

Analisis Komunitas Bakteri Pada Sampah Plastik

*(Analysis Of Bacteria Community In The Plastic Waste)*Dhebbiy Purba¹, Veibe Warouw¹, Rizald M. Rompas¹, Deiske A. Sumilat¹, Reni L. Kreckhoff¹, Elvy Like Ginting^{1*}¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia.²Staf Pengajar Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia.* Corresponding Author: elvy_like@yahoo.com**Abstract**

Plastic waste is a general problem for the environment. Therefore, proper plastic waste management are required. One of the plastic waste management processes is by microbiological biodegradation using bacteria. This research aims was to identify the bacterial community from plastic waste, particularly in Polyethylene Terephthalate using molecular analysis. In order to identify the bacteria community, it is necessary to isolate the DNA of uncultured bacteria. In this research, isolation of uncultured bacteria DNA from plastic waste was carried out by following extraction procedure from Qiagen DNeasy® PowerSoil Pro Kit handbook. The DNA genome was subsequently examined using electrophoresis gel and UV-Vis spectrophotometer. The DNA genome was then amplified using Polymerase Chain Reaction and the bacteria were identified using Next Generation Sequencing (NGS) analysis. This study results showed that, the uncultured bacteria DNA from plastic waste was successfully isolated and amplified with purification value of 1. The amplified DNA genome was detected by DNA bands through gel electrophoresis gel at ~1500 bp. The bacteria found in the plastic waste were Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, Chlorobi, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi, Thaumarchaeuta and Gemmatimonadetes with Proteobacteria has the highest relative abundance.

Keywords: Bacteria, Deoxyribo Nucleic Acid (DNA), Plastic Waste, Uncultured

Abstrak

Sampah plastik merupakan masalah bagi lingkungan oleh sebab itu diperlukan pengelolaan yang baik. Salah satu pengelolaan sampah plastik yakni dengan cara biodegradasi secara mikrobiologi menggunakan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komunitas bakteri pada sampah plastik, khususnya jenis Polyethylene Terephthalate secara molekuler. Untuk analisis bakteri secara molekuler, diperlukan tahapan isolasi DNA bakteri. Pada penelitian ini isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik dilakukan dengan mengikuti prosedur ekstraksi DNeasy® PowerSoil Pro Kit, Qiagen dengan menggunakan proses pengikisan pada kedua permukaan plastik sebagai tahapan preparasi sampel. Hasil ekstraksi DNA selanjutnya diuji menggunakan elektroforesis gel dan spektrofotometer UV-Vis. Genom DNA kemudian diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dan bakteri diidentifikasi dengan *Next Generation Sequencing analysis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik berhasil diisolasi dan diamplifikasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA lewat hasil elektroforesis gel pada panjang 1500 bp. Bakteri yang terdapat pada plastik jenis PET adalah *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Thaumarchaeuta* dan *Gemmatimonadetes* dengan kelimpahan relatif tertinggi adalah *Proteobacteria*

Kata kunci: Bakteri, Deoxyribo Nucleic Acid (DNA), Sampah Plastik, Tanpa Kultivasi

PENDAHULUAN

Plastik merupakan bahan pengemas yang banyak digunakan. Sebagian besar barang yang dibutuhkan, mulai dari peralatan elektronik, perlengkapan rumah tangga, perlengkapan kantor sampai makanan dan minuman menggunakan plastik sebagai pengemas. Hal ini disebabkan karena sifat plastik yang ringan, kuat, mudah dibentuk, dan harganya terjangkau (Mahalik dan Nambiar, 2010). Menurut Syarief *et al.*, (1988), jenis material plastik yang sering digunakan adalah thermoplastic. Hal ini dikarenakan karena thermoplastic tidak mengalami perubahan bentuk susunan kimia saat dipanaskan. Dari berbagai jenis thermoplastic, yang sering digunakan dalam perindustrian ialah jenis PET (Polyethylene Terephthalate).

Penggunaan plastik yang cukup tinggi ini berdampak negatif terhadap kelestarian lingkungan (Tokiwa *et al.*, 2009), karena sulit terdegradasi sehingga akan terjadi penumpukan sampah plastik. Di Indonesia, sampah ini umumnya disebabkan oleh aktivitas antropogenik di darat kemudian masuk ke laut melalui sungai-sungai yang ada (Lebreton *et al.*, 2017) dan akan dapat mengubah kualitas perairan (Hetherington *et al.*, 2005). Marliani (2014) menyatakan bahwa sampah plastik yang ditemukan lebih banyak ialah sampah botol plastik yang dapat menimbulkan dampak negatif jika tidak dikelola dengan baik dan bagaimana pengelolaannya masih belum mendapat perhatian yang serius.

Pengolahan sampah plastik saat ini masih mengalami kesulitan. Salah satu solusi untuk menanganinya adalah dengan biodegradasi. Biodegradasi adalah proses dimana mikroorganisme mendegradasi atau memecah polimer alam (seperti lignin dan selulosa) dan polimer sintetik (seperti polietilen dan polistiren) (Kaseem M *et al.*, 2012). Mikroorganisme dapat mengurai sampah plastik, sehingga sampah plastik tersebut dapat diproduksi menjadi produk-produk yang bermanfaat.

Beberapa mikroorganisme yang diketahui dapat mendegradasi plastik

adalah bakteri dan fungi. Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang diketahui dapat membantu dalam proses degradasi sampah plastik dengan memanfaatkan enzim polimerase yang dimilikinya. Oleh sebab itu, jenis bakteri yang hidup pada sampah plastik perlu diteliti. Jenis bakteri tersebut nantinya dapat menjadi informasi yang penting dalam pemanfaatan pengelolaan sampah plastik.

Dalam mempelajari komunitas jenis bakteri secara molekuler, perlu dilakukan isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi. Oleh sebab itu perlu diketahui metode yang tepat dalam mengisolasi bakteri tanpa kultivasi dari plastik. Lewat penelitian ini berhasil diisolasi DNA bakteri tanpa kultivasi, yang selanjutnya dapat menentukan jenis dan komunitas bakteri pada sampah plastik.

METODOLOGI PENELITIAN

Sampel Plastik

Sampel plastik yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel plastik berbentuk botol. Sampel plastik tersebut teridentifikasi merupakan plastik jenis Polyethylene Terephthalate (PET). Sampel botol plastik diambil di Kawasan Mangrove, Pulau Bangka, Sulawesi Utara. Sampel plastik dimasukkan ke dalam plastik sampel dan dimasukkan ke dalam *cool box* berisi *dry ice*. Sampel tersebut dianalisa di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi.

Preparasi Sampel Plastik

Pengikisan Sampel Plastik Secara Langsung

Sampel plastik dipotong berukuran persegi. Gunakan *petri disk* sebagai wadah untuk melakukan pengikisan permukaan plastik di kedua sisi dengan menggunakan pisau steril sehingga mendapatkan lendir. DNA bakteri diisolasi dari lendir plastik tersebut menggunakan prosedur ekstraksi DNeasy® PowerSoil Pro Kit Qiagen.

Isolasi DNA Bakteri Tanpa Kultivasi

Isolasi DNA bakteri dari sampel plastik dilakukan secara aseptik. Ekstraksi

DNA menggunakan DNeasy® PowerSoil Pro Kit Qiagen dengan langkah-langkah sebagai berikut. PowerBead Pro Tube disentrifus terlebih dahulu dengan kecepatan 6000 rpm untuk memastikan bahwa manik-manik telah mengendap di bagian bawah. Tambahkan lendir plastik dengan 800 µl larutan CD1. Vortex agar semua tercampur sempurna. Letakkan PowerBead Pro Tube secara horizontal pada adaptor vortex selama 10 menit. Kemudian sentrifus PowerBead Pro Tube dengan kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Pindahkan supernatan ke tabung *microcentrifuge* 2 ml sebanyak 600 µl. Tambahkan 200 µl dari larutan CD2 dan vortex selama 5 detik. Kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 15.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Pindahkan 700 µl supernatan ke tabung *microcentrifuge* 2 ml yang baru. Tambahkan 600 µl larutan CD3 dan divortex selama 5 detik. Setelah itu, pindahkan 650 µl lisat ke tube saringan (MB Spin Column) dan sentrifus pada kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Buang supernatan (flow-through) dan ulangi langkah sebelumnya, dengan menambahkan lisat sehingga semua lisat telah tersaring (menggunakan *MB Spin Column*). Tempatkan debris (*MB Spin Column*) dengan hati-hati ke dalam tube (tube collection) 2 ml yang bersih (tersedia). Tambahkan 500 µl EA ke tube saringan (*MB Spin Column*) yang mengandung debris dari lisat. Setelah itu sentrifus *collection tube* pada kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Buang hasil saringan (flow-through) dan tempatkan debris (*MB Spin Column*) kembali ke dalam *collection tube* 2 ml yang baru. Tambahkan 500 µl larutan C5 pada debris (*MB Spin Column*). Sentrifus pada 15.000 x g selama 1 menit. Kemudian supernatan (flow-through) dibuang dan tempatkan debris (*MB Spin Column*) ke dalam *collection tube* 2 ml yang baru. Disentrifus kembali hingga 16.000 x g selama 2 menit. Tempatkan *MB Spin Column* dengan hati-hati ke dalam *elution tube* 1,5 ml yang baru. Tambahkan 50-100 µl larutan C6 ke dalam *elution tube* yang mengandung debris tersebut. Sentrifus kembali pada

15.000 x g selama 1 menit. Debris yang terjadi dibuang, dan supernatan yang mengandung DNA dikoleksi untuk diuji selanjutnya.

Isolasi DNA Bakteri Kultur Positif

Penelitian ini menggunakan bakteri yang dikultur sebagai kontrol positif. Bakteri yang digunakan ialah stok bakteri yang sudah dikultur pada media agar (NA: Nutrien Agar) di laboratorium. Sebelum digunakan, stok bakteri ditumbuhkan pada media Nutrien Broth (NB).

Bakteri yang telah tumbuh pada media nutrient broth tersebut dipindahkan ke dalam empat tube eppendorf sebanyak 1,5 ml setiap tubenya. Setelah itu, semua tube disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifus dibuang dan debris yang ada di empat tube tersebut disatukan ke dalam tube eppendorf yang baru. Setelah disatukan, sampel disentrifus kembali agar supernatan dan debris terpisah lebih sempurna. Selanjutnya supernatan dibuang kembali. Debris hasil sentrifus kemudian diekstraksi menggunakan prosedur pada DNeasy® PowerSoil Pro Kit Qiagen.

Elektroforesis Gel

Elektroforesis menggunakan gel agarose 1%. Pembuatan gel agarose dilakukan dengan melarutkan 0,5 gr agarose ke dalam 50 ml 1x TBE Buffer. Kemudian larutan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, larutan didiamkan selama 10 menit dan ditambahkan 1 µl *Diamond TM Nucleic Acid Dye*. Selanjutnya agarose dituang ke dalam cetakan dan dibiarkan mengeras selama 30 menit. Masukkan TBE buffer sebanyak 500 ml ke dalam wadah elektroforesis. Agarose yang sudah mengeras diletakkan ke dalam wadah elektroforesis hingga terendam secara menyeluruh dalam TBE buffer. Sebanyak 4 µl sampel dicampurkan dengan 1 µl *Loading Dye* dan dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarose. *Ladder* 1000 bp digunakan sebagai penanda. Setelah itu, elektroforesis dijalankan selama 30 menit pada tegangan 80V. Selanjutnya agarose

dipindahkan ke UV-Transluminator untuk mengecek ada tidaknya pita DNA dan didokumentasi.

Spektrofotometer UV-Vis

Kemurnian hasil isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV-VIS. Sebelumnya, sampel DNA diencerkan sebanyak 100 kali. Selanjutnya diuji menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280, dan dibaca absorbansinya. Dilakukan perhitungan kemurnian DNA dengan menggunakan rumus Sambrook *et al.*, (1989).

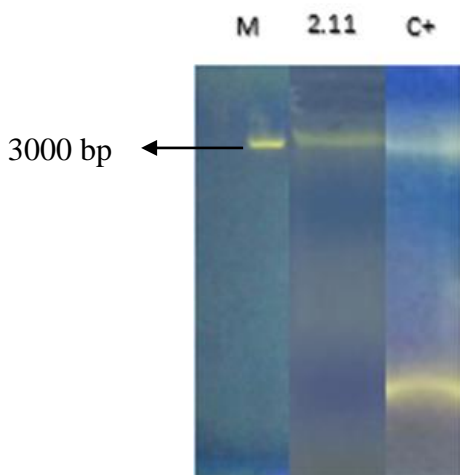
$$\text{Rasio Kemurnian DNA} = \frac{(\text{Abs Pada } \lambda \text{ A260})}{(\text{Abs Pada } \lambda \text{ A280})}$$

DNA hasil isolasi selanjutnya dikirim ke PT Genetika Science untuk diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan ke Novogene, Beijing untuk analisis jenis bakteri dengan menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Bakteri tanpa kultivasi dari Sampah Plastik

DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA (Gambar 2) dari hasil elektroforesis dengan menggunakan gel agarose. Oleh sebab itu, sampel DNA tersebut kemudian dikoleksi dan dilanjutkan untuk diamplifikasi.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel DNA bakteri dari sampel plastik dan Kontrol Positif

Hasil Uji DNA dengan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil isolasi DNA bakteri dari sampah plastik dilakukan uji menggunakan spektrofotometer UV-Vis

untuk melihat kemurnian DNA berdasarkan rumus kemurnian DNA menurut Sambrook *et al.*, (1989). Hasil perhitungan kemurnian DNA yang dilakukan tersaji dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kemurnian DNA dari Sampah Plastik

Konsentrasi	Panjang Gelombang (nm)		Kemurnian
	260	280	
3000 µl	0.019	0.019	1

Dari hasil penelitian ini, terlihat bahwa DNA bakteri yang diisolasi menunjukkan nilai kemurnian 1. Sambrook *et al.*, (1989) menyatakan bahwa kualitas DNA yang memiliki kriteria baik apabila tingkat rasio kemurnian berada pada

rentang 1,8 – 2,0. Oleh sebab itu, dapat dinyatakan bahwa DNA yang diisolasi masih belum sepenuhnya murni. Jika DNA memiliki rasio kemurnian <1,8 menunjukkan bahwa DNA tersebut masih

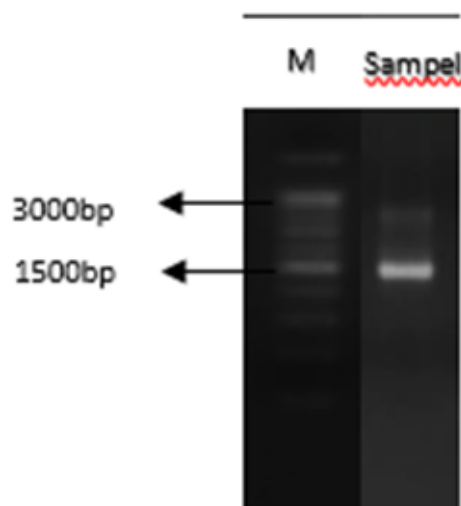
mengandung protein (Sambrook *et al.*, 1989)

Hasil Amplifikasi DNA

Hasil elektroforesis amplifikasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik ditunjukkan pada Gambar 3. Terlihat bahwa DNA hasil isolasi dapat teramplifikasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA. Pita DNA hasil amplifikasi berada pada panjang basa 1500bp.

Penelitian yang dilakukan Napitupulu, dkk (2019) telah berhasil mengamplifikasi DNA bakteri yang dikultur dari media kultur rotifer dan menunjukkan

pita DNA dengan panjang sekitar 1400 bp. Mardiana *et al.*, (2020), Pangestu *et al.*, (2016), Haryogya dan Ustadi, (2020) berhasil mengidentifikasi bakteri dengan analisis molekular gen 16S rRNA. Hasil amplifikasi DNA gen 16S rRNA yang diperoleh berada pada panjang basa 1500bp. Panjang pita DNA bakteri kontrol positif dari stok kultur bakteri yang diuji cobakan dalam penelitian ini menunjukkan pita DNA pada panjang 1500 bp. Hasil-hasil ini memperkuat keberhasilan isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik tersebut.



Gambar 3. Hasil elektroforesis gel amplifikasi DNA bakteri dari sampel plastik.

Di lain pihak, diperoleh pita DNA hasil amplifikasi yang tidak terlihat jelas atau smear dapat disebabkan karena rendahnya kualitas DNA yang diperoleh. Semakin sedikit atau tidak adanya smear menunjukkan semakin baik kualitas DNA. Tebal dan tipisnya pendaran yang dihasilkan DNA pada gel dapat menunjukkan konsentrasi DNA total secara semi-kuantitatif (Sambrook *et al.*, 1989). Irmawati (2013) menyatakan bahwa pita DNA yang terlihat tebal menunjukkan konsentrasi DNA yang tinggi sedangkan pita yang mengumpul (tidak tersebar) menunjukkan DNA total yang diekstrak utuh.

Komunitas Bakteri pada Sampel Plastik

Hasil analisis jenis bakteri pada sampah plastik dengan menggunakan Next Generation Sequencing (NGS) dapat dilihat pada Gambar 4. Adapun bakteri pada sampah plastik jenis PET ini adalah Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, Chlorobi, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi, Thaumarchaeuta dan Gemmatimonadetes.

Dari hasil kelimpahan relatif bakteri pada sampah plastik terlihat bahwa filum Proteobacteria memiliki kelimpahan tertinggi. Hal yang sama ditunjukkan lewat hasil penelitian komunitas mikroba pada permukaan mikroplastik yang ada di laut (Amaral-Zettler *et al.*, 2015;

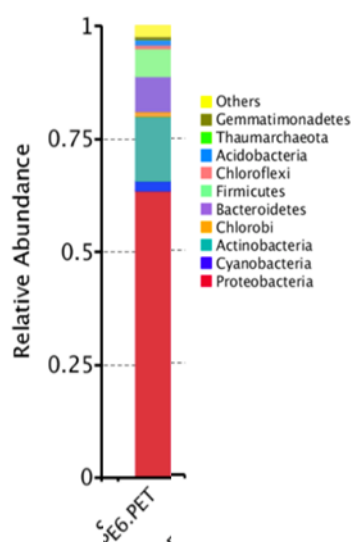
Oberbeckmann *et al.*, 2016). Lebih lanjut, hasil penelitian Oberbeckmann *et al.*, (2014) pada permukaan plastik dari lautan menunjukkan bahwa organisme laut yang menempel ialah bakteri dari filum *Bacteroidetes* dan *Proteobacteria*.

Filum *Proteobacteria* merupakan bakteri yang bersifat fotosintetik, heterotrofik atau kemolitotrofik. Pada umumnya bakteri ini merupakan Gram negatif, memiliki flagel atau tidak memiliki flagel, sel dapat berbentuk batang, spiral atau bulat, bersifat aerob, fakultatif ataupun anaerob (Holt *et al.*, 2000). *Proteobacteria* ditemukan sebagai penjajah biofilm primer (Dang and Lovell, 2000). Menurut Gao *et al.*, (2016), filum *Proteobacteria* dapat ditemukan pada lingkungan dengan pH 5,5–8,2. Filum *Proteobacteria* seperti genus *Pseudomonas*, optimum tumbuh pada suhu 20–37 °C (Holt *et al.*, 2000). Selain itu, penelitian Yang, Wang, Guo, Zhang, dan Ye (2017) menunjukkan bahwa bakteri kelompok *Proteobacteria* memiliki kemampuan mengikat nitrogen bebas dan melarutkan fosfat.

Pseudomonas termasuk Famili *Proteobacteria* yang merupakan salah satu jenis bakteri yang dapat

mendegradasi sampah plastik. Hal ini disebabkan karena *Pseudomonas* spp. dapat menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi plastik, yaitu serine hidrolase, esterase, dan lipase. Proses pendegradasian sampah plastik oleh enzim tersebut dapat berlangsung secara optimal jika tidak terdapat inhibitor yang mampu menghambat aktivitas enzim di lingkungan (Treviño *et al.*, 2012). *Pseudomonas* spp. aktif melekat membentuk biofilm di permukaan sampah plastik selama proses pendegradasian. Pendegradasian plastik oleh *Pseudomonas* spp. berlangsung selama ≥ 3 bulan (Sriningsih dan Shovitri, 2015).

Kemampuan bakteri dalam mendegradasi sampah plastik, khususnya yang berjenis PET dapat disebabkan karena enzim PETase yang dapat dihasilkannya. PETase adalah enzim yang paling penting yang dikeluarkan oleh bakteri pemakan plastik. PETase mendegradasi plastik PET menjadi asam (2-hidroksietil) tereftalat (MHET) yang kemudian dipecahkan. Produk akhir nantinya digunakan sebagai sumber makanan oleh bakteri yang berada pada plastik PET (Austin *et al.*, 2018).



Gambar 4. Hasil Next Generation Sequencing (NGS)

Sampel plastik dalam penelitian ini diambil dari kawasan mangrove. Jika dihubungkan dengan lingkungannya, plastik dapat terdegradasi dipengaruhi

oleh parameter-parameter lingkungan yang mendukung, seperti suhu, pH, dan kadar air. Kondisi lingkungan yang optimum sangat dibutuhkan oleh

mikroorganisme untuk hidup, tumbuh dan melakukan aktifitas penguraian sampah plastik. Dalam proses degradasi sampah plastik akan berubah sesuai dengan fase yang akan dilaluinya (Black, 2002). Kondisi lingkungan yang optimal dapat meningkatkan kualitas mikroorganisme yang ada dalam sampah plastik tersebut. Peningkatan kualitas hidup mikroorganisme akan mempercepat laju degradasi (Dian dan Pandebesie, 2013).

KESIMPULAN

Isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik dengan jenis Polyethylene Terephthalate (PET) telah berhasil dilakukan dengan menggunakan metode pengikisan sampel plastik sebelum diekstraksi menggunakan Prosedur DNeasy® PowerSoil Kit. DNA bakteri tanpa kultivasi dari sampah plastik memiliki kemurnian 1 dan teramplifikasi pada teramplifikasi. Dari hasil analisis Next Generation Sequencing, bakteri yang terdapat pada sampah plastik jenis PET adalah Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, Chlorobi, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi, Thaumarchaeota dan Gemmatimonadetes dengan kelimpahan relatif tertinggi adalah *Proteobacteria*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Slikas, B., Boyd, G. D., Melvin, D. W., Morrall, C. E., Proskurowski, G., Mincer, T.J. 2015. *The biogeography of the Plastisphere: implications for policy*. *Front. Ecol. Environ.* 13 (10), 541–546.
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman R., El Omari K., Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf M. S., Crowley M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Woodcock, H. L., McGeehan, J. E., Beckham, G. T. *Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115: E4350–E4357. doi: 10.1073/pnas.1718804115.
- Black, J. G. 2002. *Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Dang, H., Lovell, C. R., 2000. *Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2), 467–475.
- Dian, G. M., dan Pandebesie, E. S. 2013. Pengaruh Penambahan Mikroorganisme Terhadap Kondisi Operasi Pemusnahan Sampah Plastik Biodegradable. *Jurnal Teknik POMITS Vol. 2, No. 1, ISSN: 2337-3539 (2301-9271 Print)*.
- Haryogya, A. M., and Ustadi. 2020. *Isolation and Molecular Identification of Chitinolytic Bacterium from Ronto. Departement of Fisheries, Faculty of Acriculture, Universitas Gadjah Mada*.
- Hetherington J., Leous J., Anziano J., Brockett D., Cherson A., Dean E., Dillon J., Johnson T., Littman M., Lukehart N., Ombac J. and Reilly K., 2005. *The Marine Debris Research, Prevention and Reduction Act: A Policy Analysis*. Columbia University New York, New York.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition*. Maryland: Lippicott Williams & Wilkins, a wolters Kluwer company.
- Irmawati., 2013. Perubahan keragaman genetik ikan kerapu tikus (*cromileptes altivelis*) generasi pertama pada stok hatchery. IPB. Bogor. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/6996>.
- Kaseem, M. K., Hamad, and Deri, F. 2012. *Thermoplastic starch blends: A review of recent works*. 54:165-176.

- Lebreton, L., van der Zwet, J., Damsteeg, J., Slat, B., Andrady, A., and Reisser, J. 2017. *River plastic emissions to the World's Oceans*. Nat. Commun. 8:15611. doi: 10.1038/ncomms15611.
- Mahalik, N. P., and A. N. Nambiar. 2010. *Trends in Food Packaging and Manufacturing Systems and Technology*. *Trends in Food Science & Technology*. 21: 117-128.
- Mardiana, A. N., Murniasih, T., Rukmi, D. W., Kusnadi, J. 2020. Potensi Bakteri Sebagai Sumber Antibiotik Baru Penghambat *Saccharomyces aureus*. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 21(1).
- Marliani, N. 2014. Pemanfaatan limbah rumah tangga (sampah anorganik) sebagai bentuk implementasi dari pendidikan lingkungan hidup. *Jurnal Formatif* 4(2): 124-132, ISSN: 2088-351X
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., dan Toloh, B. H. 2019. *Bacillus* sp. sebagai Agenia Pengurai dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(1) :158-169.
- Oberbeckmann, S., Loeder, M. G., Gerdt, G., Osborn, A. M., 2014. *Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90 (2), 478–492.
- Oberbeckmann, S., Osborn, A. M., Duhaime, M. B. 2016. *Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris*. *PLoS One* 11 (8), e0159289.
- Pangestu, S. N., Budiharjo, A., Rukmi. 2016. Isolasi, Identifikasi 16S rRNA dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Pendegradasi Plastik Polietilen (PE). *Jurnal Biologi*. 5(1) : 24-29.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab press.
- Sriningsih, A dan Shovitri, M. 2015. Potensi Isolat Bakteri *Pseudomonas* sebagai Pendegradasi Plastik, *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4, E-67 – E-69.
- Treviño, A. L, Gerardo G. S, Raúl R. H and Cristóbal N. A. 2012. *Microbial Enzymes Involved in Polyurethan Biodegradation: A Review*, *J Polym Environ*, 20, 261.
- Tokiwa, Y., B. P. C alab ia, C. U. Ugwu, and S. Aiba. 2009. *Biodegradability of Plastics*. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3722-3742.