

**IDENTIFIKASI FENOTIP dan GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK dengan PERBEDAAN METODE ISOLASI
DNA**

SKRIPSI

**Oleh:
DHEMA PISSELA BAYU MARTHA
NIM. 17630101**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**IDENTIFIKASI FENOTIP dan GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK dengan PERBEDAAN METODE ISOLASI
DNA**

SKRIPSI

**Oleh:
Dhema Pissela Bayu Martha
NIM. 17630101**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**IDENTIFIKASI FENOTIP dan GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK DENGAN PERBEDAAN METODE ISOLASI
DNA**

SKRIPSI

**Disusun oleh:
Dhema Pissela Bayu Martha
17630101**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 05 Juni 2023**

Pembimbing I



**Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248**

Pembimbing II



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

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



**IDENTIFIKASI FENOTIP dan GENOTIP 16S rRNA BAKTERI
PENDEGRADASI PLASTIK dengan PERBEDAAN METODE ISOLASI
DNA**

SKRIPSI

**Oleh:
Dhema Pissela Bayu Martha
NIM. 17630101**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 15 Juni 2023**

**Penguji Utama : Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010**

**Ketua Penguji : Susi Nurul Khalifah, M.Si
NIP. 19851020 201903 2 012**

**Sekretaris Penguji : Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248**

**Anggota Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si.,M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**



**Mengesahkan
Ketua Program Studi**



**Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dhema Pissela Bayu Martha
NIM : 17630101
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : “Identifikasi Fenotip dan Genotip 16S rRNA Bakteri
Pendegradasi Plastik dengan Perbedaan Metode Isolasi
DNA”

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai peraturan yang berlaku

Malang, 15 Juni 2023
Yang membuat pernyataan,



Dhema Pissela Bayu Martha
NIM. 17630101

HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan kesehatan serta kemampuan dalam melaksanakan serangkaian lika-liku kehidupan dalam mengenyam pendidikan. Tak lupa, sholawat serta salam yang selalu terpanjatkan kepada Nabi akhir zaman yang telah memberikan cahaya di seluruh elemen kehidupan, Nabi Muhammad SAW.

Kedua orang tua (Bapak Imam Zainudin dan Ibu Purborini) yang telah memberikan sokongan moral sertai materai sehingga bisa menyelesaikan sampai terbentuknya naskah ini, serta cinta kasih serta do'a dan pelajaran hidup yang tiada henti selalu diberikan. Tak lupa untuk adik saya Chessya yang memberi motivasi agar bisa cepat lulus untuk segera melakukan pergantian dana untuk melanjutkan jenjang pendidikannya.

Teman-teman penelitian di Laboratorium Riset Bioteknologi dan Biokimia. Sobat Fajar, Galih dan Dante, Pasukan Kurcaci, ning Ucha, Silvi, Anin, Sdr Ilham, Taufiq, Finan, Yusril, Agie yang saling support serta senda gurau bersama. Serta semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan Skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

MOTTO

“Never gonna give you up, Never gonna let you down ~ Rick Astley”

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, hidayah dan inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu menyebarkan dan mengembangkan ajaran Islam kepada umatnya.

Selanjutnya, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penyusunan Skripsi ini, baik berupa dorongan moril maupun materiil. Penulis yakin tanpa bantuan dan dukungan tersebut, sulit rasanya bagi penulis untuk menyelesaikan Skripsi ini. Dengan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T.,M.P, selaku Dosen pembimbing I. Karena atas bimbingan, pengarahan, kesabaran, dan motivasinya penyusunan Naskah ini dapat terselesaikan.
5. Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P, selaku Dosen pembimbing II yang telah sabar dalam membantu dan membimbing penyusunan Naskah ini.
6. Segenap sivitas akademika Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Kedua orang tua penulis tercinta serta keluarga yang telah memberikan dukungan moral, berupa do'a, dan dana sehingga penyusunan Skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Diri saya sendiri yang sanggup menyelesaikan semua ini.

Sebagai seorang manusia dengan keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa dalam penulisan Skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna sehingga membutuhkan kritik, saran, dan bimbingan yang bersifat membangun.

Akhir kata penulis berharap semoga Skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Malang, 15 Juni 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bakteri Pendegradasi Plastik	6
2.2 Identifikasi Bakteri Menggunakan <i>Microbact</i>	8
2.3 Isolasi DNA	9
2.3.1 Isolasi DNA dengan Metode CTAB	10
2.3.2 Isolasi DNA Menggunakan Kit	12
2.4 Gen Penanda 16S rRNA	13
2.5 Amplifikasi DNA dengan PCR (Polymerase Chain Reaction)	14
2.7 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa	16
2.8 Uji Kuantitatif DNA	17
2.9 Analisis Data	19
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat	21
3.2 Alat dan Bahan	21
3.2.1 Alat Penelitian.....	21
3.2.2 Bahan Penelitian	21
3.3 Tahapan Penelitian	22
3.4 Cara Kerja.....	22
3.4.1 Peremajaan Bakteri	22
3.4.2 Pengamatan Morfologi	23
3.4.3 Uji Biokimia Bakteri.....	23
3.4.4 Isolasi DNA dengan Metode CTAB	24
3.4.5 Isolasi DNA dengan Metode KIT	25

3.4.6	Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR	26
3.4.7	Uji Kuantitatif DNA	27
3.4.8	Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa	27
3.4.9	Analisis Data.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		29
4.1	Peremajaan Bakteri BP.....	29
4.2	Karakterisasi Isolat BP Secara Fenotip.....	30
4.2.1	Pengamatan Makroskopis	30
4.2.2	Pewarnaan Gram.....	31
4.2.3	Uji Katalase.....	33
4.2.4	Uji Biokimia Isolat BP.....	35
4.3	Isolasi DNA dengan Metode CTAB	36
4.4	Isolasi DNA dengan Metode KIT	40
4.5	Uji Kuantitatif DNA Hasil Isolasi	42
4.6	Hasil Amplifikasi 16S rRNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i>	43
4.7	Analisa Kekerbatan Isolat BP 2 dengan Pohon Filogenetik.....	45
4.8	Materi Genetik DNA dalam Prespektif Islam	46
BAB V PENUTUP.....		48
5.1	Kesimpulan.....	48
5.2	Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN.....		56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Proses terjadinya PCR pada DNA	16
Gambar 2.2	Hasil elektroforegram	17
Gambar 2.3	Spektra NanoDrop® ND-1000	18
Gambar 4.1	Peremajaan Bakteri BP	29
Gambar 4.2	Ikatan Ionik antara Kristal Violet dengan Sel Bakteri.....	32
Gambar 4.3	Hasil Pewarnaan Gram Isolat BP (Perbesaran 1000x)	33
Gambar 4.4	Hasil Pengujian Katalase Isolat BP	34
Gambar 4.5	Mekanisme Reaksi Degradasi H ₂ O ₂ Oleh Enzim Katalase	34
Gambar 4.6	Prinsip pelisisan membran sel dengan bantuan detergen	37
Gambar 4.7	Penempelan SDS dan pembentukan micelle	37
Gambar 4.8	Perbedaan ikatan struktur micelle CTAB & SDS	38
Gambar 4.10	Pemurnian DNA	39
Gambar 4.11	Reaksi pengikatan DNA dalam membran silika	40
Gambar 4.12	Pemindahan hasil ekstraksi ke kolom silika	42
Gambar 4.13	Hasil elektroforegram PCR	44
Gambar 4.14	Hasil contig sekuen 16S rRNA isolat bakteri BP	45
Gambar 4.15	Hasil kontruksi pohon filogenetik isolat bakteri BP.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Potensi aktivitas degradasi bakteri	7
Tabel 4.1 Pengamatan Koloni Isolat BP.....	30
Tabel 4.2 Uji Biokimia Menggunakan <i>Microbact</i> 12B.....	35
Tabel 4.3 Hasil uji kuantitatif isolasi DNA menggunakan CTAB dan Kit.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian.....	56
Lampiran 2 Skema Kerja.....	57
Lampiran 3 Perhitungan	62
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	65

ABSTRAK

Martha, D. P. B. 2023. **Identifikasi Genotip 16s rRNA Bakteri Pendegradasi Plastik Dengan Perbedaan Metode Isolasi DNA**. Skripsi. Program Studi Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P

Kata Kunci: *Bakteri, metode CTAB, metode kit, gen 16S rRNA, skuensing*

Isolat bakteri BP merupakan bakteri yang berhasil diisolasi yang berasal dari TPA Pisang Kipas Jatimulyo Malang. Isolat bakteri BP telah dilakukan uji untuk mendegradasi plastik dan berhasil mendegradasinya. Hal ini membuktikan bahwa isolat tersebut memiliki potensi untuk mendegradasi plastik. Plastik memiliki rantai berulang dan panjang, sehingga dibutuhkan waktu yang lama untuk memecah rantai panjang menjadi rantai pendek. Karena hal ini menyebabkan sampah plastik menjadi susah untuk didegradasi. Dilaporkan ada beberapa jenis bakteri yang bisa mendegradasi plastik seperti strain bakteri seperti *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. dan *Streptomyces* spp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil uji kuantitatif hasil isolasi DNA dengan metode CTAB dan kit dan untuk mengetahui karakter fenotip dan genotip.

Bakteri yang telah diperoleh dari penelitian terdahulu dengan kode BP didapatkan dari TPA Jalan Pisang Kipas, Kota Malang. Identifikasi isolat bakteri dilakukan secara makroskopis, mikroskopis, uji biokimia dan nantinya akan diisolasi DNA dengan variasi metode CTAB dan KIT. Kemudian DNA diamplifikasi 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*.

Isolat Bakteri BP dari hasil uji geneotip mendapatkan nilai kemurnian $A_{260/280}$ sebesar 2,13. Dari hasil isolasi tersebut menghasilkan amplicon sebesar ~1100 bp. Dari hasil analisa diketahui bahwa isolat bakteri BP mempunyai kemiripan 98% dengan spesies bakteri *Bacillus Subtilis* strain SBMP 4.

ABSTRACT

Martha, D. P. B. 2023. **Identification of 16s rRNA Genotypes of Plastic Degrading Bacteria with Different DNA Isolation Methods.** Thesis. Chemistry Study Program. Faculty of Science and Technology Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P

Keyword: *Bacteria, CTAB method, KIT method, 16s rRNA, Sequencing*

Bacterial isolate BP is a bacteria that was successfully isolated from the Pisang Kipas Jatimulyo landfill in Malang. Bacterial isolate BP has been tested to degrade plastic and successfully degrades it. This proves that the isolate has the potential to degrade plastic. Plastics have long, repeating chains, so it takes a long time to break down the long chains into short chains. Because this plastic waste are difficult to degrade. It is reported that there are several types of bacteria that can degrade plastic such as bacterial strains such as *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. Aims of this study is to determine differences in the results of quantitative test results of DNA isolation using CTAB and kit methods and to determine phenotypic and genotypic characters.

The bacteria that have been obtained from previous research with the code name BP were obtained from landfill Jalan Pisang Kipas, Malang City. Identification of bacterial isolates was carried out macroscopically, microscopically, biochemically and later isolated DNA using a variety of CTAB and KIT methods. Then the DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primer pairs 27F and 1492R. DNA sequencing was carried out using the Sanger method and utilizing software for analysis and determining bacterial kinship based on the closeness of the analysis results to the database.

BP Bacterial Isolate from the results of the genotyping test obtained an A260/280 purity value of 2.13. The results of the isolation produced an amplicon of ~1100 bp. From the results of the analysis it is known that the bacterial isolate BP has 98% similarities with the bacterial species *Bacillus Subtilis* sstrain SBMP 4.

مستخلص البحث

مرطى، د. ف. با. ٢٠٢٣. تعرف الطراز العرقى (16s rRNA) الجرثوم المحقر البلاستيك بإختلاف المنهج العزل (DNA). البَحْثُ العِلْمِي. قسم الكيمياء بكلية العلوم و التكنولوجيا بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: الدكتورة أنيك ماوناتين الماجستير؛ المشرفة الثانية: الدكتورة أعين الجنة الماجستير

الكلمات المفتاحية : الجرثوم، المنهج (CTAB)، المنهج كيت، مورثة (16s rRNA)، التسلسل.

عزل الجرثوم (BP) هو الجرثوم الذي ينجح ان يُعزل وبأقي من (TPA) فيسانج كيفاس جاتيموليا مالانج. وفُعل الإختبار لتحقير البلاستيك ونجح. يدل هذا الحال أن لدى ذلك العزل إحتمالا لتحقير البلاستيك. لدى بلاستيك السوار التردد الطويل، حتى يُحتاج الوقت الطويل لتخريق السوار الطويل إلى القصير. لأنه يسبب القمامة البلاستيك الصعب للتحقير. يُرد موجود الجرثومة التي تستطيع ان تحقر البلاستيك مثل (strain) الجرثوم و (*Pseudomonas spp*) و (*Bacillus spp*) و (*Streptomyces spp*). يهدف هذا البحث لمعرفة إختلاف حصيلة الإختيار الكمي من عزل (DNA) بمنهج (CTAB) وكيت ولمعرفة شخصية الطراز المظهري والطراز العرقى.

الجرثوم الذي يُنال من خلفية البحث برمز (BP) يُنال من (TPA) شارع فيسانج كيفاس جاتيموليا مالانج. يُفعل تعرف عزل الجرثوم بالعين المجردة والمجهره وإختبار الكيمياء الحيوية والتالي سيعزل (DNA) بتنوع المنهج (CTAB) وكيت. ثم، يُضخّم (DNA) ب (*Polymerase Chain Reaction (PCR)*) ويستخدم الزوجة الرئيسية ٢٧ف و١٤٩٢ر. يفعل ترتيب (DNA) بمنهج سانجر وينتفع البرنامج (*software*) لتحليل وتقرير قرابة الجرثوم بناء على قرب حصيلة التحليل بقاعدة البيانات.

ينال عزل الجرثوم (BP) من حصيلة إختبار الطراز العرقى قيمة ($A_{260/280}$) ١٣،٠٢. من تلك حصيلة العزل، تحصل أمبليكون ~١١٠٠ ب ف. من حصيلة التحليل، تعرف أن لدى عزل الجرثوم (BP) تشابه ٩٨٪ بفصائل الجرثوم (*Bacillus Subtilis strain SBMP 4*).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Plastik merupakan salah satu jenis polimer yang membutuhkan waktu lama untuk terurai. Karena plastik memiliki rantai berulang dan panjang, sehingga dibutuhkan waktu yang lama untuk memecah rantai panjang menjadi rantai pendek (Bhardwaj, 2012). Banyaknya plastik yang dibuang ke lingkungan akan menyebabkan kerusakan lingkungan serta mengganggu aktivitas makhluk hidup yang ada. Sebagaimana Allah SWT firman dalam Surah Ar-Rum (30) ayat 41:

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

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

Menurut tafsir jalalain dalam ayat ini diterangkan al-fasad (pelanggaran atas sistem atau hukum yang dibuat Allah), al-fasad bisa diartikan juga sebagai “perusakan”. Perusakan sendiri bias berupa pencemaran alam sehingga tidak layak lagi didiami atau ditinggali, atau bahkan penghancuran alam sehingga tidak bisa lagi dimanfaatkan. Misalnya di daratan masalah ini umumnya disebabkan oleh pembuangan sampah yang sembarangan salah satu sampah yang sulit didegradasi dan sering digunakan masyarakat umum adalah sampah plastik (Al-Mahally, Imam Jalaluddin dan Imam Jalaluddin As-suyutti, 1990).

Bakteri, jamur, dan ganggang telah dilaporkan merupakan mikroba yang efektif dalam mendegradasi polimer (Ali dkk., 2021). Strain bakteri dapat mendegradasi zat polimer plastik dalam air atau tanah. Beberapa penelitian telah

melaporkan bahwa biodegradasi plastik oleh bakteri khusus dapat menjadi strategi bioremediasi yang menjanjikan untuk ekosistem yang terkontaminasi (Yoshida dkk., 2016). Beberapa strain bakteri seperti *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. dan *Streptomyces* spp. telah menunjukkan efisiensi degradasi yang tinggi terhadap berbagai polimer plastik (Li dkk., 2020; Matjašič dkk., 2021).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Istiqomah, 2020 telah berhasil didapatkan isolat bakteri berupa bakteri dari spesies *Bacillus sporothermoduran*. Bakteri yang didapatkan akan diidentifikasi secara makroskopis dengan cara uji morfologi dan karakterisasi biokimia. Uji morfologi dilakukan dengan pewarnaan gram dan pewarnaan endospora serta dilakukan pengamatan bentuk terhadap isolat bakteri yang berhasil dimurnikan. Identifikasi bakteri pendegradasi plastik dapat dilakukan dengan dua metode di antaranya 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 (Hikmawati dkk., 2019; Zhang dkk., 2020). Berdasarkan Penelitian yang telah dilakukan Dwi, 2020 telah berhasil didapatkan isolat bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi plastik dengan kemampuannya dalam mendegradasi plastik LDPE sebesar 0,0031%.

Metode konvensional isolasi DNA memiliki keunggulan lebih murah dan dapat digunakan dalam jangkauan yang luas, sedangkan kekurangannya adalah membutuhkan waktu yang relatif lama waktu dan hasil yang diperoleh tergantung pada jenis sampel. Preparasi alat dan bahan ekstraksi manual biasanya memakan waktu lebih lama. Sedangkan untuk metode yang menggunakan dalam satu paket kit telah tersedia seperangkat perlengkapan isolasi yang siap pakai, sehingga

meminimalisir waktu kerja namun memiliki kekurangan dimahalinya untuk pembelian kit tersebut (Ali, Nasir dkk., 2017).

Identifikasi bakteri secara mikroskopis 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 (Nurkanto dan Agusta, 2015; Yohandini dkk., 2015; Christy dkk, 2017). Berdasarkan Janda dan Abbott, (2007) Analisis gen 16S rRNA dipergunakan sebab gen ini ada disemua sel bakteri yang fungsinya tidak berubah dalam saat yang lama. Selain itu urutan basa nitrogen gen 16s rRNA memiliki keragaman intraspesifik yang lebih rendah dibandingkan gen pengkode protein lain, dan sifat asal fragmen 16s rRNA yg lestari (Oren, 2004).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Abdel-Latif dan Osman, (2017) didapatkan nilai absorbansi A_{260}/A_{280} menggunakan metode kit sebesar 1,80–1,95, sedangkan metode CTAB didapatkan nilai absorbansi A_{260}/A_{280} 1,2–2,90. Penelitian Windusari dkk., (2018) mendapatkan hasil nilai absorbansi A_{260}/A_{280} menggunakan metode kit sebesar 1,853 dan untuk metode CTAB didapatkan A_{260}/A_{280} menggunakan metode kit sebesar 1,705. Sedangkan Nilai kemurnian DNA yang tinggi jika nilai Absorbansi A_{260}/A_{280} menunjukkan nilai 1,8-2,0, jika lebih rendah dari 1,8 menunjukkan sampel DNA terkontaminasi oleh protein, sedangkan kemurnian DNA yang nilainya lebih tinggi dari 2,0 artinya sampel DNA terkontaminasi oleh RNA. Pada perbandingan absorbansi λ 260/230 nm DNA murni berkisar antara 2-2,2. Jika nilainya lebih rendah dari 2 maka DNA

terkontaminasi oleh karbohidrat, bahan organik, atau kimia lain. (Arista dkk., 2018).

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan, maka akan dilakukan penelitian tentang identifikasi fenotip dan genotip 16S rRNA. Untuk bisa mengetahui karakteristik dan jenis spesies dari bakteri, serta efektivitas metode isolasi DNA dengan metode CTAB dan KIT.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil uji kuantitatif hasil isolasi DNA secara CTAB dan KIT?
2. Bagaimana karakteristik fenotip dan genotip dari isolat BP?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui hasil uji kuantitatif hasil isoalsi DNA secara CTAB dan KIT
2. Untuk mengetahui karakteristik fenotip dan genotip isolat bakteri BP

1.4 Batasan Masalah

1. Metode isolasi DNA yang digunakan CTAB dan kit.
2. Pasangan primer yang digunakan dalam identifikasi genotip adalah 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') serta 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3').

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi yang berkaitan dengan potensi serta manfaat bakteri dalam mendegradasi plastik sehingga mengurangi penggunaan bahan kimia dalam proses penguraian plastik
2. Memberi informasi tentang jenis bakteri yang mampu mendegradasi plastik sehingga menambah keberagaman plasma nutfah (sumber daya genetik) mikroorganisme yang mampu menguraikan limbah plastik di alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Pendegradasi Plastik

Bakteri merupakan golongan mikroorganisme bersel tunggal (prokariotik) yang hidup secara berkoloni dan tidak mempunyai selubung inti namun mampu hidup di mana saja. Bakteri memerlukan bahan organik yang didapatkan secara alami baik berasal dari organisme mati maupun hidup. Salah satu mikroorganisme yang diketahui dapat membantu dalam proses degradasi plastik adalah bakteri. Terdapat beberapa bakteri yang dapat mendegradasi plastik secara *in vitro* dengan memanfaatkan plasticizers dalam plastik sebagai sumber karbon seperti *Bacillus Subtilis*. Menurut Yao dkk., (2022) bakteri *Bacillus Subtilis*. mampu mendegradasi plastik sebesar 1,5% dengan waktu inkubasi selama 60 hari. Untuk dapat merombak plastik, bakteri harus dapat mengkontaminasi lapisan plastik dan menggunakan komponen pada plastik sebagai sumber nutrisi.

Oleh karena itu faktor tersebutlah bakteri dalam beberapa spesies berpotensi memanfaatkan bahan yang berasal dari limbah seperti plastik sebagai sumber makanan seperti yang terdapat dalam Tabel 2.1. Contoh dari tabel tersebut merupakan jenis bakteri yang termasuk dalam golongan bakteri *indigenous*. Bakteri *indigenous* merupakan bakteri yang hidup secara alami di alam bebas. Bakteri *indigenous* memiliki berbagai macam manfaat bagi manusia dan lingkungan. Beberapa hasil penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa bakteri *indigenous* mampu mendegradasi limbah, sebagai pengendali hidup tanaman, dan dapat sebagai antibiotik (Mardhiah dkk., 2015).

Tabel 2.1 Potensi aktivitas degradasi bakteri

Jenis	Aktivitas degradasi (%)	Masa Inkubasi (Hari)	Referensi
<i>Lysinibacillus</i> sp.	7,5	28	Jeon dkk., (2021)
<i>Bacillus sporothermoduran</i>	26	60	Kumar dkk., (2019)
<i>Bacillus Subtilis</i>	1,50	60	Yao dkk., (2022)

Degradasi plastik merupakan proses perubahan struktur kimia senyawa polimer akibat adanya faktor lingkungan seperti cahaya, panas, kelembaban, kondisi kimia atau aktivitas biologis. Sedangkan biodegradasi merupakan proses biokimia yang mengacu pada degradasi dan penggabungan polimer yang dilakukan oleh mikroorganisme. Proses biodegradasi plastik LDPE oleh bakteri dibagi menjadi empat tahapan yaitu biodeteriorasi, biofragmentasi, depolimerisasi, dan asimilasi (Maity dkk., 2021).

Biodeteriorasi merupakan proses di mana bakteri akan menempel pada permukaan plastik. Kemudian dilanjutkan dengan proses biofragmentasi, biofragmentasi merupakan proses di mana bakteri akan mensekresikan enzim hidrolitik polimerase untuk mengubah polimer menjadi monomer, oligomer, atau dimer. Struktur molekul yang lebih sederhana ini akan masuk ke dalam membran semipermeabel bakteri dan akan diserap untuk dijadikan sebagai sumber energi dalam pertumbuhan dan reproduksi (Skariyachan dkk., 2019). Al-qur'an menjelaskan bahwa mikroorganisme merupakan bukti bahwasanya terdapat materi fungsional yang sangat kecil yang disebut dengan zarah. Sebagaimana penggalan dari Al-Qur'an dalam surat yunus ayat 61 yang berbunyi;

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتَلَوْنَا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا نَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعُزُّبُ
عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْعَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya: "Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)".

Berdasarkan kandungan surat Yunus ayat 61, menurut Shihab, (2002) dalam bukunya Tafsir Al-Misbah volume 6 dijelaskan bahwa kata “*dzarrah*” pada ayat tersebut memiliki arti sebagai wujud substansi yang memiliki ukuran paling kecil. Sebagian ulama mengartikannya semut yang sangat kecil, atau debu yang berterbangan atau atom. Kata “*dzarrah*” juga memberikan petunjuk bagi manusia yang beriman untuk mempelajari makhluk mikroskopik.

2.2 Identifikasi Bakteri Menggunakan *Microbact*

Salah satu metode identifikasi mikroorganisme dengan cara menganalisis kemampuan dari mikroorganisme tersebut dengan menggunakan metode uji biokimia. Metode uji biokimia biasanya digunakan untuk menguji kemampuan dari mikroorganisme tersebut dalam menggunakan berbagai sumber karbon dan senyawa uji lainnya. Uji biokimia dewasa ini semakin beragam dan semakin banyak jenis metode ujinya yang mana dari uji tersebut akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies.

Kit *microbact* sendiri memiliki dua jenis yakni 12E dan 12B, kit 12E dan 12B adalah sistem identifikasi secara komersial untuk bakteri Gram negatif dengan Gram positif. *Microbact* 12E digunakan untuk Gram negatif sedangkan 12B digunakan untuk Gram positif. pengujian ini terdiri dari 12 substrat biokimia yang berbeda, tes ditempatkan disumuran yang ada dalam kit *microbact*.

Pengujian dengan menggunakan *microbact* akan mempermudah metode pengidentifikasi suatu organisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang dimurnikan dan dilarutkan ke dalam fisiologis (Oxoid, 2004).

Prinsip kerja dari *microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat dan dimasukkan ke dalam sumuran yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang jumlahnya 12 jenis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan kemasing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. selanjutnya dinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *patient record*. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka oktal yang didapat (Oxoid, 2004).

2.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah proses pengeluaran DNA dari tempatnya berada (ekstraksi atau lisis) biasanya dilakukan dengan homogenisasi dan penambahan buffer ekstraksi atau buffer lisis untuk mencegah DNA rusak (Yuwono, 2008). Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya

seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya. Banyak sekali metode isolasi DNA yang bisa digunakan, akan tetapi pada dasarnya tahapan dari isolasi DNA pada semua bahan dan semua metode adalah sama, yakni lisis sel atau jaringan yang efektif, denaturasi kompleks nukleoprotein, dan inaktivasi nuklease. Proses lisis adalah proses awal yang menentukan keberhasilan suatu isolasi DNA. Ada berbagai cara yang dapat digunakan dalam tahap lisis yakni cara kimia dengan menggunakan enzim seperti proteinase-K dan SDS dan dengan cara mekanik seperti penggerusan dengan menggunakan nitrogen cair, dan inkubasi dengan menggunakan perlakuan suhu (Hariyadi dkk., 2018; Gill dkk., 2016; Alvarado dkk., 2017).

2.3.1 Isolasi DNA dengan Metode CTAB

Prinsip dari metode isolasi DNA menggunakan metode CTAB meliputi proses lisis sel, ekstraksi, presipitasi dan purifikasi. Proses lisis merupakan proses peluruhan dinding sel sehingga seluruh isi sel keluar. Keberhasilan proses lisis ditentukan oleh faktor komposisi buffer lisis yang digunakan. Komposisi buffer lisis dalam metode CTAB terdiri dari, Tris-HCl, surfaktan CTAB, EDTA, NaCl, dan polivinilpirolidon (PVP).

Dinding sel yang telah terlisis mengakibatkan DNA beserta seluruh isi sel keluar. DNA yang masih bercampur dengan kontaminan selanjutnya akan dipisahkan melalui proses ekstraksi. Kontaminan yang bercampur dengan DNA terdiri dari lemak, polisakarida, fenolik dan protein. Dalam proses ekstraksi DNA biasanya digunakan pelarut organik seperti kloroform dan isoamil alkohol. Kloroform berfungsi untuk mendenaturasi protein sedangkan isoamil alkohol

digunakan untuk menghilangkan busa. Protokol dari metode CTAB ini menggunakan proteinase-K dan lisozim yang merusak membran sel dan melepaskan sitoplasma komponen (Mohammadi dkk., 2017).

Penambahan larutan organik nantinya terbentuk campuran dan membentuk 3 lapisan. Dalam lapisan atas mengandung DNA dan RNA karena bersifat polar yang disebabkan oleh muatan negatif atom O pada gugus fosfat. Menurut (Switzer dkk., 1999), muatan dipol positif air berinteraksi dengan muatan dipol negatif pada gugus fosfodiester DNA. Interaksi ini akan meningkatkan kelarutan DNA dalam air. Protein yang terdenaturasi akan masuk di antara lapisan organik-air (intermediet) (Clark dan Christopher, 2000). Lemak dan protein nonpolar mudah larut dalam kloroform sehingga akan terdistribusi pada lapisan organik. Isoamil alkohol berfungsi untuk mengurangi busa selama proses ekstraksi berlangsung (Sambrook dan Russel., 2001).

Proses presipitasi DNA merupakan proses pengendapan DNA. Pengendapan DNA dibantu oleh etanol absolut dan garam ammonium asetat. Etanol absolut dingin berfungsi untuk memekatkan DNA serta menghilangkan residu kloroform. DNA yang bercampur dengan etanol absolut nantinya menggumpal dan terbentuk pelet. Pemberian etanol absolut dingin akan berguna dalam menurunkan aktivitas molekul air (Surzycki, 2000). Etanol/isopropanol berguna dalam menghilangkan H₂O di sekitar fosfat. Oleh karena itu, molekul DNA yang memiliki muatan netral akan mengendap menjadi pelet (Kumar dan Anandaraj, 2006). Garam amonium asetat yang ditambahkan akan menetralkan muatan negatif DNA. Muatan DNA yang telah netral akan menurunkan kelarutan DNA dalam air. Lapisan air yang masih mengandung kontaminan RNA dapat

dihilangkan oleh enzim RNase. Enzim RNase akan membantu mendenaturasi RNA (Clark dan Christopher, 2000).

2.3.2 Isolasi DNA Menggunakan Kit

Isolasi DNA bakteri menggunakan reagen kit vivantis memiliki prinsip, DNA yang berasal sampel nantinya berinteraksi dengan silika yang ada didalam kolom. Dengan penambahan larutan garam dengan konsentrasi tinggi akan menyebabkan DNA terikat pada silika sehingga tidak mudah terlarut pada saat pencucian maupun sentrifugasi. Penggunaan kit dalam metode isolasi DNA tidak membutuhkan pengendapan DNA menggunakan pelarut organik sehingga lebih aman dan efisien. Terdapat empat tahapan yang diperlukan untuk isolasi DNA metode kit *di antaranya* lisis, pengikatan, pencucian, dan elusi (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 (Gill dkk., 2016) lisozim berfungsi untuk memecah dinding sel bakteri dengan memecah peptidoglikan sehingga mampu menembus serta merusak dinding sel bakteri karena mampu berinteraksi dengan lapisan membran luar dari dinding sel kemudian akan melekat pada lipopolisakarida. Lisozim akan memutus ikatan β 1-4 karbon heteropolymer *N-acetylglucosamine* serta ikatan karbon heteropolymer milik *N-Acetylmuramic acid* yang terdapat di lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri.

Proses pemisahan molekul DNA dari pengotor lainnya dilakukan dengan cara menambahkan *buffer* R2 dan RNase. Penambahan *buffer* R2 berfungsi untuk mendenaturasi protein yang ada di dalam sel dan untuk RNA akan didegradasi

oleh enzim RNase. Campuran kedua reagen dengan adanya temperatur yang tinggi menghasilkan pelet yang kemudian dihomogenisasi menggunakan *buffer* BG dan etanol.

Penambahan *buffer* BG sebagai *chaotropic agent* akan meningkatkan denaturasi makromolekul karena kadar garamnya yang tinggi. Dalam artikel yang telah dipublikasikan oleh (Lipfert dkk., 2014) lingkungan dengan konsentrasi garam yang tinggi akan menyebabkan DNA yang memiliki muatan negatif akan terikat di dalam silika berdasarkan prinsip *anion exchange*. Komponen pengotor lainnya seperti protein, RNA, maupun komponen lainnya akan melewati membran silika sehingga DNA dapat terpisah dari pengotornya.

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 dielusi dengan menggunakan *elution buffer* yang mempunyai kekuatan ionik rendah. Hal ini yang menyebabkan DNA mampu terelusi dari membran silika.

2.4 Gen Penanda 16S rRNA

Gen 16s rRNA merupakan metode identifikasi molekuler yang telah melampaui tahapan karakterisasi. Penggunaan 16S rRNA merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Selain cara yang relatif mudah, waktu yang singkat, teknik keberhasilan atau ketepatan dari metode ini juga menunjukkan hasil yang tinggi. Untuk sekuensing, gen yang

digunakan dapat berupa gen penuh sepanjang 1500 bp maupun gen sebagian (lebih kurang 500 bp) di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan hypervariable region (Noer, 2021). Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi hypervariable region, dengan demikian akan diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut.

Gen 16S rRNA memiliki kawasan beragam serta konservatif yang bermacam. Urutan basa yang terletak pada daerah konservatif. Kawasan konservatif digunakan untuk membangun konstruksi pohon filogenik sedangkan pada daerah variatif digunakan untuk menentukan keragaman serta tipe antar spesies yang belum dikenal. Sebagian besar prokariota memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S, 16S dan 23S. Penggunaan 5S rRNA sebenarnya juga bisa dipelajari namun gen ini terlalu pendek rantai basa nitrogennya sehingga tidak dimungkinkan untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 23S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Namun pada 23S rRNA memiliki struktur molekul tersier dan sekunder yang terlalu kompleks dan panjang, karena hal ini menjadikan analisis dengan 23S jarang digunakan.

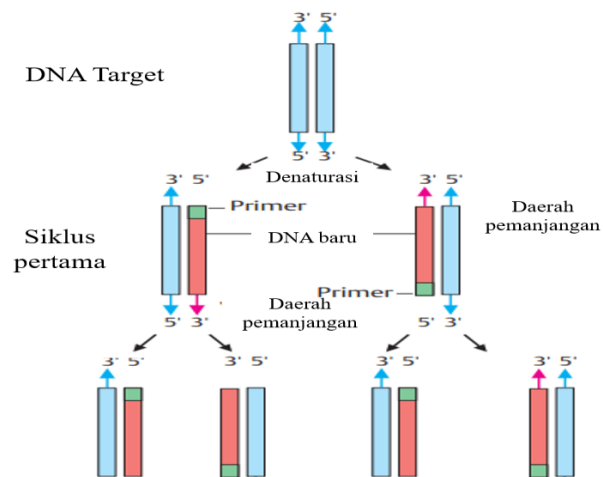
2.5 Amplifikasi DNA dengan PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode yang bisa digunakan untuk mendeteksi adanya polimorfisme pada suatu gen. PCR merupakan metode molekuler yang digunakan untuk menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang sangat singkat. Penggandaan

tersebut tidak terlepas dari penggunaan enzim dan sepasang primer bersifat spesifik terhadap DNA target yang akan dilipat gandakan (Joko dkk., 2011).

Proses PCR memerlukan templat DNA, nukleotida, DNA polimerase, 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 nantinya digunakan sebagai kerangka pembangun polinukleotida pada proses PCR dengan bantuan enzim polimerase. Sedangkan primer yaitu fragmen DNA dengan ukuran pendek yang nantinya akan melengkapi basa nitrogen yang dimiliki oleh DNA target (Lolodatu, dkk., 2018).

Metode konvensional memperbanyak DNA dengan PCR terdiri dari tiga langkah/step yang diulang untuk suatu siklus tertentu yaitu (1) denaturasi cetakan/template DNA pada suhu 94-95°C, (2) *annealing*/penempelan primer-primer pada segmen tertentu DNA menggunakan suhu spesifik (suhu spesifik ini didapatkan dari nilai $-T_m$ (*melting temperature*) primer dikurangi 5°C) di mana fragmen DNA akan diperbanyak, dan (3) polimerasi pada suhu 72°C yaitu suhu optimal enzim untuk memanjangkan primer-primer yang sudah menempel tadi. Adapun waktu yang dibutuhkan untuk berpindah dari satu langkah ke langkah selanjutnya dalam satu kali siklus PCR adalah bergantung pada mesin PCR tetapi secara umum durasi denaturasi biasanya paling lama 30 detik (Ratno, 2015).

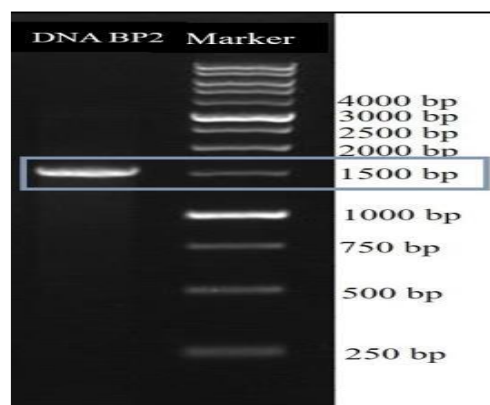


Gambar 2.1 Proses terjadinya PCR pada DNA (Passarge, 2007)

2.7 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis adalah teknik pemisahan yang menggunakan medan listrik. Diproduksi oleh elektroda untuk memisahkan senyawa bermuatan dalam bentuk Kation atau anion. Elektroforesis membutuhkan media pemisahan fase diam seperti sel agarosa. Itu dicampur dengan buffer untuk menjaga keasaman sampel selama proses pemisahan. Proses pemisahan menggunakan gel agarosa adalah adanya arus listrik yang memfasilitasi pergerakan molekul DNA melalui matriks gel, seperti halnya pergerakan DNA berdasarkan berat, ukuran, dan muatan molekul. Molekul DNA berukuran kecil bergerak lebih cepat daripada molekul berukuran besar, seperti yang ditunjukkan oleh pita yang terbentuk selama pemisahan. Berdasarkan Gambar 2.2 dihasilkan hasil elektroforegram dari bakteri *Bacillus subtilis* dari gambar tersebut bisa diketahui berat molekul yang dihasilkan isolat bakteri hasil isolasi dengan marker menunjukkan kemiripan yaitu berada di daerah 1500 bp. Sehingga dapat dipahami bahwa hasil isolat DNA *Bacillus*

subtilis tergolong mempunyai kemurnian yang tinggi (Ridwan, 2018; Rozaq, 2020).



Gambar 2.2 Hasil elektroforegram yang terbentuk setelah proses isolasi DNA (Rozaq, 2020)

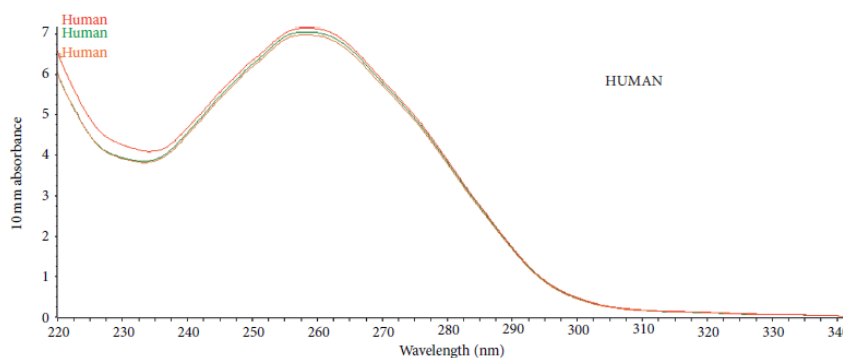
Elektroforesis mencakup beberapa komponen kunci dalam penggunaannya. Yang pertama merupakan larutan elektrolit yang berfungsi sebagai komponen pembawa. Biasanya dalam bentuk larutan buffer memiliki pH tertentu tergantung pada karakteristik senyawa yang akan dipisahkan. Kemudian media pemisahan adalah tempat proses pemisahan berlangsung. Media pemisah berupa kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat), gel pati, gel poliakrilamida, busa poliuretan atau agar. Hal terpenting berikutnya adalah elektroda berfungsi sebagai hubungan arus ke media pemisah dan baterai atau arus sebagai sumbernya energi (sumber) dalam berbagai alat (Ridwan, 2018).

2.8 Uji Kuantitatif DNA

NanoDrop[®] ND-1000 adalah alat spektrofotometer yang digunakan untuk alat alat yang memiliki prinsip menghitung perbedaan penyerapan cahaya berupa sinar UV di mana pita ganda DNA nantinya akan menyerap cahaya UV pada

panjang gelombang 260 nm sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm.

Kemurnian DNA dan RNA diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Absorbansi pada panjang gelombang tersebut telah digunakan mengukur kemurnian asam nukleat dan protein. Kemurnian $\sim 1,8$ adalah kemurnian DNA sedangkan $\sim 2,0$ adalah kemurnian RNA. Absorbansi juga dapat dilihat pada panjang 230 nm untuk mengetahui kontaminasi. Oleh karena itu, rasio A_{260}/A_{230} juga sering dianalisis. Kontaminasi bahan kimia dari ekstraksi asam nukleat, memungkinkan menghasilkan konsentrasi asam nukleat yang sangat tinggi yang dapat mempengaruhi proses analisis (ThermoScientific, 2011). Menurut (Sambrook dan Russel., 2001) hasil dari isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A_{260}/A_{280} adalah antara 1,8 sampai 2,0. Jika nilai rasio A_{260}/A_{280} kurang dari 1,8, maka hal ini menunjukkan bahwa isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio A_{260}/A_{280} lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya.



Gambar 2.3 Spektra NanoDrop[®] ND-1000 (García-Alegría dkk., 2020)

Berdasarkan hasil spektra bisa diketahui sampel terkontaminasi oleh protein atau reagen seperti fenol atau ada kesalahan saat pengukuran. Selain didapatkan spektra nantinya juga bisa diketahui nilai absorbansi yang mana Kemurnian DNA nantinya bisa diukur dengan rasio absorbansi terhadap panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

2.9 Analisis Data

Sekuensing DNA merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies secara lebih akurat, cepat, dan lengkap, sekuensing DNA merupakan penentuan urutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA (Lokapirnasari dkk., 2017). Proses sekuensing ini menggunakan daerah gen yang pendek serta terstandart yang digunakan sebagai standar internal sehingga memudahkan dalam penentuan taksonomi spesies yang disebut dengan DNA berkode. Prinsip DNA berkode yaitu penentuan sekuen DNA dengan memilih sekuen yang mempunyai ukuran pendek yang berasal dari standar genom spesies yang diteliti. Berkode spesies yang tidak diketahui nantinya akan dibandingkan dengan berkode yang telah diketahui melalui pustaka yang telah ada (Rangkuti dkk., 2021). Jika perbandingan sekuen spesies yang diteliti sama dengan sekuen berkode yang ada dalam pustaka maka identifikasi specimen disesuaikan dengan yang telah ada dalam pustaka. Sebaliknya, apabila sekuen spesies tidak tersedia dalam pustaka maka, spesies tersebut merupakan sekuen untuk spesies yang baru

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, aksesori,

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 berkode, di mana sekuen tersebut merupakan ciri khas dari spesies tersebut sehingga dapat diketahui homologi dan spesies bakteri. Data hasil penyejajaran kemudian diaplikasikan dalam pembuatan pohon filogenetik. Pohon filogenetik (Gambar 2.4) adalah ilustrasi evolusi yang terjadi pada makhluk hidup yang mempunyai nenek moyang yang sama (Mar dkk., 2020).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus 2022 sampai dengan Februari 2023. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Mikrobiologi, dan Genetika Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dibutuhkan seperangkat peralatan gelas, oven, dan neraca analitik. jarum ose, seperangkat peralatan gelas, neraca analitik, cawan petri, tabung mikro 1,5 mL, vortex (Maxi Mix II), hot plate, shaker, dan inkubator (Thermoscientific), preparat kaca objektif, mikroskop, bunsen, dan pipet tetes. *autoclave*, tip mikropipet, *centrifuge*, *collection tube*, minispin kolom, dan mikropipet. seperangkat peralatan elektroforesis, spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), lampu UV Transluminator, dan seperangkat alat PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian KIT isolasi DNA, buffer CTAB 5%; Tris HCl 100 mM; NaCl 1,4 M, EDTA 20mM pH 8; kloroform, fenol, isoamilalkohol, buffer TE 1 M, RNase, etanol absolut dingin, etanol 70%, agarosa, buffer TBE, akuades, kristal violet (*Hexamethylenepararosanilinechloride*), iodin, safranin, alkohol 70%, kapas, dan

aluminum foil. media *nutrien broth* (NB), *nutrient agar* (NA), H₂O₂ 3%, PCR master mix, Forward primer, Reverse primer, ETBR.

3.3 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahapan *di antaranya*;

1. Peremajaan Bakteri
2. Uji Morfologi
3. Uji biokimia Bakteri Pendegradasi Plastik
4. Isolasi DNA
5. Amplifikasi gen 16S rDNA dengan PCR
6. Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa
7. Uji Kuantitatif Dengan Nanodrop
8. Analisis Data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri diperbanyak dengan cara ditumbuhkan pada media *nutrient agar* (NA) miring dengan metode *streak* dan diinkubasi pada suhu ruang selama \pm 24 jam. Selanjutnya mikroba-mikroba yang tumbuh tersebut dapat digunakan dalam penelitian atau digunakan sebagai stok bakteri uji. Stok bakteri uji disimpan dalam lemari es dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Pengamatan Morfologi (Firdausi dkk., 2016)

Kultur bakteri hasil peremajaan diamati morfologinya meliputi permukaan koloni bakteri (halus atau kasar), elevasi, tepi koloni. Pengamatan morfologi sering disebut juga sebagai pengamatan makroskopis atau pengamatan yang bisa dilakukan dengan mata telanjang.

3.4.3 Uji Biokimia Bakteri

3.4.3.1 Pewarnaan Gram (Nurhidayati, dkk., 2015)

Perlakuan dalam pewarnaan Gram bakteri yaitu ditambahkan 2 tetes akuades steril di atas kaca preparat. Diambil satu ose koloni bakteri dan diinokulasikan dalam kaca preparat. Dipanaskan kaca preparat di atas api bunsen secara cepat dan hati-hati hingga tidak ada akuades yang tersisa. Selanjutnya, sebanyak satu tetes kristal violet diteteskan pada kaca preparat dan diinkubasi selama satu menit. Kaca preparat dicuci dengan akuades steril dan dikeringkan. Kemudian ditambahkan dua tetes larutan iodin dan didiamkan selama dua menit. Setelah dua menit, ditetesi dengan alkohol 95%, didiamkan selama satu menit, dan dicuci dengan menggunakan akuades steril. Larutan safranin ditambahkan sebanyak dua tetes, didiamkan satu menit, dicuci kembali dengan akuades, dan dikeringkan.

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 isolat bakteri termasuk dalam kelompok gram negatif. Hasil pengamatan difoto dan dicatat bentuk koloni sel bakteri.

3.4.3.2 Uji Katalase (Hayati dkk., 2019)

Gelas objek yang telah dibersihkan ditetesi beberapa tetes larutan H₂O₂ 3%. Satu ose biakan bakteri yang berumur 24 jam diletakkan di dalam tetesan H₂O₂ tersebut. Reaksi dinyatakan positif jika timbul gelembung-gelembung udara.

3.4.3.3 Uji Menggunakan *Microbact* (Oxoid, 2004)

Suspense bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah dinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *patient record*. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Nama bakteri dilihat dengan kompeten berdasarkan angka oktal yang didapat.

3.4.4 Isolasi DNA dengan Metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* CTAB (Fitriya dkk., 2015)

Kultur bakteri sebanyak 3 µL disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C dan diambil pelet. Pelet ditambahkan 567 µL buffer TE pH 8, 30 µL SDS 10% dan 3 µL NH₄COOH 5 M kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, ditambahkan dengan NaCl 5 M dan buffer CTAB 2% kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C

Suspensi ditambahkan dengan kloroform : isoamil alkohol (24 : 1) sebanding dengan volume sampel (1 : 1). Kemudian hasil disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit diambil supernatan. Supernatan dipindahkan dalam tabung mikro baru dan ditambahkan phenol : kloroform : isoamil alkohol (25 : 24 :1) dan disentrifugasi kembali. Pelet ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 kali volume sampel dan ditambahkan 50 μ L etanol 70% dingin. Sampel disentrifugasi dan diresuspensi dengan 100 μ L buffer TE, kemudian sampel disimpan pada suhu -20 °C.

3.4.5 Isolasi DNA dengan Metode Key Integrated Test (KIT)

Kultur bakteri yang telah berhasil diinkubasi selama 24 jam diambil 1 sampai 3 mL, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, ditambahkan 100 μ L buffer R1 ke dalam mikrotube dan diresuspensi dengan diaduk menggunakan mikropipet. Ditambahkan 20 μ L lisozim ke dalam suspensi dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit.

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

Sampel dari tabung sentrifugasi kemudian dipindahkan ke dalam kolom sebanyak 650 μL dan disentrifugasi selama 15 menit dengan 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 microtube baru untuk disimpan di suhu 4 °C.

3.4.6 Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (Ayyaz dkk., 2016)

Amplifikasi gen 16rDNA dilakukan dengan metode PCR. Pembuatan PCR dilakukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Asmawati (2016) 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. Total volume reagen yang digunakan sebesar 20 μL . Pasangan primer yang dibutuhkan dalam proses PCR yaitu 27F (5'-AGAGTTTGACA TGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGA-3').

Tahapan amplifikasi dilakukan dengan pengulangan sebanyak 35 kali siklus. Setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus pada 94°C selama 1 menit, 54°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit, dan ekstensi akhir selama 10 menit pada 72°C. Hasil output amplifikasi DNA kemudian disekuensing dengan menggunakan metode *deoxynucleotide chain termination* Sanger.

3.4.7 Uji Kuantitatif DNA (ThermoScientific, 2011)

Kuantifikasi DNA dilakukan menggunakan NanoDrop® *Spectrophotometer* ND-1000. Templat DNA diambil 1 μ L dibaca pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian DNA didapat dari perbandingan absorbansi 260/280. Standar kemurnian DNA memasuki *range* 1,8–2,0.

3.4.8 Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa (Annisaqois dkk., 2018)

Prosedur pembuatan gel agarosa dilakukan dengan menimbang 0,4 g agarosa kemudian ditambahkan buffer 1xTAE. Buffer ini mengandung 0,5 M EDTA pH 8,0 dengan volume larutan akhir 40 ml (1% b/v). Larutan kemudian dipanaskan dengan microwave sampai agarosa benar-benar larut. Larutan gel agarosa terlarut dibentuk pada dasar gel dengan sisir untuk membentuk sumur 1 cm dan ditambahkan 0,5 μ L larutan etidium bromida. Selanjutnya gel dibiarkan memadat selama 1 jam. Setelah memadat, sisir yang ada di dalam cetakan dilepas secara perlahan untuk kemudian dimasukkan ke dalam sel elektroforesis.

Sel elektroforesis diisi dengan buffer 1xTAE sampai gel agarosa terendam dalam buffer. Selanjutnya, sampel 10 μ L dipipet dan ditambahkan ke dalam sumur. Prosedur elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 60 volt selama 1 jam. Gel hasil elektroforesis diamati di bawah sinar UV untuk mengamati pita yang terbentuk.

3.4.9 Analisis Data (Ihsan dkk., 2020; S. Kumar dkk., 2018; Roslim , 2021)

Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa dan divisualisasi dengan sinar UV. Untuk melihat spesies bakteri, maka hasil amplifikasi dilakukan proses sikuensing. Hasil dari sikuensing DNA nantinya disusun dengan menggunakan aplikasi Bioedit. Selanjutnya, dilakukan analisis urutan keasaman pasangan basa nitrogen sikuen dengan menggunakan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>). Sedangkan untuk bisa mengetahui jenis bakteri dan juga hubungan famili antar bakteri dibuat pohon filogenetik dengan menggunakan bantuan *software* MEGAX.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil isolasi DNA paling baik mendekati standar adalah metode KIT dengan nilai absorbansi $A_{260/280}$ sebesar 1,72 dengan konsentrasi sebesar 125,06 ng/uL, sedangkan untuk metode CTAB didapatkan nilai absorbansi $A_{260/280}$ sebesar 1,56 dengan konsentrasi 53,74 ng/uL.
2. Hasil identifikasi bakteri berdasarkan genotip menggunakan daerah gen 16S rRNA menunjukkan adanya korelasi kedekatan materi genetik serta bentuk fisik bakteri BP dengan bakteri jenis *Bacillus subtilis* dengan nilai kedekatan berdasarkan uji genotip sebesar 98%.

5.2 Saran

Perlu dilakukan optimasi terkait isolasi DNA menggunakan metode CTAB ada beberapa langkah yang harus disesuaikan seperti variasi konsentrasi CTAB, SDS ataupun perlunya penambahan proteinase-K.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. 2017. *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize*. *Plant Methods*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. Di. T., & Krieger, M. A. 2017. *Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics*. In *BioMed Research International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y. A.-G., Koutra, E., Metwally, M. A., Kornaros, M., & Sun, J. 2021. *Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects*. *Science of The Total Environment*, 780, 146590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- Al-Mahally, Imam Jalaluddin, & Imam Jalaluddin As-suyutti. 1990. *Tafsir Jalalain Berikut Asbab An-nujulnya* (Jilid II). Sinar Baru.
- Alvarado, P., Molina, R., Xóchihua, J., & Hernández, J. 2017. *Fast and reliable DNA extraction protocol for identification of species in raw and processed meat products sold on the commercial market*. *Open Agriculture*, 2. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0051>
- Annisaqois, M., Gerung, G. S., Wullur, S., Sumilat, D. A., Wagey, B. T., & Mandagi, S. v. 2018. *Analisis Molekuler Dna Alga Merah (Rhodophyta) Kappaphycus Sp. (Molecular Analysis Of Dna Red Algae (Rhodophyta) Kappaphycus Sp.)*. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 1(1), 107–112.
- Arista, A. M., Yuliani, & Lisa, L. 2018. *Identifikasi Isolat Bakteri Endofit A1 dan B1 dari Akar Tanaman Ubi Jalar Berdasarkan Sekuens 16S rDNA Identification Isolate Endophytic Bacteria A1 and B1 from Sweet Potatoe's Root Based On 16S rDNA*. *LeteraBio*, 7(1), 9–14. <http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio>
- Ayyaz, K., Zaheer, A., Rasul, G., & Mirza, M. S. 2016. *Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.035>
- Bhardwaj. 2012. *Microbial Population Associated With Plastic Degradation*. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.272>
- Bisen, P. S. 2014. *Laboratory protocols: In applied life sciences*. In *Laboratory Protocols in Applied Life Sciences*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16575>
- Budiarto. 2015. *Polymerase Chain Reaction (Pcr) : Perkembangan Dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan*. *BioTrends*, Vol.6(2), 29–38. <http://www.scienceguardian.com/blog/a->
- Cappuccino, J. G., & N. Sherman. 2014. *Microbiology a laboratory manual* (10th ed.). Pearson EducationInc, Publishing as Benjamin Cummings cite.

- Christy Sabbathini, G., Pujiyanto, S., & Puspita Lisdiyanti, dan. 2017. *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Genus Sphingomonas Dari Daun Padi (Oryza Sativa) Di Area Persawahan Cibinong*. In *Jurnal Biologi* (Vol. 6, Issue 1).
- Clark, W., & Christopher, K. 2000a. *An introduction to DNA: Apectrophotometry, degradation, and the "Frankengel" experiment. Pages 81-99, in Tested studies for laboratory teaching*" (Vol. 22). ABLE. <http://www.zoo.utoronto.ca/ablepages.-> Copyrightpolicy:<http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/copyright.htm>
- Clark, W., & Christopher, K. 2000b. *An introduction to DNA: Apectrophotometry, degradation, and the "Frankengel" experiment. Pages 81-99, in Tested studies for laboratory teaching*" (Vol. 22). ABLE. <http://www.zoo.utoronto.ca/ablepages.-> Copyrightpolicy:<http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/copyright.htm>
- Davies, J. A., Anderson, G. K., Beveridge, T. J., & Clark, H. C. 1983. *Chemical Mechanism of the Gram Stain and Synthesis of a New Electron-Opaque Marker for Electron Microscopy Which Replaces the Iodine Mordant of the Stain*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 156, Issue 2).
- Fitriya, R. T., Ibrahim, M., & Lisdiana, L. 2015. *Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada Staphylococcus aureus dan Shigella dysentriae The Effectiveness of Modified DNA Isolation Method of Kit and CTAB/NaCl ON Staphylococcus aureus and Shigella dysentriae*. *Lentera Bio*, 4(1), 87–92. <http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio>
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Corella-Madueño, M. A. G., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-Garcia, H. 2020. *Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- Ghosh, K., Ray, A. K., & Sen, S. K. 2002. *Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, labeo rohita, fingerlings and its significance in digestion*. *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 33–42. https://doi.org/10.1300/J028v12n03_04
- Gill, C., van de Wijgert, J. H. H. M., Blow, F., & Darby, A. C. 2016. *Evaluation of lysis methods for the extraction of bacterial DNA for analysis of the vaginal microbiota*. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163148>
- Hadioetomo, R. S. 1999. *Mikrobiologi dasar dalam Praktik: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hariyadi, S., Erlia Narulita, & M. Amien Rais. 2018. *Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. *Proceeding Biology Education Conference*, 15(1), 689–692.
- Hayati, L. N., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Chusniati, S., Yunita, M. N., & Wibawati, P. A. 2019. *Isolasi dan Identifikasi Staphylococcus aureus pada Susu Kambing Peranakan Etawah Penderita Mastitis Subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi*. *Jurnal Medik Veteriner*, 2(2), 76. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol2.iss2.2019.76-82>

- Hikmawati, F., Susilowati, A., & Setyaningsih, R. 2019. *Colony morphology and molecular identification of Vibrio spp. On green mussels (Perna Viridis) in Yogyakarta, Indonesia tourism beach areas. Biodiversitas, 20(10), 2891–2899.* <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201015>
- Ihsan, Y. N., Fellatami, K., Permana, R., Mulyani, Y., & Pribadi, T. D. K. 2020. *ANALISIS BAKTERI PEREDUKSI KONSENTRASI LOGAM TIMBAL Pb(CH₃COO)₂ MENGGUNAKAN GEN 16S Rrna. Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology, 13(2), 151–162.* <https://doi.org/10.21107/jk.v13i2.7285>
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. 2017. *A review on macroscale and microscale cell lysis methods.* In *Micromachines* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. 2007. *16S Rrna Gene Sequencing For Bacterial Identification In The Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, And Pitfalls.* In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 45, Issue 9, pp. 2761–2764). <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jeon, J. M., Park, S. J., Choi, T. R., Park, J. H., Yang, Y. H., & Yoon, J. J. 2021. *Biodegradation of polyethylene and polypropylene by Lysinibacillus species JJY0216 isolated from soil grove. Polymer Degradation and Stability, 191.* <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662>
- Jha, S. S., Joshi, S. J., & Geetha, S. J. 2016. *Lipopeptide production by Bacillus subtilis R1 and its possible applications. Brazilian Journal of Microbiology, 47(4), 955–964.* <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.006>
- Joko, T., Kusumandari, N., & Hartono, S. 2011. *Optimasi Metode PCR untuk Deteksi Pectobacterium carotovorum, Penyebab Penyakit Busuk Lunak Anggrek.* In *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.22146/jpti.9813>
- Kumar, A., & Anandaraj, M. 2006. *Method for isolation of soil DNA and PCR based detection of ginger wilt pathogen, Ralstoniasolanacearum. Ind. Phytopathol. 59, 59(2), 154–160.*
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. 2018. *MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547–1549.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumar Shrestha, J., Raj Joshi, D., Regmi, P., Badahit, G., & Author, C. 2019. *Isolation And Identification Of Low Density Polyethylene (LDPE) Degrading Bacillus Spp. From A Soil Of Landfill Site* (Vol. 2).
- Li, J., Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., & Kim, D. H. 2020. *Rapid biodegradation of polyphenylene sulfide plastic beads by Pseudomonas sp. Science of the Total Environment, 720.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137616>
- Lichtenberg, D., Ahyayauch, H., & Goñi, F. M. 2013. *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers.* In *Biophysical Journal* (Vol. 105, Issue 2, pp. 289–299). Biophysical Society. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.06.007>

- Lipfert, J., Doniach, S., Das, R., & Herschlag, D. 2014. *Understanding nucleic acid-ion interactions*. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 83, pp. 813–841). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092720>
- Lokapirnasari, W., Sahidu, A., Nurhajati, T., Supranianondo, S., & Yulianto, A. 2017. *Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole (SEQUENCING OF 16S DNA OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM BOVINE RUMEN FLUID WASTE ONGOLE CROSSBREED)*. *Jurnal Veteriner*, 18(1), 76–82. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.1.76>
- Lolodatu, H., Johannes, E., & Agus dan Arfan Sabran, R. 2018. *Profil Dna Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (Fshr) Pada Wanita Akne Dengan Teknik Pcr Dan Sekuensing Dna, Dna Profile Of Follicle Stimulating Hormone Receptor (Fshr) Gene In Women Acne By Using Pcr Technique And Dna Sequencing*. *BIOMA : Jurnal Biologi Makassar*, 3(1), 1–11.
- Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. 2018. *Isolation, identification and characterization of novel bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 427–433. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0572>
- Mahbub, S., Rahman, M., Rana, S., Rub, M. A., Hoque, M. A., Khan, M. A., & Asiri, A. M. 2019. *Aggregation Behavior of Sodium Dodecyl Sulfate and Cetyltrimethylammonium Bromide Mixtures in Aqueous/Chitosan Solution at Various Temperatures: An Experimental and Theoretical Approach*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22(1), 137–152. <https://doi.org/10.1002/jsde.12202>
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. 2016. *Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Maity, S., Banerjee, S., Biswas, C., Guchhait, R., Chatterjee, A., & Pramanick, K. 2021. *Functional interplay between plastic polymers and microbes: a comprehensive review*. In *Biodegradation* (Vol. 32, Issue 5, pp. 487–510). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09954-x>
- Mar, W. W., Rohman, A., Muwafiqi, N. H., Laras, G. A., Agustina, D., Asmarani, O., & Puspaningsih, N. N. T. 2020. *Short communication: Preliminary phylogenetic analysis of bacteria producing laccase isolated from Gunung pancar, Bogor, Indonesia*. *Biodiversitas*, 21(5), 2113–2118. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210539>
- Mardhiah Batubara, U., Susilawati, I. O., Riany, H., Program, S., Biologi, F., Sains, D., Teknologi, U., Jambi, J., Masak, K. P., Raya, J., Bulian, J.-M., & Darat, M. 2015. *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Indigenous Tanah Di Kawasan Kampus Universitas Jambi Isolation And Characterization Of Indigenous Soil Bacteria In Campus Area Of Jambi University*.
- Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., & Mori, N. 2021. *Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review*. In *Science of the Total Environment* (Vol. 752). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141959>

- Mohammadi, S., Esfahani, B., Moghim, S., Mirhendi, H., Zaniani, F., Safaei, H., Fazeli, H., & Salehi, M. 2017. *Optimal DNA Isolation Method for Detection of Nontuberculous Mycobacteria by Polymerase Chain Reaction*. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 133. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.217216>
- Murtiyaningsih, H. 2017. *Isolasi DNA Genom Dan Identifikasi Kekerabatan Genetik Nanas Menggunakan Rpd. Agritrop*, 15(1), 83–93. <http://jurnal.unmuhjember.ac.id/>
- Noer, S. 2021. *Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA*. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1–6. www.alimetrics.net
- Nurhidayati, S., Faturrahman, & Ghazali, M. 2015. *Deteksi Bakteri Patogen Yang Berasosiasi Dengan Kappaphycus Alvarezii (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice*. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, 1(2).
- Nurkanto, A., & Agusta, A. 2015. *Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo-Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba*. *Jurnal Biologi Indonesia*, 11(2), 195–203.
- Oppert, B., Stoss, S., Monk, A., & Smith, T. 2019. *Optimized extraction of insect genomic dna for long-read sequencing*. *Methods and Protocols*, 2(4), 1–7. <https://doi.org/10.3390/mps2040089>
- Oren, A. 2004. *A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code*. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 54, Issue 5, pp. 1895–1902). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03008-0>
- Passarge, E. 2007. *Color Atlas of Genetics* (3rd ed.). Institute of Human Genetics, University Hospital Essen. Thieme.
- Patrao, S., Acharya, A., Suvarna, N., & Sequeira, M. 2012. *Degradation of Anionic Surfactants by Bacillus subtilis and Bacillus cereus*. In *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)* (Vol. 3, Issue 1). www.iosrjournals.org
- Pelczar, M. J. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi* (1st ed.). Universitas Indonesia (UI-Press).
- pukhrambang, N. 2019. *Comparison of original gram stain and its modification in the gingival plaque samples*. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 7(1), 1–3. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2019.07.00231>
- Qi, X., Liu, Y., Zhang, M., Gao, B., & Li, C. 2017. *Effects of ionic surfactants on the aggregate stability and water repellency of silt loam soil*. *Journal of Soils and Sediments*, 17(10), 2438–2448. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1686-4>
- Rangkuti, B., Arida Susilowati, Ulfa Juniarti Siregar, Laswi Irmayanti, & Iskandar Zulkarnain Siregar. 2021. *DNA Barcoding of Rattan (Arecaceae) From Gunung Walat Education Forest, Sukabumi-West Java*. *Journal of Sylva Indonesiana*, 4(01), 45–53. <https://doi.org/10.32734/jsi.v4i01.5563>

- Ridwan Harahap, M. 2018. *Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21–26.
- Rohmah, N., Muslihatin, W., & Nurhidayati, T. 2016. *Pengaruh Kombinasi Media Pembawa Pupuk Hayati Bakteri Penambat Nitrogen Terhadap pH dan Unsur Hara Nitrogen dalam Tanah. Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 4(1), 44–46. http://ejournal.its.ac.id/index.php/sains_seni/article/view/20634
- Roslim, D. I., & Fitriani, A. 2021. *Barkoding DNA pada Tumbuhan Durik-Durik (Syzygium sp.) Asal Riau Menggunakan Daerah Gen ndhF. JURNAL BIOS LOGOS*, 11(1), 41. <https://doi.org/10.35799/jbl.11.1.2021.31191>
- Rozaq, H. N. 2020. *Uji Aktivitas Dan Identifikasi Genotip 16s Rrna Bakteri Pendegradasi Plastik Ldpe Hasil Isolasi Dari Tpa Pisang Kipas Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Sambrook, J., & Russel. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shi, R., Lewis, R. S., & Panthee, D. R. 2018. *Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203011>
- Singh, U. A., Kumari, M., & Iyengar, S. 2018. *Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. Biological Procedures Online*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>
- Skariyachan, S., Manjunath, M., Shankar, A., Bachappanavar, N., & Patil, A. A. 2019. *Application of Novel Microbial Consortia for Environmental Site Remediation and Hazardous Waste Management Toward Low- and High-Density Polyethylene and Prioritizing the Cost-Effective, Eco-friendly, and Sustainable Biotechnological Intervention. In Handbook of Environmental Materials Management (pp. 431–478)*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73645-7_9
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag.
- Switzer, R. L., & Liam F. Garrity. 1999. *Experimental Biochemistry: [Theory And Exercises In Fundamental Methods]* (15th ed.). Freeman.
- Trijuliamos Manalu, R. 2017. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Asal Indonesia. Sainstech Farma*, 10(2).
- Volk, W. A., & Margaret F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1* (5th ed.). Erlangga. .
- Wijayati, N., Astutiningsih, C., & Mulyati, S. 2014. *Transformation α -Pinena by Bacteri Pseudomonas aeruginosa ATCC 25923. Biosaintifika*, 6(1). <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifikaTransformasia-PinenadenganBakteriPseudomonasaeruginosaATCC25923>
- Windusari, Y., Setiawan, A., Hanum, L., Adriansyah, F., & Ali Mubarak, A. 2018. *Comparison of CTAB Method and Wizard Genomic DNA Purification System Kit from Promega on DNA Isolation of Local Varieties of Rice of South Sumatera*

- Biodiversity of Fauna Database for South Sumatra View project Science & Technology Indonesia Comparison Of CTAB Method And Wizard Genomic Dna Purification System Kit From Promega On DNA Isolation Of Local Varieties Of Rice Of South Su-matera. Sci. Technol. Indonesia, 3, 26–29.*
<https://doi.org/10.26554/sti.2018.3.1.26-29>
- Yao, Z., Seong, H. J., & Jang, Y. S. 2022. *Degradation of low density polyethylene by Bacillus species. Applied Biological Chemistry, 65(1).*
<https://doi.org/10.1186/s13765-022-00753-3>
- Yohandini, H., Julinar, & Muharni. 2015. *Isolation and Phylogenetic Analysis of Thermophile Community Within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. HAYATI Journal of Biosciences, 22(3), 143–148.*
<https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.006>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. 2016. *A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). 251(6278), 1196–1199.*
<http://science.sciencemag.org/>
- Yuwono, T. 2008. *Biologi Molekuler*. Erlangga.
- Zhang, C., Song, W., Ma, H. R., Peng, X., Anderson, D. J., Fowler, V. G., Thaden, J. T., Xiao, M., & You, L. 2020. *Temporal encoding of bacterial identity and traits in growth dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(33), 20202–20210.*
<https://doi.org/10.1073/PNAS.2008807117>
- Zrimec, J., Kopinč, R., Rijavec, T., Zrimec, T., & Lapanje, A. 2013. *Band smearing of PCR amplified bacterial 16S rRNA genes: Dependence on initial PCR target diversity. Journal of Microbiological Methods, 95(2), 186–194.*
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.002>

