai bentuk basil, gram positif, mampu membentuk endospora, bentuk koloni dan tepian tidak rata, ukuran koloni sedang, berwarna putih hingga putih pucat, dan berlendir. Berdasarkan hasil uji tersebut terdapat kesamaan antara uji fenotip sebagai pendukung hasil dari uji genotip.

4.5 Korelasi Materi Genetik DNA dengan Prespektif Islam

Keberagaman organisme baik tingkat tinggi maupun tingkat rendah seperti bakteri disebabkan oleh adanya DNA dalam sel suatu organisme. DNA atau asam deoksiribonukleotida merupakan salah satu jenis asam nukleat golongan biomolekul yang berperan sebagai sumber informasi genetik semua organisme. DNA tersusun atas tiga komponen utama, diantaranya gula deoksiribosa, basa nitrogen, serta gugus fosfat. Basa nitrogen yang terkandung dalam DNA yaitu Adenin, Guanin, Timin, dan Sitosin.

DNA banyak dikaji untuk menunjukkan adanya hubungan pewarisan sifat organisme yang dinaungi dalam bidang keilmuan Genetika. George Mendel adalah ilmuwan yang awal mula menemukan karakteristik keturunan yang wariskan dari generasi ke generasi yang disebut dengan unit genetik. Sebelum adanya penelitian Mendel, Allah SWT telah berfirman dalam al-Qur'an salah satunya pada Surah

Faatir ayat 28 yang mengisyaratkan tentang adanya hukum pewarisan sifat yang berbunyi:

وَمِنَ النَّاسِ وَالْدَّوَابِّ وَ الْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ كَذَلِكَ ۗ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ الْعُلَمَاءُ ۗ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ
غَفُورٌ ﴿٢٨﴾

Artinya: “ Dan demikian (pula) di antara manusia, binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah SWT di antara hamba-hamba-Nya, hanyalah ulama. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Pengampun”(Q.S al- Faathir 35:28).

Menurut Shihab (2001), lafadz *kadzalika* mempunyai makna keragaman yang dimiliki makhluk hidup. Ulama’ lain memaknai lafadz *kadzalika* yaitu perbedaan yang terlihat dan nyata dalam kehidupan makhluk. Hal tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan makhluk hidup yang beraneka ragam. Fenomena ini terjadi dalam kehidupan setiap makhluk baik makhluk hidup tingkat tinggi seperti manusia, hewan, dan tumbuhan serta makhluk hidup tingkat rendah seperti mikroorganisme. Hal inilah yang menyebabkan tidak adanya organisme yang mempunyai sifat yang sama persis walaupun berasal dari parental (induk) yang sama. Al- Albani (2007) dalam Kitab Shahih Muslim menguatkan ayat diatas dengan hadist Rasulullah SAW yang berbunyi:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ : أَنَّ أَعْرَابِيًّا أَتَى وَلَدَتْ غُلَامًا أَسْوَدَ، وَإِنِّي أَنْكَرْتُهُ، فَقَالَ لَهُ النَّبِيُّ صَلَّى
اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ : هَلْ لَكَ مِنْ إِبِلٍ ؟ قَالَ : نَعَمْ، قَالَ : مَا أَلْوَنُهَا ؟ قَالَ حُمْرٌ ؟ قَالَ : فَهَلْ فِيهَا مِنْ

أَوْرَقَ ؟ قَالَ : نَعَمْ ، قَالَ رَسُولُ اللَّهِ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ : فَأَتَى هُوَ؟ قَالَ : لَعَلَّهُ يَا رَسُولَ اللَّهِ يَكُونُ نَزْعُهُ عِرْقًا ،
فَقَالَ لَهُ النَّبِيُّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ : وَهَذَا لَعَلَّهُ يَكُونُ نَزْعُهُ عِرْقًا لَهُ (رواه مسلم)

Artinya: "Dari Abi Hurairah RA, bahwa seorang Arab pedalaman mendatangi Rasulullah SAW, lalu dia berkata, :Ya Rasulullah SAW, istri saya melahirkan bayi berkulit hitam dan sungguh saya tidak mengakuinya sebagai anak saya". Lalu Rasulullah SAW bertanya: "Apakah kamu mempunyai unta?" Dia menjawab, "Ya". Beliau bertanya lagi, "Apa warnanya?" Dia menjawab "merah". Rasulullah SAW bertanya lagi, "Apakah anaknya ada yang abu-abu?". Orang itu menjawab, " Ya". Beliau bertanya lagi, " Dari mana asalnya anak yang abu-abu itu?" Orang itu menjawab, " Mungkin asal keturunannya ada yang abu-abu.". Kemudian beliau berkata kepada orang itu, " Anakmu pun begitu, mungkin nenek moyangmu ada yang berwarna hitam" [Muslim 4/212]

Menurut An-Najjar (2011), lafadz 'irq berarti gen leluhur menunjukkan keberadaan nasab yang berasal dari leluhur atau nenek moyang. DNA yang tersimpan dalam gen diproduksi oleh tubuh secara alami dengan melakukan replikasi DNA yang bertujuan untuk memperbanyak untaian DNA demi ketersediaan jumlah sikuen DNA yang ada di dalam sel. Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, jumlah DNA yang diperbanyak atau diamplifikasi dapat disintesis diluar tubuh organisme secara *in vitro* menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Produk sikuen DNA yang bersifat spesifik dapat diaplikasikan dalam berbagai macam penelitian ilmiah salah satunya adalah identifikasi makhluk hidup yang dilakukan dengan metode molekular atau genotip.

Adanya analisa spesies dengan metode genotip dapat menambah keberagaman dan pemanfaatan spesies seperti mikroorganisme. Peran mikroorganisme sangat dibutuhkan oleh alam karena dapat menjaga keseimbangan lingkungan salah satunya melalui peristiwa dekomposisi plastik LDPE oleh bakteri.

Bakteri mampu memecah struktur polimer plastik LDPE yang sulit untuk diuraikan menjadi struktur yang lebih sederhana seperti CO₂ dan H₂O. Peristiwa ini akan mengurai dampak polusi tanah akibat cemaran plastik (Gewert dkk., 2015). Keberadaan bakteri ini menunjukkan bahwa tidak ada satupun makhluk yang Allah SWT ciptakan secara sia-sia. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Surah Al-Jāsiyah ayat 13:

﴿۱۳﴾ وَسَخَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُۥ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيٰتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْنَ

Artinya: " Dan Dia menundukkan apa saja yang ada di langit dan apa yang di bumi untukmu semuanya (sebagai rahmat) dari-Nya. Sungguh dalam hal yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir "

Adanya pemikiran pemanfaatan ciptaan Allah SWT sesuai dengan firman-Nya dalam Surah Ibrahim ayat 52 yang berbunyi:

﴿۵۲﴾ هٰذَا بَلٰغٌ لِّلنَّاسِ وَلِيُنذَرُوْا بِهٖۚ وَلِيَعْلَمُوْا اَنَّهٗ هُوَ الْاِلٰهُ وَاحِدٌ وَّ لِيَذْكُرُوْا الْاَلْبَابِ

Artinya: " Dan (al- Quran) ini adalah penjelasan (yang sempurna) bagi manusia, agar mereka diberi peringatan dengannya, agar mereka mengetahui bahwa Dia adalah Tuhan Yang Maha Esa dan agar orang yang berakal mengambil pelajaran " (Q.S. Ibrahim : 52)

Penggunaan *أولوا الأبواب* secara bahasa tersusun atas dua kata yaitu *أولوا* dan *الأبواب*.

Kata *أولوا* menurut Manzhur (1990) mempunyai arti memiliki, mempunyai.

Sedangkan menurut Shihab (2000), kata *al- albāb* yang merupakan bentuk jama' dari *lūbb* yang bermakna sari pati sesuatu. Makna lain dari *al- albāb* adalah bagian terpenting, terbaik, dan termurni dari segala sesuatu yang ada. Al-Maraghi (1987) menyatakan bahwa makna *Ulul Albab* dari ayat ini adalah suatu kepribadian yang

akalnya tidak diperbudak oleh kerancuan dalam mengambil suatu pelajaran salah satunya pembelajaran dari alam semesta.

Pelajaran ini dapat diambil dengan adanya *balagh* atau penjelasan lalu muncul suatu peringatan. Penjelasan serta peringatan inilah yang nantinya akan mendorong seorang manusia untuk berfikir, merenung, dan mencerna ilmu-ilmu Allah SWT baik yang bersifat qauliyah (wahyu) maupun kauliyah (alam semesta) sehingga memunculkan korelasi antar keduanya. Salah satu contoh pembelajaran inilah yang menjadi faktor lahirnya jiwa *ulul albab* dari ilmu pengetahuan dan mengakui kekuasaan serta keagungan Allah SWT.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diketahui berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diantara lain:

1. Isolat bakteri PDB1 menghasilkan persentase biodegradasi plastik LDPE sebesar $0,75 \pm 0,0078\%$ dan isolat PDB2 mampu mendegradasi plastik LDPE $1,63 \pm 0,0080\%$.
2. Identifikasi bakteri berdasarkan uji fenotip dan genotip menggunakan daerah gen 16S rRNA menunjukkan adanya korelasi kedekatan materi genetik serta bentuk fisik bakteri PDB2 dengan bakteri jenis *Bacillus subtilis* dengan nilai kedekatan berdasarkan uji genotip sebesar 99%.

5.2 Saran

Saran yang ditunjukkan untuk penelitian selanjutnya diantaranya:

1. Degradasi plastik LDPE dapat dioptimasi dengan memadukan kemampuan kedua bakteri serta jamur dalam bentuk konsorsium sehingga meningkatkan aktivitas degradasi plastik LDPE.
2. Adanya uji velositas (waktu apung) untuk mengetahui perubahan hidrofobitas plastik LDPE serta perhitungan koloni bakteri yang mampu menempel di permukaan plastik menggunakan metilen biru.
3. Adanya penanganan hasil samping dari proses degradasi plastik LDPE oleh bakteri untuk meminimalisir timbulnya polutan baru yang berdampak langsung pada organisme di lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, A. N., Ria, P. S., & Aminin, A. L. N. (2011). Pemurnian DNA Plasmid Puc19 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea. *Jurnal Sains dan Matematika*.19(2):47-53
- Ainiyah, D. N. (2014). Bakteri Sampah Pendegradasi Plastik dalam Kolom Winogradsky.
- Al- Maraghi, A. H. (1989). *Tafsir al- Maraghi Juz 8*. Semarang: Penerbit CV. Toha Putra
- Al- Maraghi, A. M. (1989). *Tafsir al- Maraghi Juz 1*. Semarang: Penerbit CV. Toha Putra.
- Al-Albani, M. N.(2007). *Shahih Sunan Abu Daud Buku 2*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorgansm. *Journal of Applied & Environmetal Microbiology*. 5(1): 8-19. <http://pubs.scipub.com/jaem/5/1/2>
- An-Najjar, Z. (2011). *Sains dan Hadist: Mengungkap Fakta Ilmiah dari Kemukzizatan Hadist Nabi*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., & Uppara, P.V. (2008). Biodegradation of Polyethylene and Polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*. 7: 9-22
- Ash-Shiddiqiey, M. T. H. (2000). *Tafsir al- Qur'anul Majdi AN-Nuur*. Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra.
- Aslinda, W & Ahyar A. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Agarosa dari Makroalga Merah *Euchema Cottoni* untuk Pemisahan Fragmen DNA. *Online Journal of Natural Science*. Vol 5 No 3.
- Asmawati, A.(2016). Identifikasi Genotip *Bacillus* sp Hasil Isolasi dari Bekatul Berdasarkan Sikuen Gen 16S rRNA. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Asy- Syaukani, Al Imam Muhammad bin Ali bin Muhammad. (2008). *Fathul Qadir (Al- Jami' baina Ar- Riwayah wa Ad- Dirayah min Ilm Al- Tafsir)*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Ayu, B.P., Ria, P.S., Agustina, L.N.,& Aminin.(2011). Purifikasi DNA Kromosom *Geobacillus* sp. Dy-Tae-14 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea. *Jurnal Sains dan Matematika*. 19(4): 101-106

- Azizah, A. (2009). Perbandingan Pola Pita Amplifikasi DNA Daun, Bunga Kelapa Sawit Normal dan Abnormal. *Skripsi*. Progam Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pernegetahuan Alam Institut Teknologi Pertanian Bogor.
- Bathia, M., Girdhar, A.M., Tiwari, A., & Nayarisseri. (2014). Implications of A Novel *Pseudomonas* Species On Low Density Polyethylene Biodegradation: An In Vitro to In Silico Approach. *Springer Plus*. 3:497. <http://www.springerplus.com/content/3/1/497>
- Begum, M. A., Varalakshimi, B., dan Umamageswari, K. (2015). Biodegradation Of Polythene Bag Using Bacteria Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 4(11): 674-680
- Bergeys, D.H & Boone, D.R. (1984). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. New York: Springer Science Business Media.
- Binsen, P.S. (2015). *Laboratory Protocols in Applied Life Sciences*. Francis: CRC Press
- Das, M.P & Kumar, S. (2015). An Approach to Low Density Polyethylene Biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. 5(1):81-86. doi: 10.1007/s13205-014-0205-1
- Dey, S., Singh, A. K., & Sigh, G. (2016). Biodegradation Ability of Bacteria and Thermocol Cups. *Europian Journal of Biomediacal and Pharmaceutical Science*. 3(10): 272-277. ISSN: 2349-8870.
- Ernawati, R.(2011). Konversi Limbah Plastik Sebagai sumber energi alternatif. *Jurnal Riset Industri*. 5(3), 257-263.
- Esmaeili, A., Ali, A.P., Ali, A.A., Shabani, F., Esmaeili, E.(2013). Biodegradation of Low Density Polythylene (LDPE) By Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *Plos One*. 8(9).
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas, S., Widyarti., & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekular*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Firdausi, N., Muslihatin, W., & Nurhidayati, T. (2016). Pengaruh Kombinasi Media Pembawa Pupuk Bakteri Pelarut Fosfat Terhadap pH dan Unsur Hara Fosfor dalam Tanah. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 5(2): 2337-3520
- Florez, J. M. R., Bassi, A., & Thopson, M. R. (2014). Microbial Degredation and Deterioration of Polyethilene- A Review. *Intenational Biodeteration and Biodegradation*. 88: 83-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Gabriyan, L & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal Invest Dermatol*. 133(3). doi: 10.1038/jid.2013.1

- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, Sharmilla., & Abraham, J. (2016). Microbial Degradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* Strain JASKI Isolated from Landfill Soil. *Biotech.* 6:52. <http://10.1007/s13205-016-0394-x>
- Gewert, B., Plassmann, M. M. & Macleod, Matthew. (2015). Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in The Marine Environment. *Environmetal Science Process & Impact.* <https://10.1039/c5em0027a>
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J.J., & Hur, H.G.(2020). Biodegradation of Polyethylene: A Brief Review. *Application Biological Chemistry.* 63(27). <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- Hadad, D & Sivan, A. (2005). Biodegradation of Polyethylene By The Thermophillic Bacterium *Brevebacillus borstelensis*. *Journal Of Applied Microbiology.* (94): 1093-1100
- Handono, K., Benita, K. N., Habibah, F. U., & Dewi, E. S. (2018). Progress Report on The Rapid Test Kit Development Detection of Sytematic Lopus Erythematosus in Indonesia. *Journal of Physics.* <http://10.1088/174-6596/1146/012019>
- Handoyo, D., Rudiretna, A., n.d. PRINSIP UMUM DAN PELAKSANAAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. 2000 9.
- Hebert, P. D. N & Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology.* 5(54):852-859. ISSN: 1063.5157
- Hersztek, M. M., Gondek, K., & Kopec, M. (2019). Degradation of Polyethylene and Biocomponent Derived Polymer Materials: An- Overview. *Journal od Polymers and The Environtment.* <http://doi.org/10.1007/s.10924-019-01368-4>
- Hoffman, L. S. D., Lant, P. A., Laycock, B., & Pratt, S. (2019). The Rate of Biodegradation of PHA Bioplastics in The Marine Environment: A- Meta Study. *Marine Pollution Bulletin.* 142:15-24. <http://doi.org/10.1016/j.marpobul.2019.03.020>
- Isworo, S., Purwanto., & Sabdono, A. (2016). Identification of Bacteria Indigenous Selected Rawa Pening Lake Owns Best Degradation Capability Of The Organophospate Pesticides (Malathion and Profenofos). *Asian Journal Of Applied Science.* 9 (2): 41-52. <http://10.3923/ajaps.2016.41.52>
- Jamuar, S.S., D’Gama, A.M., & Walsh, C.A. (2016). Somatic Mosaicism and Neurological Diseases. *Genomic, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry.* Elsevier Inc.

- Jordan, J. L., Casem, D. T., Bradley, J. M., Dwivedi, A. K., Brown, E. N., & Jordan, C. W. (2016). Mechanical Properties of Low Density Polyethylene. *Journal Dynamic Behavior Mater.* 2: 411-420. <https://19.1007/s40870-016-0076-0>
- Jyoti Singh, D. K. (2015). Isolation and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) Defrading Bacterial Strains from Polyethylene Polluted Sited Around Gwalior City. *Journal of Global Biosciences*, 3220-3228.
- Kanaly, S. R. A & Haryama. (2000). Biodegradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon by Bacteria . *Journal od Bacterial*, 2059-2067
- Kartini, A.R. (2012). Karakterisasi Molekular Padi Transgenik dengan Beberapa Metode Isolasi DNA. *Skripsi*. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Katsir, I.(2002) *Tafsir Ibnu Katsir*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Kementrian Agama Republik Indonesia. 2016. *Tafsir Ringkas Jilid 1*. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf al- Qur'an.
- Khopkar, S.M.(1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Koorem, K., Gazol, A., Opik, Maarja., Moora, M., Saks, U., Sober, V., & Zobel, Martin. (2014). Soil Nutrient Content Influences The Abundance Of Soil Mircoebes But Not Plant Biomass at The Small- Scale. *Plos One*. 9(3)
- Kormin, S., Kormin, F., Beg, M. D. H., & Piah, M. B. M. (2017). Physical and Mechanical Properties of LDPE Incoporated With Different Starch Sources. *International Research and Innovation Summit*. 226. <http://10.1088/1757-889x/226/1/012157>.
- Kumar, S.D & Raut, S.(2015). Microbial Degradation of Low Density Polyethylene (LDPE): A Review. *Journal of Environmetal Chemical Engineering*. 1(13). <http://dx.doi.org/10.1016/j-jece-2015.01.003>
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H., (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lee, S.T & Shewale, J.G. (2018). DNA Extraction Method in Forensic Analysis. *Encyclopedia od Analiytica Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Lee, S dan Kim, M .(2010). Isolation of Bacteria Degradng Poly (Butylenesuccinate-co Butylene Adipate) and Their Lip a Gen. *International Biodeterior Biodegrad.* (64)

- Li, D., Leahy, S., Henderson, G., Kelly, W., Cookson, A., Attewood, G., & Moon, C. (2014). Atypical Bacterial rRNA Operon Structure is Prevalent Within The Lachnospiraceae, and Use of The 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region for The Rapid Identification of Ruminal *Butyrivibrio* and *Pseudobutyrvibrio* Strain. *Animal Nutrition and Health*. 64:1623-1632. doi: 10.1007/s13213-014-0806-2
- Liu, Y., Qin, R., Zat, A.A.J., Breukink, E., & Heger, M. (2015). Antibacterial Photodynamic Therapy: Overview Of a Promising Approach to Flight Antibiotic- Resistant Bacterial Infections. *Journal of Clinical Translational Research*. 1(3):140-167
- Mahmudah. (2013). Pengaruh Jumlah Inokulum dan Lama Fermentasi Oleh *Bacillus mycoides* Terhadap Kadar Serat Kasar dan Protein Kasar Onggok. Malang. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Manzhur, I. (1990). *Lisanul Arab*. Beirut: Dar al-Shadir.
- Matjasic, T., Simcic, T., Medvescek, N, Bajt, O., Dreo, T., & Mori, N. (2020). Critical Evaluation of Biodegradation Studies On Synthetic Plastic Through a Systematic Literature Review. *Science of The Total Environment*. 752. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141959>
- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magome, G., & Imuga, M. (2018). Biodegradability of Polyethylene By Bacteria and Fungi fro Dandora Dumpsite Nairobi-Kenya. *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Mukred, A. M., Hamid, A. A., Hamzah, A., & Yusoff, W. M. W. (2008) Enhancement of Effective Microorganism for Bioremediation Of Crude Oil Contaminated Waters. *Pakistan Journal of Biological Science*. 11 (13). ISSN: 1028-8880
- Nasution, S., Kusumaningtyas, E., Faridah, D.N., & Kusumaningrum H.D. (2018). Lisozim dari Putih Telur Ayam Sebagai Agen Antibakterial. *Wartazoa*. 28(4):175-188. doi: <http://dx.doi.org/10.14334/wartazoa.v28i4.1882>
- Nur, M.F.(2020). Biodegradasi LDPE (*Low Density Polyethylene*) Oleh Isolat Fungi Indigenus Asal Tempat Pemrosesan Akhir Talangagung, Kepanjen, Kabupaten Malang. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Numata, M., Sugiyasu, K., Hasegawa, T., & Shinkai, S. (2004). Sol-Gel Reaction Using DNA as a Template: An Attempt Toward Transcription of DNA into Inorganic Materials. *Angewandte Chemie*. 43: 3275-3283. doi: 10.1002/anie.200454009

- Nurhidayati, S., Faturrahman., & Ghazalim, G. (2015). Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice- Ice. *Jurnal Sains Teknologi dan Lingkungan*. 1(2).
- Nurkanto, A & Agusta, A. (2015). Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Mofofisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba. *Jurnal Biologi Indonesia*. 11 (2): 195-203.
- Octavianda, F. T., Asri, M. T., & Lisdania, L. (2016). Potensi Isolat Bakteri Pnedegradasi Plastik Jenis Polietilen Oxo- Degradable dari Tanah TPA Benowo Surabaya. 5(1): 32-35. ISSN: 2253-3979.
- Oktari, A., Supriatin, Y., Kamal, M., & Syafrullah, h.(2017). The Bacterial Endospore Stain on Schaeffer Fulton Using Variation of Methylene Blue Solution. *Journal of Physics*.812. doi:10.1088/1742-6596/812/1/012066
- Pambudi, A., Fari, M., & Nurdiansah, H. (2017). Analisis Mrfologi dan Spektroskopi Inframerah Serat Bambu Betung (*Dendrocalmus asper*) Hasil Produksi Alkalisasi Sebagai Penguat Komposit Absorbsi Suara. *Jurnal Teknik ITS*. 6 (2). ISSN: 2337-3539
- Pananjung, A. M. S., Ulfa, E. U., Senjarini, K., & Arimurti, S. (2015). Karakterisasi Isolat Bakteri Fibrinolitik WU 021055 Asal Perairan Pantai Papuma, Jember. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 2(1). ISSN: 2442-2602
- Pangastuti, A. (2006). Definisi Spesies Prokariota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. ISSN: 1412-033X. <http://10.13057/biodiv/d070119>
- Pangestu, N. S., Budiraharjo, A., & Rukmi, M. G. (2016). Isolasi, Identifikasi 16S rRNA dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Pendegradasi Plastik Polietilen (PE). *Jurnal Biologi*. 5(1):24-29.
- Pathak, V.M & Navneet. (2017). Review on The Current Status Of Polymer Degradation: A Microbial Approach. *Bioresource and Bioprocessing*. 4:15. doi: 10.1186/s40643-017-0145-9
- Passarge, E.(2007). *Color Atlas of Genetics*. Thime: New York.
- Patil, R.C.(2018). Screening and Characterization of Plastic Degrading Bacteria from Garbage Soil. *British Journal of Environmetal Science*. 6(4). ISSN: 2054-6351
- Pratita,M. Y. E & Putra, S. R.(2012).Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas Songgoriti Setelah Dua Hari Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1):1-5

- Pratiwi, E & Widodo, L. I. (2020). Kuantifikasi Hasil Ekstraksi Gen Sebagai Faktor Kritis untuk Keberhasilan Pemeriksaan RT-PCR. *Indonesian Journal for Health Science*. 4(1): 1-9. ISSN:2549-2748
- Quthb, S. 1992. *Fi Zhilalil- Qur'an di Bawah Naungan al- Qur'an (Surah al-An'aam- Surah al- A'raaf 137)*. Jakarta: Gema Insani.
- Radji, M.(2009). *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V.,& Yuliana, A.V.(2018). Eksplorasi Jenis dan Potensi DNA Barkode Anggrek *Thrixspernum* Secara *In Silico*. *Jurnal Biodjati*. 3(2):50-58
- Rosairo, L. L. D Baburaj, S. (2017). Isolation and Screening of Plastic Degradng Bacteria from Polyhene Dumped Garbage Soil. *Internation Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 5(12). ISSN:2321-9653
- Sabbathini, G. C., Pujiyanto, S., Wajarnaka., & Lisdiyanti, O. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus *Sphingomonas* dari Daun Padi (*Oryza sativa*) di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi*. 6(1): 59-64
- Saeidnia, S dan Abdollahi, M. (2016). Are Other Flourescent Tags Used Instead Of Ethidium Bromide Safer?. *DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 21(1): 71. <http://10.1186/2008-2231-21-71>
- Safrida, Y.D., Yulvizar, C., & Devira, C.N.(2012). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Berpotensi Probiotik pada Ikan Kembung (*Rastrelliger* sp). *Depik*.1(3):200-203. ISSN: 2089-7790
- Sanderson, B.A., Araki, N., Lilley, J.L., Guerroto, G.,& Lewis, L.K.(2014). Modification Of Gel Architecture and TBE/TAE Buffer Composition to Minimize Heating During Agarose Gel Electrophoresis. *Anal Biochem*. 1:44-52. DOI:10.1016/j.ab.2014.03.003
- Sari, S.K., Naila, N.M., Listyowati, D.,& Sri, E.S.(2009). Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Daun Cabai Rawit (*Capsium frutescens* cv. Cakra Hijau) Menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) Genaid. *Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi Fakultas Ilmu Pengetahuan Universitas Negeri Semarang*.
- Sarengat, N.(2011). Plastik Ramah Lingkungan (Fotodegradasi) dari Kopolimerisasi Tempel LDPE/Tapioka dengan Maleat Anhidrat. *Majalah Kulit, Karet, dan Plastik*. 27(1): 31-37

- Sarker, S. D & Nahar, L. (2012). Hyphenated Techniques and Their Applications In Natural Product Analysis. *Mrthod Mol Biology*. http://10.1007/978-1-61779-624-1_12
- Sastri. (2014). Commodity Thermoplastics: Polyvinyl Chloride, Polyofins, and Polystyrene. *Plastics in Medical Devices*. <https://dx.doi.org.10.1016/B978-1-4557-3201-2.00006-9>
- Sekeguchi, T, Sato T, dkk., (2010). Isoation and Characterization of Biodegradable Plastic Degrading Bacteria from Deep- Sea Environmrnts. *Rep Res Dev* (11)
- Senthilkumar, P., Jayapriya, D., Indumathi, A., Kavitha K., & Ganapathy, G. (2015). Biodegradation of Polyethylene Waste through soil bacteria: a Review. *International Journal of Scientific Engineering and Research (IJSER)*. 8(10). ISSN: 2347-3878
- Sharma, J., Gurung. T., Upadhyay, A., Nandy, K., Agnihotri., & Mitra A. K. (2014). Isolation and Characterization pf Plastic Degrading Bacteria from Soil Collected The Dumping Grounds Od an Industrial Area. *International Journal of Advanced and Innovetive Reseach*. 3(3).
- Sharuddin, Shafferina D.A., Faisal, A., & Wan M.A.W Daud.(2016). A Review on Pyrolysis Od Plastic Wastes. *Energy Coversatin and Manangement*.
- Shebani, A., Klash, A., Elhabishi, S., Elbreki, H., & Elharari, W. (2018). The Influence of LDPE Content On The Mechanical Properties of HDPE/LDPE Blends. *Research and Development in Material Science*. 7(5). <https://10.31031/RDMS.2018.07.000672>
- Shi, R., Lewi, R.S., & Panthese, D.R. (2018). Filter Paper-Based Spin Column Method For Cost-Efficient DNA or RNA Purification. *Plos One*. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.02030111>
- Shihab, M.Q.(2001). *Tafsir al- Mishbâh :Pesan, Kesan, dan Keselarasian al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sihaloho, E.B. (2011). Evaluasi Biodegradabilitas Plastik Berbahan Dasar Campuran Pati dan Polietilen Menggunakan Metode Enzimatik, Konsorsia Mikroba, dan Pengomposan. *Skripsi*. Progam Studi Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Singh, J., Gupta, K. C., & Shrivastava, A. (2015). Isolation and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) Degrading Bacterial Strains from Polythene Poluted Sites Around Gwalior City (M.P.). *Journal o Global Biosciences*. 4(8): 3220-3228. ISSN: 2320-1355.
- Skariyachan, S., Manjunath, M., Shankar, A., Bachappanavar, N., & Patil, A.A. (2019). *Aplication Of Novel Microbial Consortia for Environmental Site*

Remediation and Harzardous Waste Management Toward Low- and High Density Polyethylene and Prioritizing the Cost Effective, Eco Friendly, and Sustainable Biotechnological Intervention. Switzerland: Spinger Nature.

- Socrates,G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tabel and Charts.* New York: John Wiley & Sons, LTD.
- Suardana, I. W. (2014). Analysis Of Nucleotide Sequence Of The 16S rRNA Gene Of Novel *Escherichia coli* Strains Isolated from Feces Of Human and Bali Cattle. *Journal Of Nucleic Acid.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/475754>
- Sulistyarini, E. G., Nasution, M. Y., & Ayu, A. (2017). Seleksi Bakteri Pendegradasi Plastik dari Tanah. *Jurnal Generasi Kampus.* 10(2).
- Syafaruddin & Santoso, T.K.(2011). Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littiri.*17(1):11-17.
- Tadimedi, A & Sutton, J. (2020). The Effects of Different Aquatic Environment on The Rate of Polyehilene Biodegradation by *Bacillus subtilis*. *Journal of Emerging Investigators.* 2(2)
- Tasma, I. M. (2015). Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom untuk Mempercepat Progam Pemulian Tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian.* 34(4): 159-168
- Tenney, A. E., Wu, J. Q., Langton, L., Khuel, P., Quatrano, R., & Brent, M. R. (2007). *Genome Research.* ISSN: 1088-9051/07
- Triasita, A.R & Shovitri.M.(2017). Degradasi Plastik Oleh *Bacillus* sp PL01 pada Medium Air Kolam dengan Penambahan Monosodium Glutamat. *Jurnal Sains dan Seni ITS.* 6(2):2337-3520.
- Trisunaryanti, W. (2018). *Dari Sampah Plastik Menjadi Bensin Solar.* Yogyakarta: UGM Press.
- Vadiska,R.T., Wisana, I.D.G.H.,& Mak'ruf, M.R.(2015). Orbital Shaking Incubator Berbasis Mikrokontroller Atmega 8535. *Seminar Tugas Akhir.*
- Vignes, R., Deepika, R.C., Manigandan, P., & Janani, R. (2016). Screening of Plastic Degrading Microbes from Various Dumped Soil Samples. *International Research Journal of Engineering and Techlogy (IRJET).* 3(4):2493-2498. ISSN: 2395-0056
- Vijaya, C. & Reddy, R. M. (2008). Impact of Soil Composting Using Municipal Solid Waste On Biodegradable Of Plastics. *Indian Journal Biotechnol.* 7: 234-239

Vimala, P.P & Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus subtilis*. *International Conference on Emerging Trends in Engineering Science and Technology*. 24: 232-239

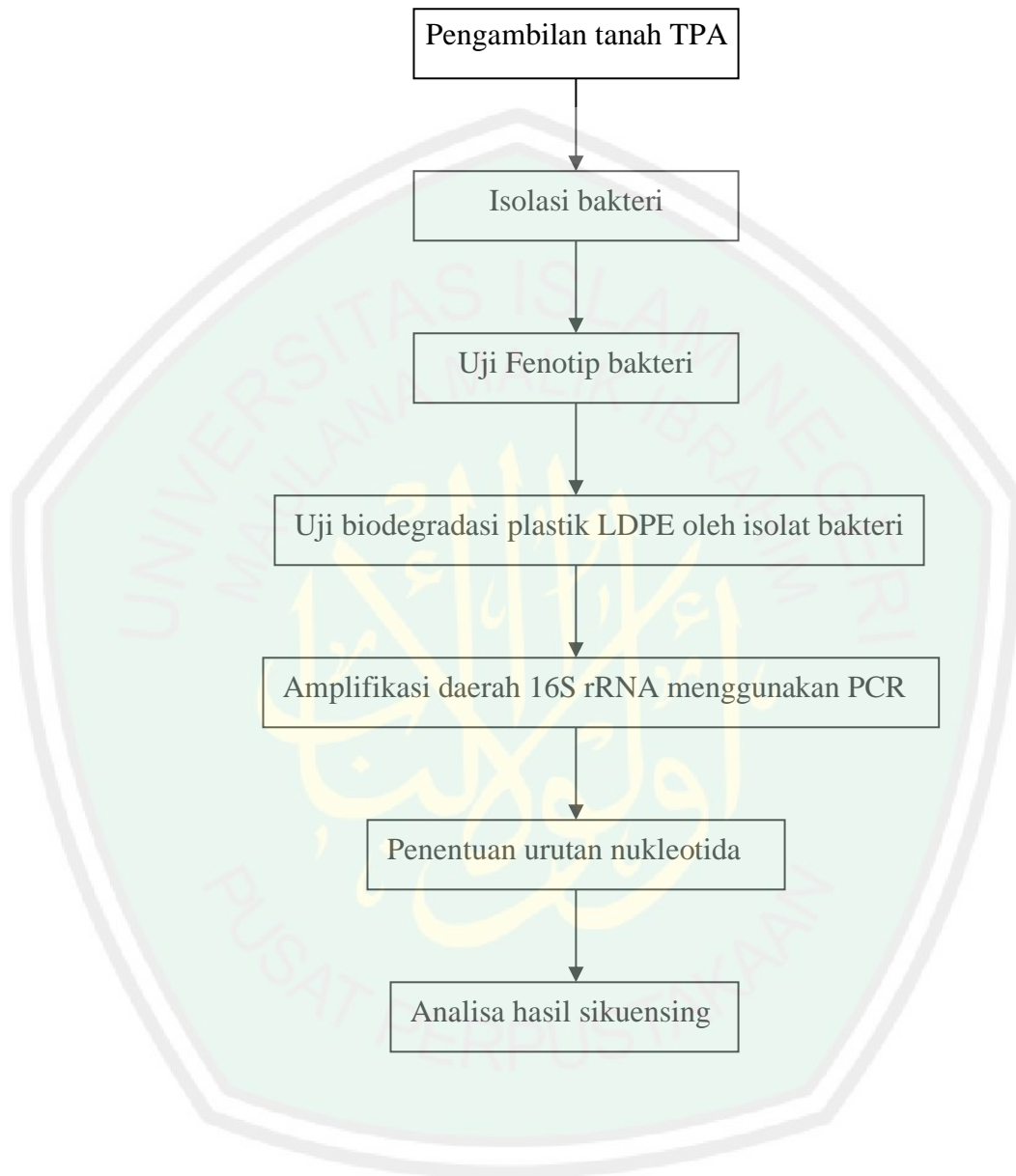
Wantania, L. L., Ginting, E. L., & Wullur, S. (2016). *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. 3 (1)

Wilkes, R.A & Aristilde, L.(2017). Degradation and Metabolism Of Synthetic Plastic and Associated Products By *Pseudomonas* sp.: Capabilities and Challenges. *Journal Of Applied Microbiology*. 123(582-593). ISSN:1364-5072



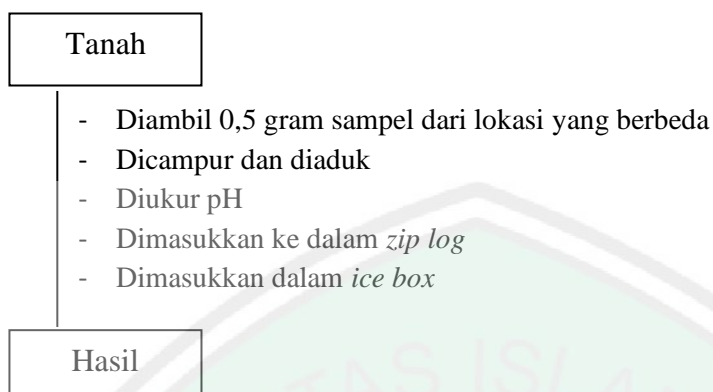
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

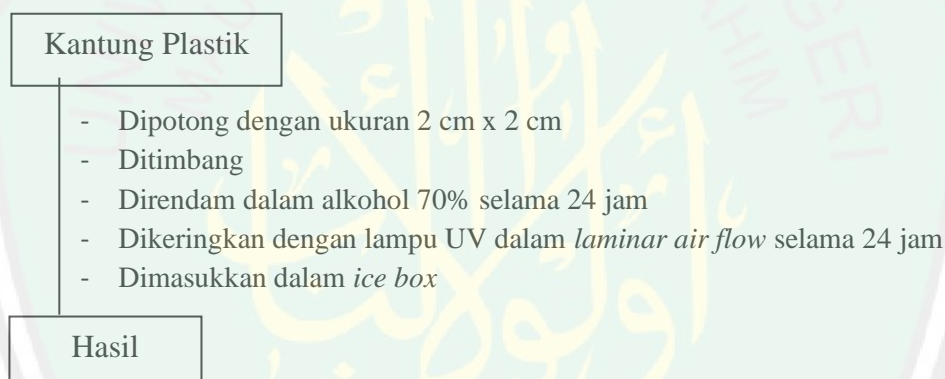


Lampiran 2. Diagram Alir

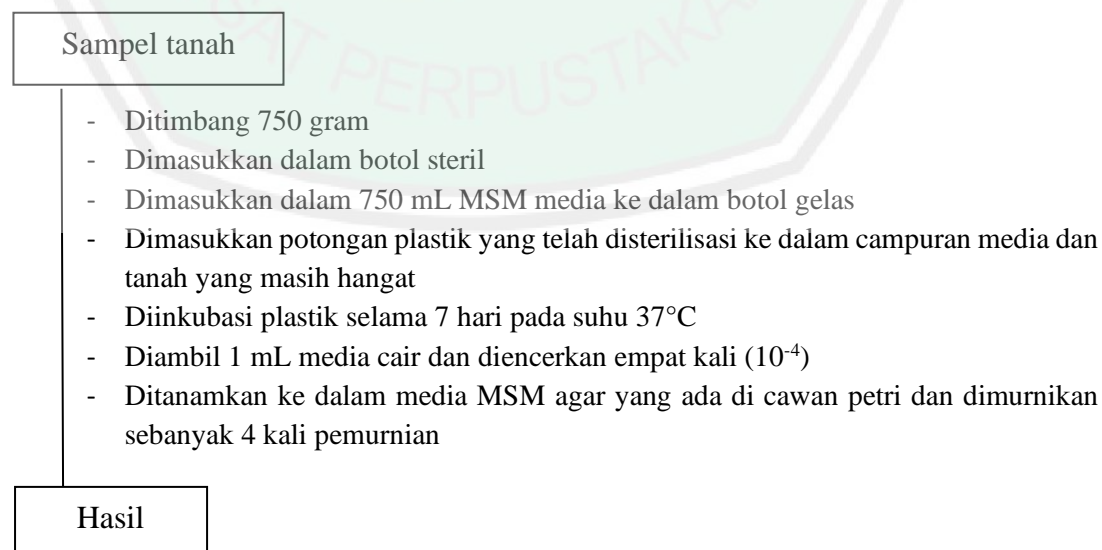
a. Sampling



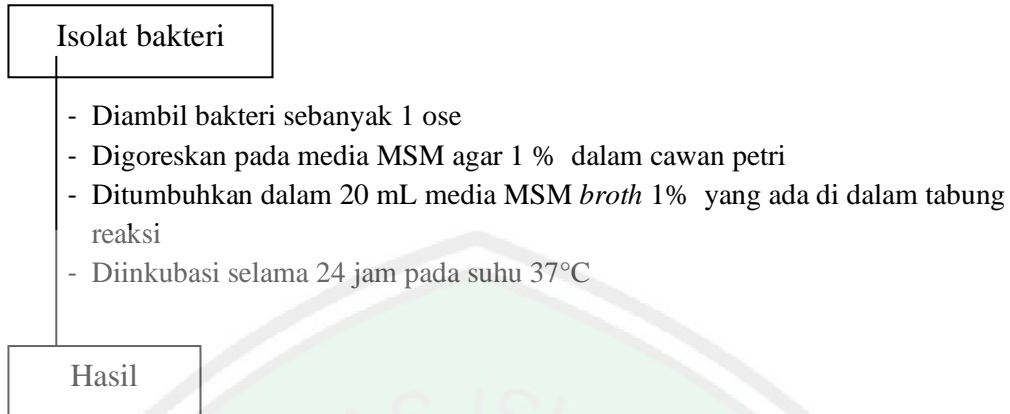
b. Preparasi Plastik LDPE



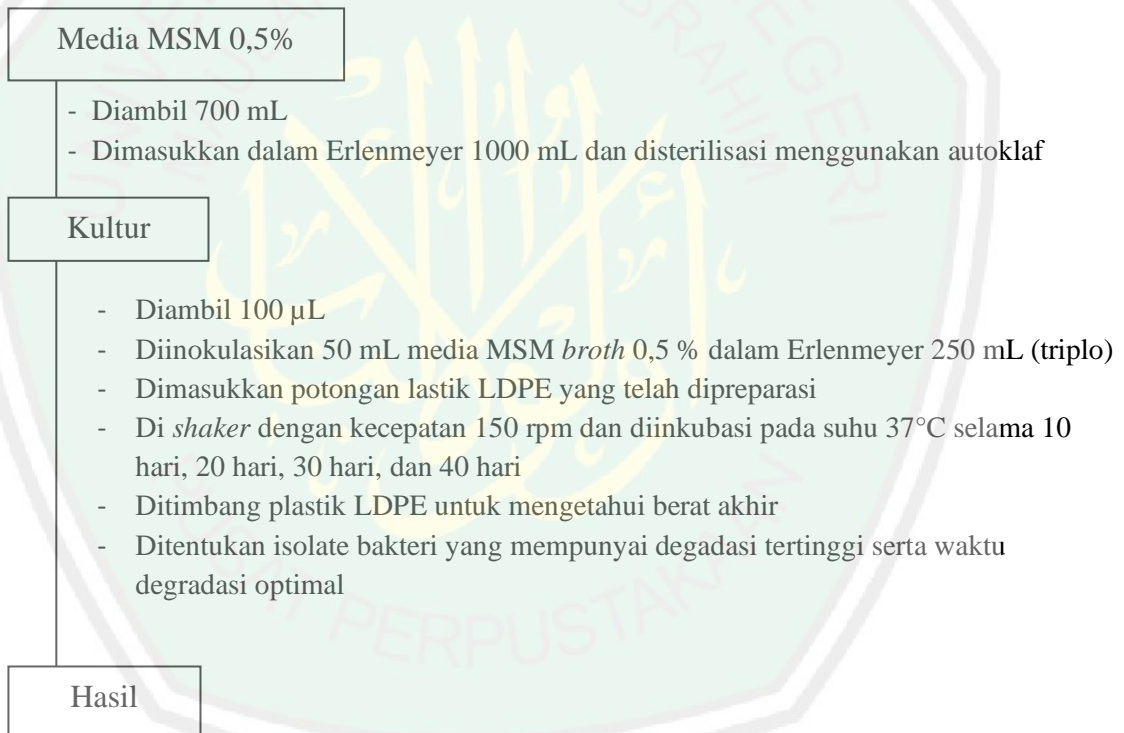
c. Isolasi Bakteri Pendegradasi Plastik



d. Produksi Inokulum Isolat Hasil Isolasi



e. Uji Biodegradasi LDPE Oleh Bakteri



f. Identifikasi Fenotip Gram Bakteri Hasil Isolasi

Sampel Bakteri

- Diambil dua tetes dan diletakkan dalam kaca obyektif
- Diambil satu ose bakteri dan disebarakan secara merata diatas kaca obyektif
- Dibiarkan kering udara
- Dilewatkan kaca obyektif diatas api bunsen sebanyak tiga kali atau hingga kaca obyektif terasa hangat
- Satu tetes kristal violet diletakkan di atas kaca obyektif dan diinkubasi selama satu menit
- Dicuci kaca obyektif dengan menggunakan akuades steril dan dikeringkan
- Ditambahkan dua tetes larutan iodin dan didiamkan selama 2 menit
- Ditetesi alkohol 95%
- Didiamkan satu menit dan dicuci dengan akuades steril
- Ditambahkan safranin dua tetes
- Didiamkan satu menit kemudian dicuci dengan akuades
- Diamati dengan menggunakan mikroskop

Hasil

g. Uji Endospora

Sampel Bakteri

- Diambil satu ose bakteri dan disebarakan secara merata diatas kaca obyektif
- Dibiarkan kering udara
- Dilewatkan kaca obyektif diatas api bunsen sebanyak tiga kali atau hingga kaca obyektif terasa hangat
- Dibungkus kaca preparat dengan kertas saring
- Satu tetes malasit hijau diletakkan di atas kaca obyektif dan didiamkan selama empat menit
- Dilepaskan kertas saring dan dibilas kaca preparat dengan akuades
- Dikeringkan kaca preparat diatas api bunsen
- Ditetesi safranin 1 tetes
- Didiamkan lima menit
- Diamati dengan menggunakan mikroskop

Hasil

h. Identifikasi Gugus Fungsi LDPE yang Telah Didegradasi Menggunakan FTIR

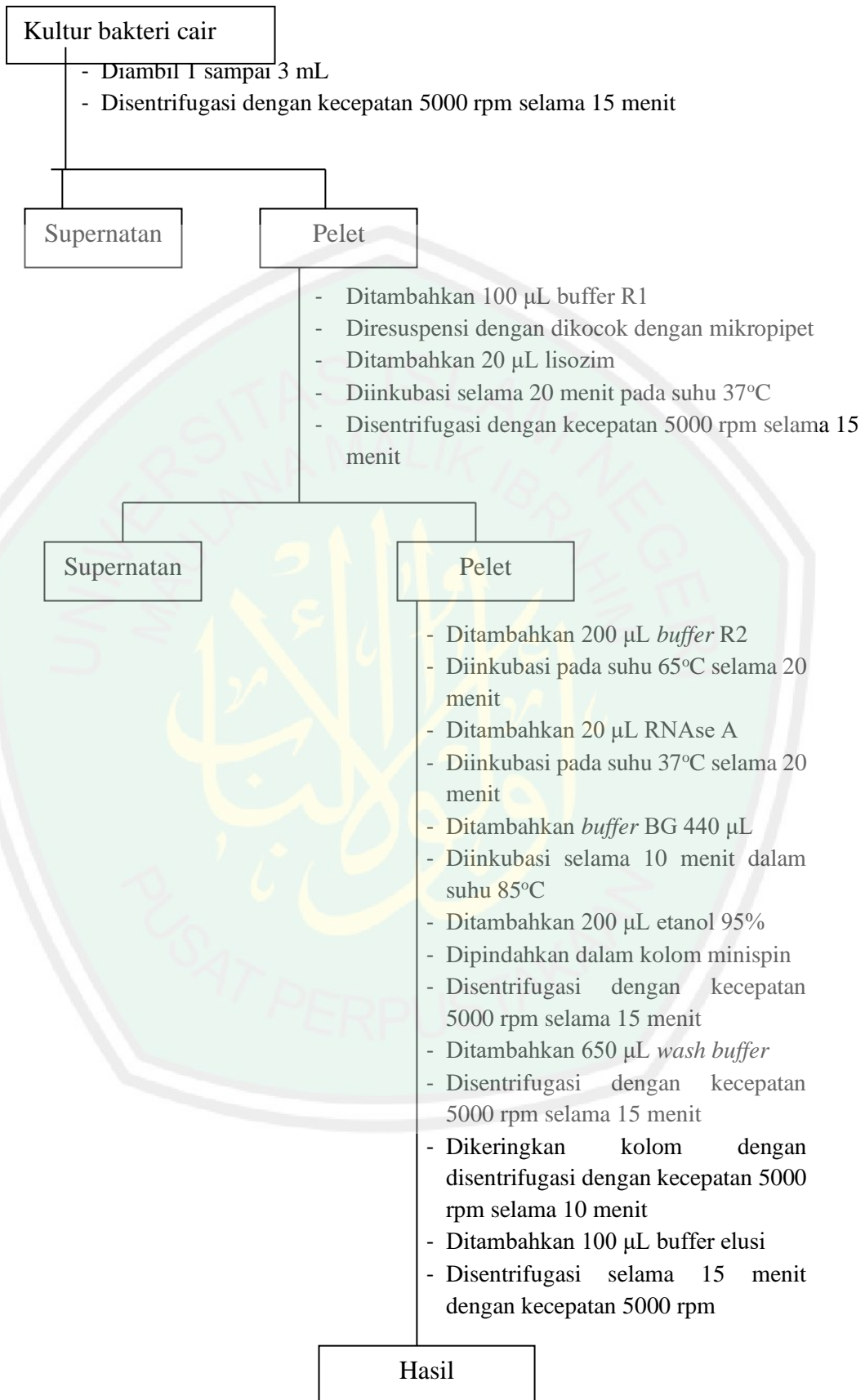
Plastik LDPE

- Dimasukkan dalam wadah sampel instrument
- Diamati gugus fungsi masing- masing plastik

Hasil



i. **Isolasi DNA Bakteri dengan Metode Mini Kit**



j. Elektroforesis Gel Agarosa

1) Pembuatan Gel Agarosa 1%

Agarosa

- Ditimbang sebanyak 0,3 gram
- Dilarutkan dalam 30 mL buffer TAE 1X
- Dipanaskan dalam *microwave* hingga agarosa larut sempurna
- Larutan agarosa dicetak dalam dalam landasan gel yang telah diberi sisir
- Didiamkan selama 1 jam atau hingga memadat
- Dilepaskan sisir

Gel agarosa 1%

2) Elektroforesis Gel Agarosa

Sampel

- Dimasukkan dalam wadah elektroforesis
- Dituangkan buffer TAE 1X sampai gel terendam
- Dipipet sampel sebanyak 10 μL
- Dirunning selama 1 jam dengan tegangan 60 volt
- Direndam gel dalam EtBr dan akuades selama 30 menit
- Diamati dibawah sinar UV

Hasil

k. Amplifikasi dengan PCR

Master Mix

- Diambil master mix PCR sebanyak 25 μL
- Ditambahkan primer *forward* dan *reverse* masing- masing 1,25 μL , ekstrak DNA 2 μL , dan akuabides 15 μL
- Diatur alat PCR dengan denaturasi (98°C, 35 detik), aneling (55°C, 35 detik), dan elongasi (72°C, 90 detik)
- Dimasukkan dalam alat PCR
- Diatur suhu pada setiap tahapan
- *Running*

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

1. Pembuatan Media MSM Agar

MSM agar 200 mL dibuat dengan mencampurkan 0,5 gram K_2HPO_4 , 0,04 gram KH_2PO_4 , 0,1 gram NaCl, 0,002 gram $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 gram $(NH_4)SO_4$, 0,02 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 gram $FeSO_4$, 2 gram glukosa, dan 4 gram agar sebagai pematat. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam akuades steril dan dipanaskan agar larut sempurna. Setelah itu, media disterilkan dan dituang ke cawan petri dalam keadaan hangat kuku. Media ditunggu hingga memadat dan siap digunakan.

2. Pembuatan Media MSM Broth

Komposisi pembuatan MSM *broth* sama dengan media MSM seperti sebelumnya yang membedakan hanya penambahan agar. Media ini tidak memerlukan penambahan agar. Semua bahan dilarutkan dalam 200 mL akuades dan dipanaskan. Selanjutnya media disterilkan dan siap diaplikasikan untuk inokulasi bakteri.

3. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar dibuat dengan ditimbang media sebanyak 2,8 gram. Selanjutnya ditambahkan akuades steril sebanyak 100 mL, dipanaskan diatas *hot plate*, dan diaduk dengan *stirer*. Media kemudian di *autoclave* dengan suhu $121^\circ C$ selama 2 jam.

4. Pembuatan Media Nutrient Broth

Nutrient broth dibuat dengan ditimbang media sebanyak 8 gram kemudian dilarutkan dalam 1 L akuades stereril. Media selanjutnya dipanaskan dan diaduk

dengan *stirrer*. Selanjutnya media di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 2 jam.

5. Pembuatan Gel Agarosa 1%

Agarosa dilarutkan dalam 30 mL TBE

$$\text{Reagen (\%)} = \frac{\text{massa zat terlarut (gram)}}{\text{volume zat terlarut (mL)}} \times 100\%$$

$$1\% = \frac{\text{massa agarosa (gram)}}{30 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$0,3 \text{ gram} = \text{massa agarosa}$$

6. Komposisi PCR

Bahan yang diperlukan dalam proses amplifikasi sikuen DNA menggunakan PCR diantara lain akuabides steril 15 µL. PCR master mix 25 µL, dan Ekstrak DNA sebanyak 2 µL. *Forward primer* dan *reverse primer* yang dipakai merupakan sepasang primer universal 27 F dan 1492 R dengan volume masing-masing reagen 1,25 µL. Total volume yang dibutuhkan dalam satu kali running PCR yaitu 44,5 µL.

7. Pembuatan Buffer TAE 1X

Stok buffer TAE 50X dibuat dengan mencampurkan 24,20 mL tris, 5,7 mL asam asetat glasial, dan 10 mL EDTA 5 M. Semua bahan dilarutkan dalam 61,1 mL akuades steril hingga mencapai volume 100 mL. Sedangkan untuk membuat buffer TAE 1X dalam 500 mL volume larutan stok yang dibutuhkan adalah

$$M1V1 = M2V2$$

$$50X \cdot V1 = 1X \cdot 500 \text{ mL}$$

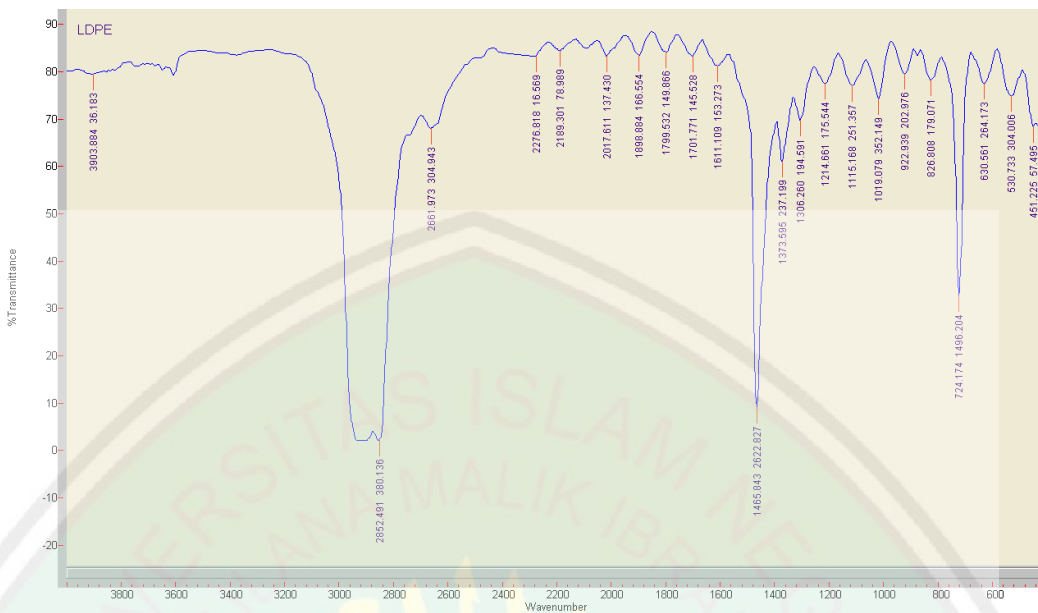
$V_1 = 10 \text{ mL}$

Jadi, untuk membuat buffer TAE 1X diperlukan 10 mL stok buffer 50X

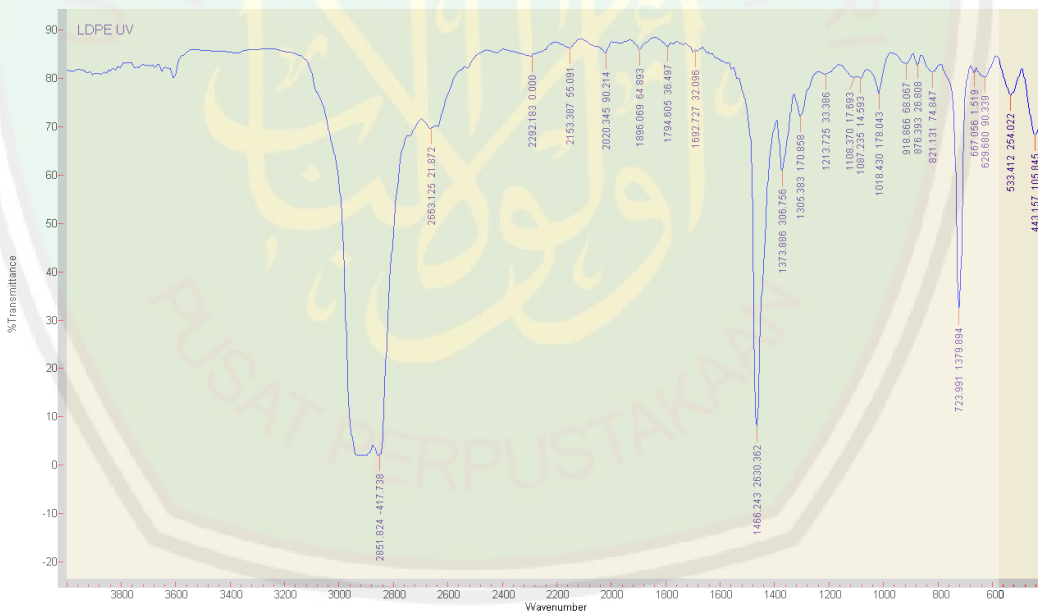


Lampiran 4. Hasil FTIR

1. Plastik LDPE Sebelum UV

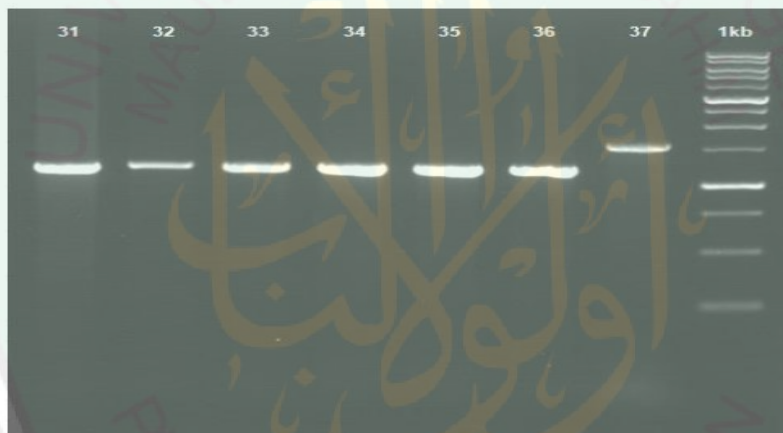


2. Plastik LDPE Setelah UV



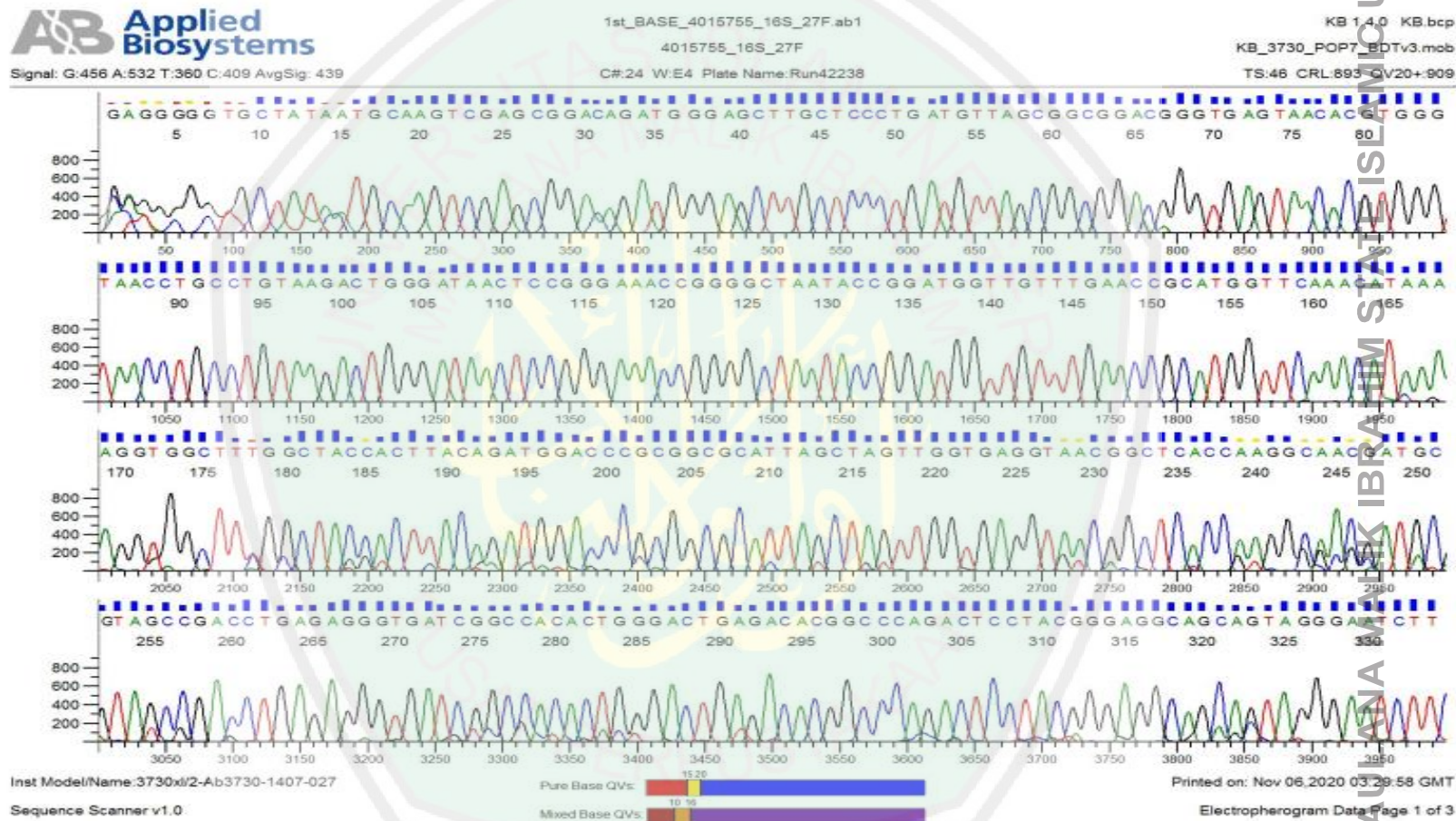
Lampiran 5. Hasil Elektroforesis PCR

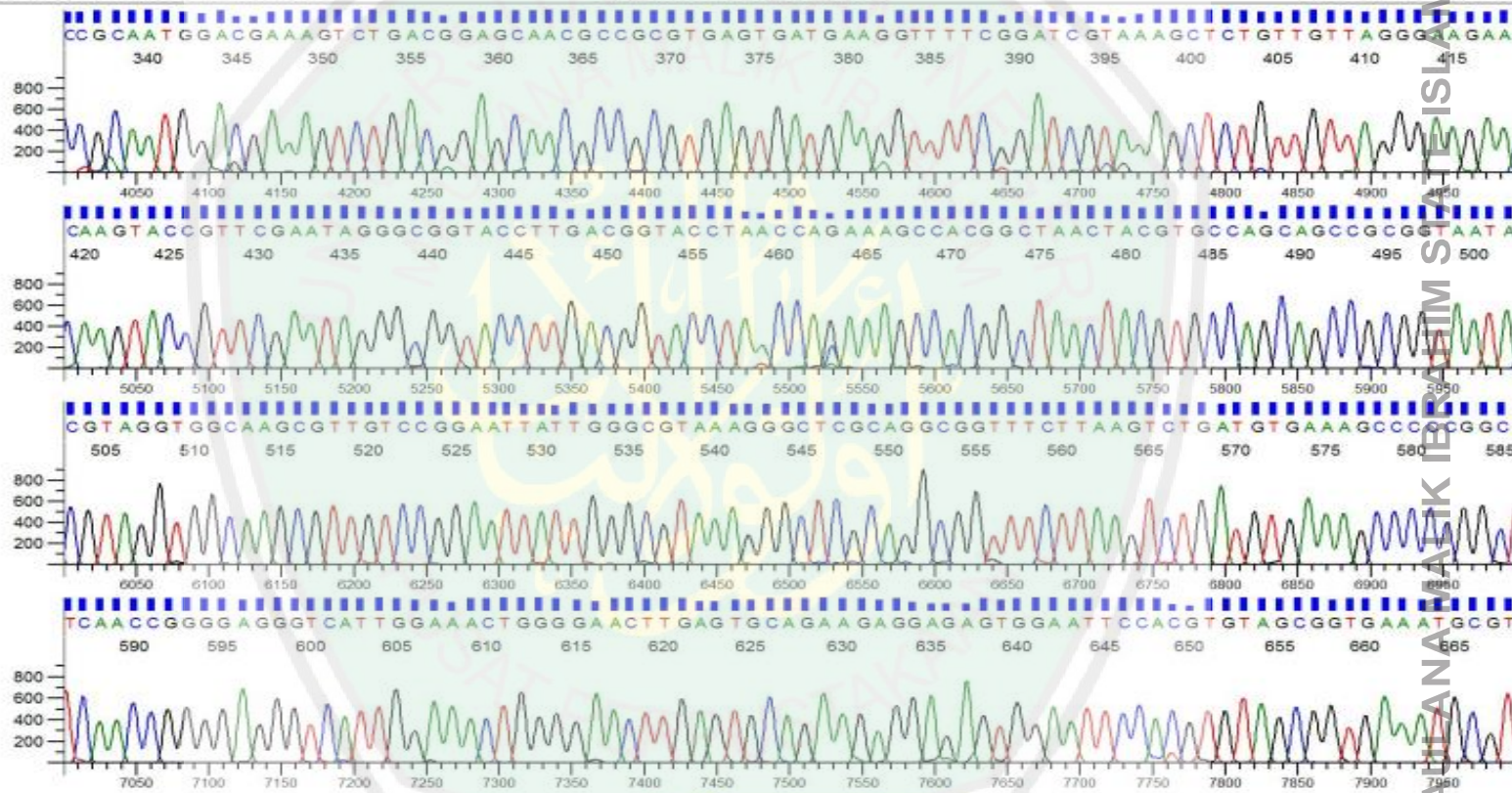
Order ID: 187347 Order Type: Enhance
 PT. Genetika Science Indonesia,
 Green Lake City Ruko Great Wall, Blok C 19-21.
 Kel Petir, Gondrong, Kec. Cipondoh, Kota Tangerang.
 Banten 15147, Indonesia.
 Attn : Genetika/ Mahrus Ismail

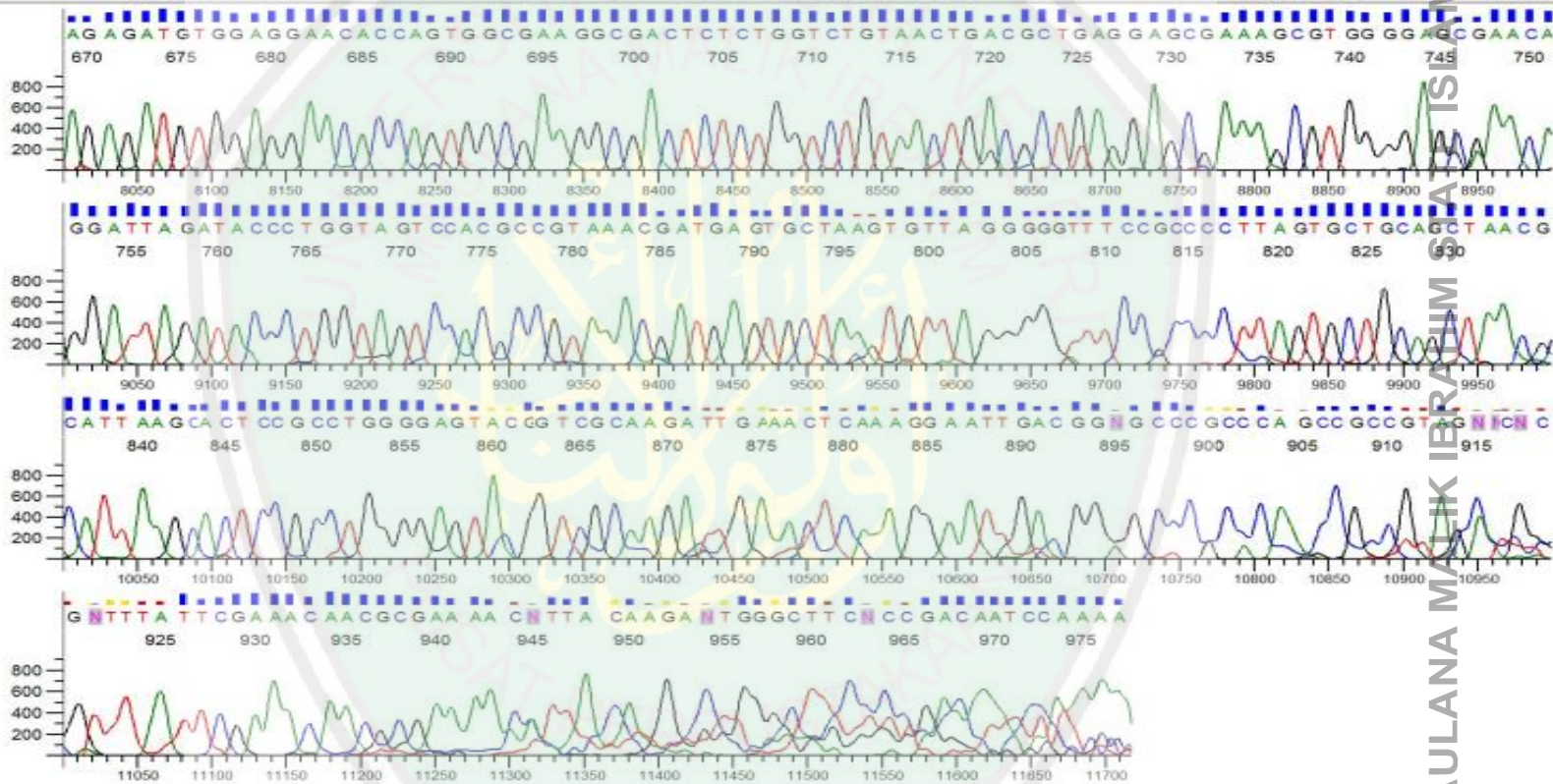


Condition: 0.8% agarose gel
 Amount of DNA ladder loaded per lane: 0.1ug each
 Volume of sample loaded per lane: 1uL each
1kb DNA Ladder (bp): 250 500 750 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 4,000 5,000 6,000 8,000 10,000
1kb DNA Ladder (ng/0.1ug): 9 6 4.6 18.4 4 6.8 6.8 18.4 3.6 5.6 5.6 5.6 5.6
 Note: The DNA ladder is not applicable for sizing comparison of non-linear DNA samples (e.g. plasmid DNA)

Lampiran 6. Hasil Sikuensing Bagian *Forward* dengan Metode *Sanger*

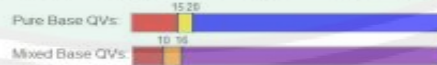






Inst ModelName:3730xl/2-Ab3730-1407-027

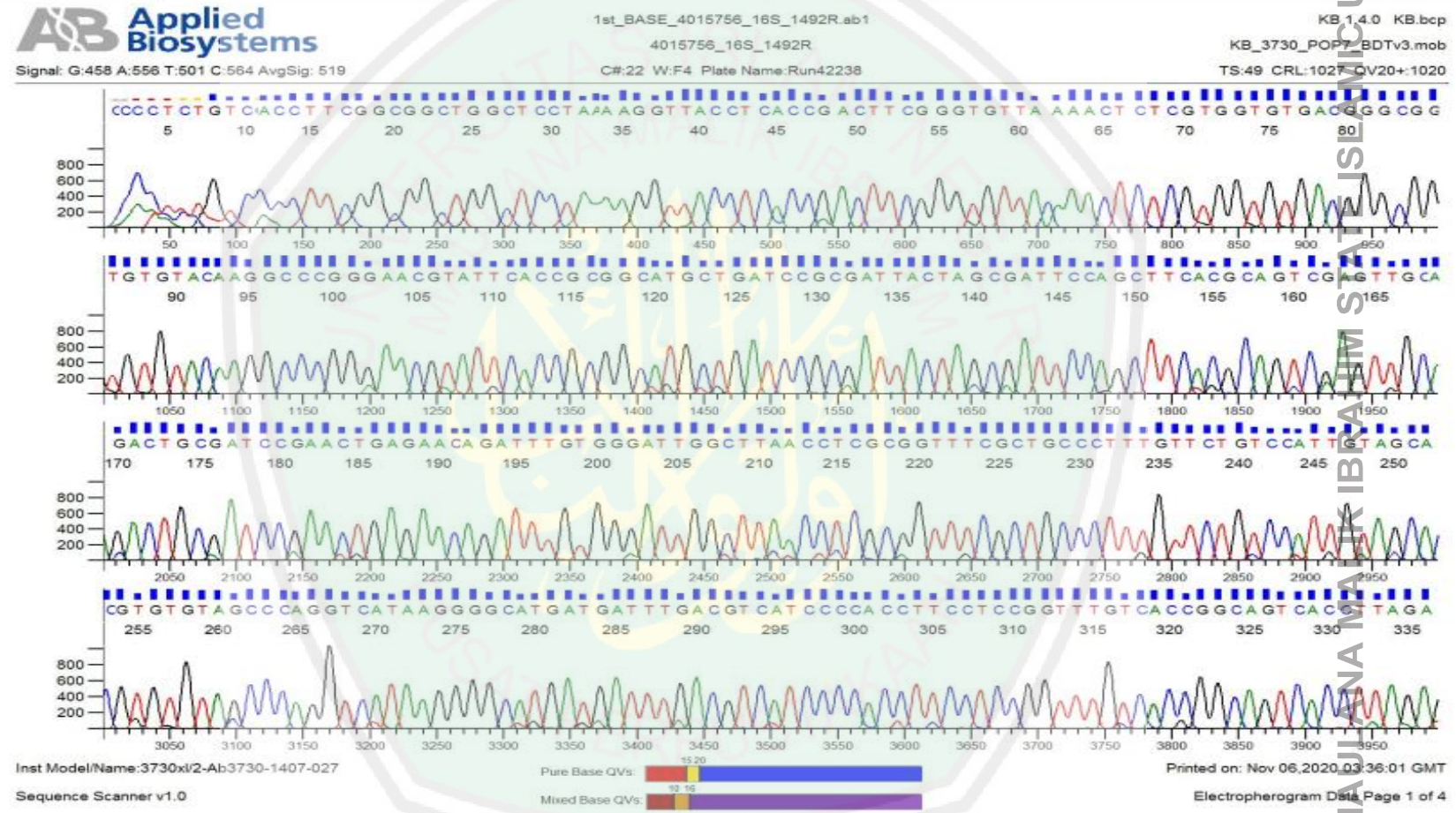
Sequence Scanner v1.0



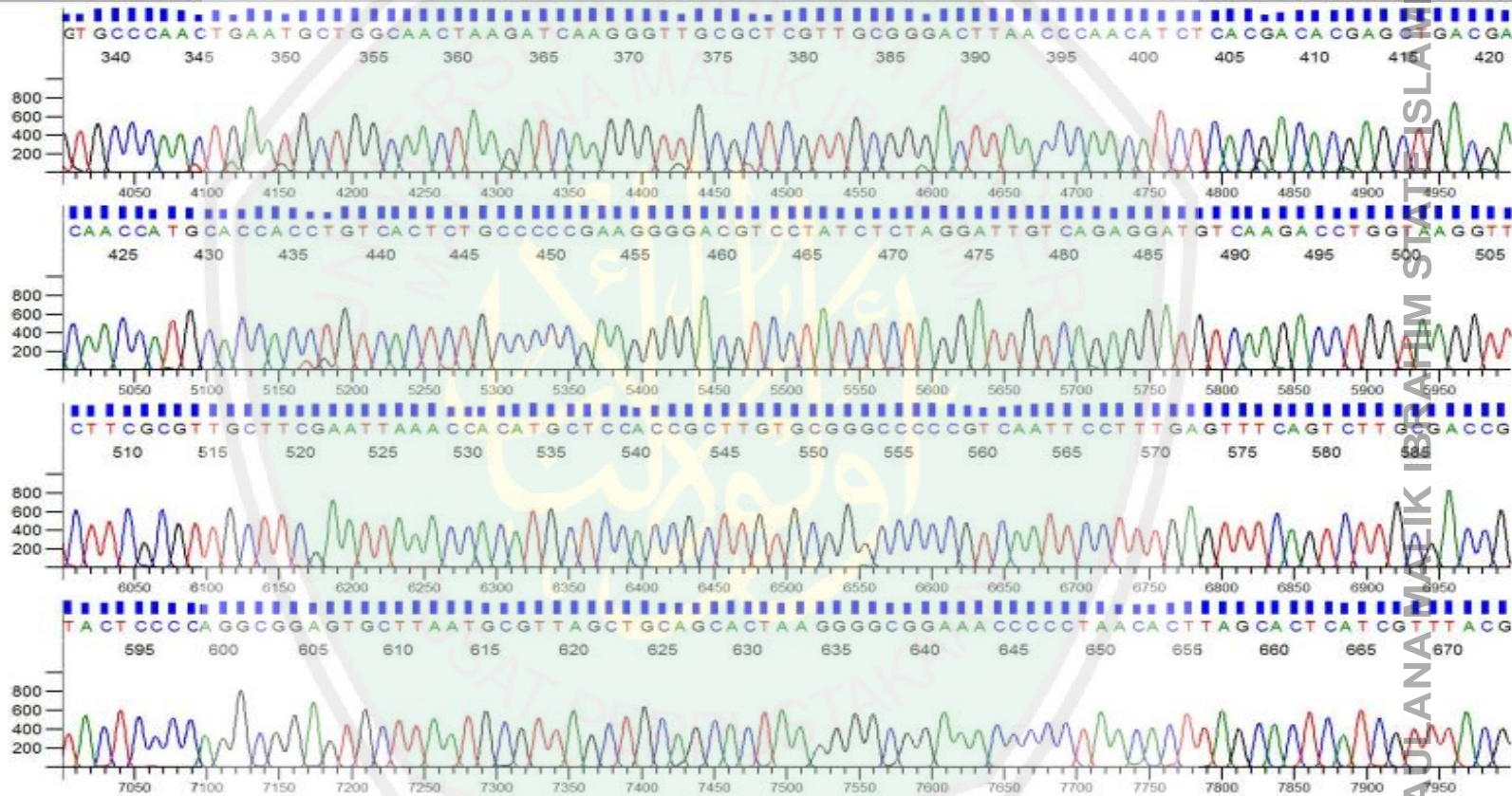
Printed on: Nov 06, 2020 03:29:58 GMT

Electropherogram Page 3 of 3

Lampiran 7. Hasil Sikuensing Bagian *Reverse* dengan Metode Sanger



LIBRARY OF MAJLANA MA'ALIK IBRAHIM SALISSEMO UNIVERSITY OF



Inst Model/Name:3730xl/2-Ab3730-1407-027

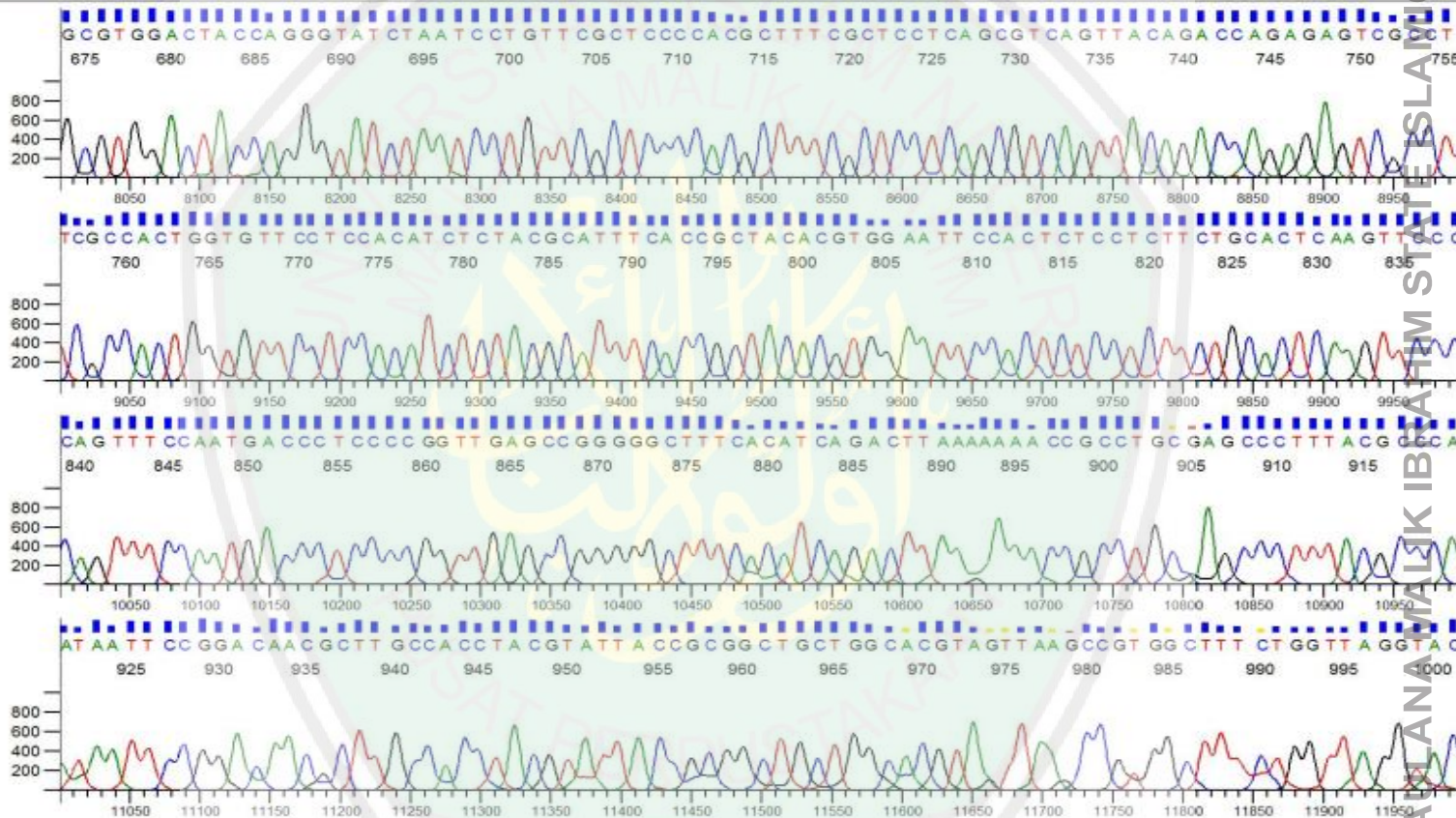
Sequence Scanner v1.0



Printed on: Nov 06, 2020 09:36:01 GMT

Electropherogram Data Page 2 of 4

LIBRARY OF MAJANA MALIK IBRAHIM SULTAN ISLAMIC UNIVERSITY OF



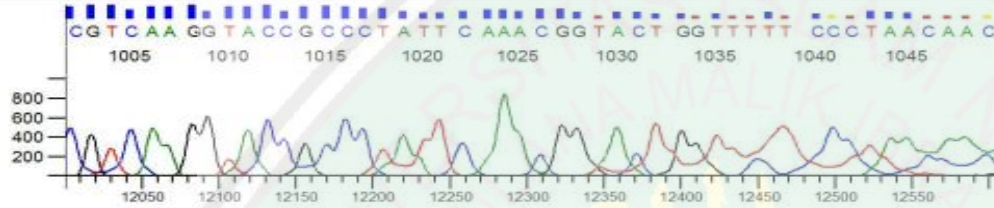
Inst Model Name:3730xl2-Ab3730-1407-027



Printed on: Nov 06, 2020 03:36:04 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bakteri BP2 | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | |
| 2. Bacillus subtilis strain | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | |
| 3. Bacillus subtilis strain | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 4. Bacillus subtilis strain | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 5. Bacillus tequilensis str | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 6. Bacillus vallismortis st | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 7. Bacillus mojavensis st | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 8. Bacillus halotolerans s | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 9. Bacillus velezensis st | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 10. Bacillus nakamurai s | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 11. Bacillus amyloliquefa | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 12. Bacillus amyloliquefa | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 13. Bacillus nematocida | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 14. Bacillus atrophaeus | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 15. Bacillus atrophaeus | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 16. Bacillus siamensis K | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 17. Bacillus haynesii str | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 18. Bacillus licheniformis | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 19. Bacillus svezeyi str | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 20. Bacillus aerius strain | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 21. Bacillus xiamenensis | A | T | G | G | T | T | C | A | A | A | C | A | T | A | A | A | G | G | T | G | G | T | T | T | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | A | C | A | G | A | T | G | G | A | C | C | C | G | C | G | C | A | T | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | |
| 22. Pseudomonas stutze | C | G | - | - | G | A | G | A | A | G | C | G | G | G | G | A | T | C | T | T | G | A | C | T | C | G | C | T | A | C | C | A | G | A | T | G | A | G | C | C | T | A | G | G | T | C | G | G | T | C | G | A | T | A | G | C | T | A | G | T | T | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | C | G | T | | | | | | |
| 23. Lactobacillus plantar | T | G | G | T | C | C | G | A | G | T | T | T | G | A | A | G | A | T | G | G | C | T | T | C | - | G | G | C | T | A | C | - | C | A | C | T | T | T | G | A | T | G | G | Y | C | C | G | C | G | T | A | T | A | K | C | T | A | K | A | T | G | G | T | G | G | G | T | A | A | C | G | G | C | T | C | A | C | C | A | A | G | A | A | C | G | A | T | G | A | T | A | C | G | T | | | | | |
| 1. Bakteri BP2 | A | G | C | C | G | A | C | C | T | G | A | G | A | G | G | G | T | G | A | T | C | G | G | C | A | C | A | C | T | G | G | G | A | C | T | G | A | G | A | C | A | C | G | G | C | C | A | G | A | C | T | C | T | A | C | G | G | G | A | G | G | C | A | G | C | A | G | T | A | G | G | G | A | T | C | T | T | C | C | G | C | A | A | T | G | G | A | C | G | A | A | A | G | T | C | T | G | A | C |
| 2. Bacillus subtilis strain | A | G | C | C | G | A | C | C | T | G | A | G | A | G | G | G | T | G | A | T | C | G | G | C | A | C | A | C | T | G | G | G | A | C | T | G | A | G | A | C | A | C | G | G | C | C | A | G | A | C | T | C | T | A | C | G | G | G | A | G | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bakteri BP2 | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 2. Bacillus subtilis strain | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 3. Bacillus subtilis strain | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 4. Bacillus subtilis strain | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 5. Bacillus tequilensis str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 6. Bacillus vallismortis st | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 7. Bacillus mojavensis str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 8. Bacillus halotolerans str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 9. Bacillus velezensis str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 10. Bacillus nakamurai s | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 11. Bacillus amyloliquefa | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 12. Bacillus amyloliquefa | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 13. Bacillus nematocida | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 14. Bacillus atrophaeus | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 15. Bacillus atrophaeus | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 16. Bacillus siamensis K | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 17. Bacillus haynesii str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 18. Bacillus licheniformis | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 19. Bacillus svezeyi str | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 20. Bacillus aerius strain | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 21. Bacillus xiamenensis | C | T | C | T | G | A | C | A | A | T | C | C | T | A | G | A | G | A | T | A | G | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | C | G | G | G | G | C | A | G | A | G | T | G | A | C | A | G | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A |
| 22. Pseudomonas stutze | A | G | A | G | A | C | T | T | T | C | A | G | A | G | A | T | G | A | T | T | G | T | G | T | C | C | T | T | C | G | G | G | A | A | C | T | C | T | G | A | C | A | A | G | T | G | C | T | G | C | A | T | G | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | T | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A | | | | | | | | | | | |
| 23. Lactobacillus plantar | T | A | T | G | C | A | A | A | T | T | C | T | A | A | G | A | G | A | T | T | A | G | A | C | G | T | T | C | C | T | T | C | G | G | G | A | C | T | G | A | C | A | A | G | T | G | G | T | G | C | A | T | G | G | T | T | G | T | C | A | G | C | T | C | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T | G | G | G | G | A | A | G | T | C | C | C | G | C | A | | | | | | | |
| 1. Bakteri BP2 | A | C | G | A | G | C | G | C | A | A | C | C | T | T | G | A | T | C | T | T | A | G | T | T | G | C | A | G | C | A | - | - | T | T | C | A | G | T | T | G | G | G | - | A | C | T | C | A | A | G | G | T | G | A | C | T | G | C | C | G | G | T | G | A | C | A | A | A | C | C | G | G | A | G | A | G | G | T | G | G | G | A | T | G | A | G | T | C | A | A | A | T | C | A | T |
| 2. Bacillus subtilis strain | A | C | G | A | G | C | G | C | A | A | C | C | T | T | G | A | T | C | T | T | A | G | T | T | G | C | A | G | C | A | - | - | T | T | C | A | G | T | T | G | G | G | - | A | C | T | C | A | A | G | G | T | G | A | C | T | G | C | C | G | G | T | G | A | C | A | A | A | C | C | G | G | A | G | A | G | G | T | G | G | G | A | T | G | A | G | T | C | A | A | A | T | C | A | T |
| 3. Bacillus subtilis strain | A | C | G | A</ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bakteri BP2 | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | - | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 2. Bacillus subtilis strain | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 3. Bacillus subtilis strain | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 4. Bacillus subtilis strain | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 5. Bacillus tequilensis str | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 6. Bacillus vallismortis st | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 7. Bacillus mojavensis st | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 8. Bacillus halotolerans st | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 9. Bacillus velezensis st | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 10. Bacillus nakamurai s | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 11. Bacillus amyloliquefa | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 12. Bacillus amyloliquefa | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 13. Bacillus nematocida | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 14. Bacillus atrophaeus | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 15. Bacillus atrophaeus | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 16. Bacillus siamensis KC | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 17. Bacillus haynesii str | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 18. Bacillus licheniformis | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 19. Bacillus svezeyi str | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 20. Bacillus aerius strain | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 21. Bacillus xiamenensis | C | A | C | C | A | C | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | C | G | A | A | G | T | C | G | G | T | G | A | G | G | T | A | A | | |
| 22. Pseudomonas stütze | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| 23. Lactobacillus plantar | C | A | C | C | A | T | G | A | G | A | G | T | T | T | G | T | A | A | C | A | C | C | A | A | A | G | T | C | G | G | T | G | G | G | T | A | A | - | - | | |
| 1. Bakteri BP2 | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| 2. Bacillus subtilis strain | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | - | - |
| 3. Bacillus subtilis strain | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 4. Bacillus subtilis strain | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 5. Bacillus tequilensis st | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 6. Bacillus vallismortis st | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 7. Bacillus mojavensis st | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 8. Bacillus halotolerans st | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 9. Bacillus velezensis st | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | A | C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10. Bacillus nakamurai s | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 11. Bacillus amyloliquefa | C | C | T | T | T | T | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | - | - | - | - |
| 12. Bacillus amyloliquefa | C | C | T | T | T | T | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | - | - |
| 13. Bacillus nematocida | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 14. Bacillus atrophaeus | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 15. Bacillus atrophaeus | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 16. Bacillus siamensis K | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 17. Bacillus haynesii str | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 18. Bacillus licheniformis | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 19. Bacillus svezeyi str | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 20. Bacillus aerius strain | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 21. Bacillus xiamenensis | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | G | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | G | G | G | T | G | A | A |
| 22. Pseudomonas stütze | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 23. Lactobacillus plantar | C | C | T | T | T | A | G | G | A | G | C | C | A | G | C | C | G | C | T | A | A | G | G | T | G | G | A | C | - | A | G | A | T | T | A | G | G | T | G | A | A |

