

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Plastik merupakan polimer dengan massa molekul yang sangat besar dengan derajat polimerisasi (DP) mencapai 10.000 (Krzan, 2012), terbuat dari material dasar minyak bumi, gas alam atau batubara (Pramila & Ramesh, 2011). Karena massa molekulnya yang besar, plastik terdegradasi dalam waktu ratusan bahkan ribuan tahun (Kale *et al.*, 2015). Plastik memiliki banyak kelebihan dibandingkan bahan lainnya. Bahan berbaku plastik umumnya lebih ringan, bersifat isolator, tahan lama, serta proses pembuatannya murah (Hourston, 2010). Namun dibalik semua kelebihannya, bahan plastik memiliki masalah setelah tidak digunakan lagi. Barang berbahan plastik tidak dapat membusuk, tidak dapat menyerap air dan pada akhirnya tidak dapat diuraikan dalam tanah (Restrepo-Florez *et al.*, 2014). Hal tersebut akan menimbulkan masalah bagi lingkungan, terutama lingkungan perairan dan laut sebagai tempat berkumpulnya sampah terakhir (Webb *et al.*, 2013; Russel *et al.*, 2011).

Plastik komersial merupakan polimer yang pada prinsipnya terdiri dari empat jenis utama yaitu polietilena (PE), polipropilen (PP), poli(vinil klorida) (PVC), dan polistiren (Kar, 2012). Plastik yang paling umum terdapat pada limbah adalah jenis polietilen (PE). Polietilen terdiri dari beberapa tipe yaitu *Low Density Polyethylene* (LDPE), *High Density Polyethylene* (HDPE), *Linier Low Density Polyethylene* (LLDPE), dan *Cross Linked Polyethylene* (XLPE). Perbedaan pada setiap tipe polietilen adalah berdasarkan pada densitas, percabangan dan keberadaan grup fungsional pada permukaannya (Restrepo-Florez *et al.*, 2014). Polietilen dapat pula dikombinasikan dengan bahan aditif seperti *pro-oxidant* atau *starch* pada proses pembuatannya (Zheng *et al.*, 2005; Koutny *et al.*, 2006).

High Density Polyethylene (HDPE) merupakan salah satu jenis polietilen yang termasuk kelompok polimer termoplastik (Pramila & Ramesh, 2011), yang tersusun dari rantai panjang monomer etilen ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) dengan rantai lurus (Mahalaksmi & Andrew, 2012). HDPE banyak digunakan sebagai kantong plastik. Sekitar 80 juta metrik ton polietilen diproduksi setiap tahunnya, 43 % nya berupa HDPE (CNI,2007). Berdasarkan penelitian Jambeck *et al.* (2015), rata-rata pemakaian kantong plastik di Indonesia adalah 700 lembar per orang per tahun, sehingga sekitar 100 milyar kantong plastik terkonsumsi per tahunnya. Produksi yang tinggi akan diiringi dengan limbah yang tinggi pula, sehingga sampah kantong plastik mencapai 4000 ton per hari dan Indonesia dinyatakan sebagai negara penyumbang sampah plastik terbesar kedua di dunia setelah China.

Keadaan seperti di atas, membutuhkan penanganan yang serius dari semua pihak. Pemerintah telah menerapkan kebijakan kantong plastik berbayar pada awal tahun 2016, guna mengurangi konsumsi kantong plastik berdasarkan PP Nomor 81 Tahun 2012 tentang Pengelolaan sampah. Selain itu, beberapa cara penanganan sampah plastik lainnya juga dilakukan yaitu dengan membakar sampah dan daur ulang. Proses pembakaran plastik akan mencemari lingkungan, karena selain abunya tidak dapat dicerna oleh tanah, asapnya dapat menghasilkan gas beracun seperti CO, H₂S dan HCN yang berbahaya bagi makhluk hidup (Mahalaksmi & Andrew, 2012). Sedangkan proses daur ulang plastik yang kini banyak dipasarkan, pada dasarnya hanya berfungsi untuk mengurangi bahan baku. Artinya sampah-sampah yang bertumpuk yang akan dibuang ke alam, dikumpulkan, kemudian diolah untuk memproduksi jenis barang-barang plastik yang baru. Namun, produk dari proses daur ulang ini kualitasnya lebih rendah dari polimer asli. Kualitas akhir yang kurang bersaing menjadikan metode ini belum optimal dalam penanggulangan buangan sampah plastik (O'Brine & Thompson, 2010; Kale *et al.*, 2015).

Biodegradasi dianggap sebagai salah satu solusi untuk pengelolaan sampah plastik polietilen dengan rantai karbon yang panjang, terutama HDPE (Ursa *et al.*, 2003). Biodegradasi sering dipilih karena efektif dan tidak membutuhkan biaya besar. Namun, keberhasilan pengolahan limbah secara biologi sangat tergantung pada aktivitas dan kemampuan mikroorganisme pendegradasi di dalam limbah tersebut (Arutchelvi *et al.*, 2008). Oleh sebab itu, dirasakan penting untuk mengeksplorasi mikroorganisme potensial pendegradasi plastik HDPE.

Plastik yang terbuat dari hidrokarbon minyak bumi, batu bara dan gas alam mengandung rantai alkana. Kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi alkana penting diketahui untuk proses biodegradasi plastik. Heksadekana merupakan representasi alkana rantai panjang dan umum digunakan untuk penelitian penggunaan hidrokarbon sebagai sumber karbon oleh mikroorganisme (Lo, 1994).

Fungi merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendegradasi berbagai polimer (Geewely & Ouf, 2011), sehingga bertindak sebagai dekomposer utama di alam (Barrat *et al.*, 2003). Fungi dapat menghasilkan beberapa enzim yang mampu mendegradasi senyawa rekalsitran (Atiq, 2011), PBS (*Poly Butilene Succinate*) dan PBSA (*Poly Butilene Succinate co Adipate*) (Maeda *et al.*, 2005), bioplastik PHB (*Poly-Hydroxy Butyrate*) (Nathania & Kuswytasari, 2012), dan plastik sintesis polietilen (Restrepo-Florez *et al.*, 2014; Kathiresan, 2003; Mahalakshmi & Andrew, 2012; Esmaceli *et al.*, 2013; Sing & Gupta, 2014; Pramila & Ramest, 2011).

Fungi pendegradasi polietilen telah menjadi perhatian banyak peneliti. Labuzek *et al.* (2004) menyatakan bahwa *Aspergillus niger* dan *Penicillium funiculosum* dapat mendegradasi *Low Density Polyethylen* (LDPE) yang murni maupun yang mengandung komponen polyester bionolle. Sedangkan *A.oryzae* dianggap efektif dalam mendegradasi polietilen secara *ex situ* (Indumathi & Gayathri, 2016). Polietilen dan polipropilen yang bersifat rekalsitran serta sulit didegradasi dan dideteriorasi, ternyata dapat didegradasi oleh fungi dari tanah secara *in vitro* (Arutchelvi *et al.*, 2007). Kathiresan (2003) juga menemukan bahwa spesies *A.glaucus* dan *A.niger* mendominasi proses degradasi kantong plastik polietilen dengan metode komposting selama satu bulan. Lembaran LDPE akan didegradasi oleh *A. fumigatus*, *A. terreus* dan *Fusarium solani* dengan membentuk formasi biofilm selama 100 hari (Zahra *et al.*, 2010). Spesies lain yang dapat mendegradasi polietilen adalah *A.versicolor*, *A. flavus*, *Mucor circinelloides* (Pramila & Ramesh, 2011), *A.ornatus*, *A. cremeus*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*, (Kathiresan, 2003), *A. japonicus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* (Singh & Gupta, 2014), *Chaetomium spp.*, *Cladosporium cladosporoides*, *Gliocladium virens*, *Mortierella alpine*, dan *Acremonium kiliense* (Restrepo-Florez *et al.*, 2014).

Fungi pendegradasi HDPE juga telah diteliti oleh beberapa peneliti. Genus *Aspergillus* yang dapat mendegradasi HDPE antara lain *A.niger* (Arutchelvi *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2016), *A.terreus* (Balasubramanian *et al.*, 2014), *A.tubingensis* dan *A.flavus* (Devi *et al.*, 2015). Arutchelvi *et al.* (2009) menyatakan bahwa kultur campuran *Acremonium kiliense*, *A.versicolor* dan *Verticillium lecanii* mendegradasi HDPE lebih baik. Kelompok WRF (*White Root Fungi*) yang telah diketahui kemampuannya dalam mendegradasi HDPE adalah *Xylobolus frustulatus*, *Trametes versicolor* dan *Phlebia subserialis* (Mankowski & Morrell, 2000). *Phanerochaete chrysosporium* dapat mendegradasi HDPE dalam kondisi medium dengan karbon dan nitrogen yang terbatas (Liyoshi *et al.*, 1998; Ramirez-Chan *et al.*, 2014).

Fungi dapat mendegradasi substrat setelah fungi melekat pada substrat dan membentuk biofilm. Hidrofobin yang bersifat seperti surfaktan, berperan terhadap interaksi antara fungi dengan substrat pada saat membentuk biofilm (Jung *et al.*, 2011). Sebelum terjadinya proses degradasi, diperlukan proses interaksi antara pendegradasi dengan substrat yang akan didegradasi. Interaksi dapat berupa ketertarikan fungi terhadap substrat berdasarkan kesamaan hidrofobitasnya. Substrat seperti plastik sintesis HDPE bersifat hidrofob, sedangkan fungi bersifat hidrofilik. Sehingga apabila fungi akan menempel pada substrat plastik, permukaan dinding sel fungi menghasilkan hidrofobin yang akan membuat

permukaan fungi bersifat hidrofobik dan dapat berinteraksi dengan substrat plastik yang hidrofobik (Cicatiello *et al.*, 2016).

Proses biodegradasi HDPE oleh fungi dapat terjadi karena enzim ekstraseluler spesifik yang dihasilkan oleh fungi tertentu. Beberapa penelitian dengan HDPE belum bisa menentukan secara spesifik enzim-enzim yang terlibat dalam proses biodegradasi HDPE (Mankowski & Morrel, 2000; Ojha *et al.*, 2017; Arutchelvi b, 2009). Peneliti lainnya menyatakan bahwa enzim yang terlibat adalah enzim ekstraseluler (Devi *et al.* 2015), oksidase (Balasubramanian *et al.*, 2014), dan mangan peroxidase (Liyoshi *et al.*, 1998). Jeon & Kim (2016) melaporkan bahwa enzim alkana hidroksilase dari famili gen AlkB berperan dalam proses degradasi polietilen. Secara garis besar, belum diketahui mekanisme degradasi plastik HDPE secara lengkap serta enzim-enzim yang terlibat di dalamnya. Belum banyak yang meneliti keterlibatan enzim alkana hidroksilase pada degradasi HDPE, padahal alkana hidroksilase diduga merupakan enzim pengoksidase yang pertama dalam proses degradasi hidrokarbon (Ji *et al.*, 2013). Mengingat bahwa HDPE terbuat dari bahan dasar hidrokarbon, maka masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai enzim pertama yang diduga terlibat dalam proses biodegradasi tersebut, yaitu alkana hidroksilase.

Karakteristik enzim menentukan kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat. Mempelajari karakteristik enzim dapat mengungkapkan mekanisme katalitik pada enzim tersebut, mengetahui perannya dalam metabolisme, serta mengetahui bagaimana aktivitasnya dikendalikan. Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan adanya kofaktor. Enzim akan bekerja paling aktif dan paling stabil pada suhu dan pH optimum. Oleh karena itu, analisis mengenai karakteristik dari enzim alkana hidroksilase perlu dilakukan.

Mangrove merupakan daerah yang penting karena merupakan perbatasan antara lingkungan daratan dengan lingkungan laut. Akan tetapi, mangrove akan menanggung beban terkumpulnya sampah plastik buangan dari daratan. Keberadaan sampah plastik di daerah mangrove memungkinkan ditemukannya mikroorganisme terutama fungi yang dapat mendegradasi plastik (Kathiresan, 2003). Kuswytasari *et al.* (2011) telah mengisolasi 37 isolat fungi dari daerah mangrove Wonorejo Surabaya. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan isolat-isolat fungi dari daerah mangrove tersebut dalam mendegradasi polimer plastik sintetis HDPE pada kondisi pH dan suhu yang optimum.

Keberhasilan proses biodegradasi sangat tergantung pada kemampuan mikroorganisme yang dipengaruhi oleh genetik dan kondisi lingkungan. Sehingga perlu dilakukan karakterisasi setiap agen pendegradasi, baik secara fenotip maupun genotip.

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

Karakterisasi genotipik fungi secara molekuler dapat dilakukan berdasarkan fragmen sekuen 18S rDNA dan area *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Fragmen 18S rDNA dianggap sebagai marker yang praktis dalam analisis molekuler genotipe (Duong *et al.*, 2006). Namun identifikasi 18S rDNA mengalami pergeseran, saat ini telah banyak area ITS rDNA yang telah disekuen untuk sistematika molekuler fungi. Menurut Liu (2015), karakterisasi berdasarkan area ITS rDNA lebih cepat dan tepat untuk analisis fungi daripada 18S rDNA, karena derajat variasi area ITS lebih tinggi dari area gen lainnya pada rDNA (SSU dan LSU). Menurut Gardes & Bruns, (1993), di antara berbagai macam primer standar ITS rDNA, primer standar ITS1 dan ITS4 memungkinkan amplifikasi selektif pada sekuen fungi.

Pada dasarnya, setiap jenis organisme memiliki hubungan kekerabatan dengan organisme lainnya (Woese, 2000). Hubungan kekerabatan antar isolat fungi pendegradasi HDPE dapat ditunjukkan dari pohon filogeni yang dibuat berdasarkan kesamaan karakter genotipik tertentu seperti area ITS rDNA. Selain itu, berdasarkan karakter fenotipik, genotipik serta hubungan kekerabatannya, dapat digunakan sebagai dasar penentuan status spesies fungi. Status spesies yang jelas memudahkan peneliti atau yang berkepentingan dalam memanfaatkan spesies tersebut untuk aplikasi di berbagai bidang.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan di atas, rumusan masalah yang diajukan adalah:

1. Apakah isolat fungi mangrove Wonorejo mampu mendegradasi heksadekana sebagai penapisan pendahuluan terhadap *High Density Polyethylene* (HDPE)?
2. Bagaimanakah karakter fenotipik dan genotipik isolat fungi Wonorejo Surabaya yang mampu mendegradasi polimer plastik sintesis HDPE?
3. Bagaimana hubungan kekerabatan di antara isolat fungi pendegradasi polimer plastik sintesis HDPE dengan fungi lain berdasarkan sekuen daerah ITS (*Internal Transcriber Sequence*) rDNA?
4. Apakah isolat fungi mangrove Wonorejo mampu menghasilkan hidrofobin sebagai mediator untuk pelekatan hifa fungi pada plastik sintesis HDPE?

5. Berapa persentase degradasi isolat fungi mangrove Wonorejo Surabaya dalam mendegradasi polimer plastik sintetis HDPE pada kondisi pH dan suhu optimum ?
6. Bagaimana karakteristik kerja enzim alkana hidroksilase ekstraseluler yang berperan pada proses degradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE)?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan fungsional

Mempelajari kemampuan fungi dari daerah mangrove Wonorejo Surabaya dalam mendegradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE) dan menganalisis karakteristik aktivitas enzim alkana hidroksilase yang berperan pada proses degradasi plastik sintetis HDPE.

1.3.2. Tujuan operasional

- a. Mengisolasi fungi dari daerah mangrove Wonorejo Surabaya yang mampu mendegradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE).
- b. Menganalisis isolat fungi mangrove dalam menghasilkan hidrofobin yang berperan dalam proses pelekatan fungi dengan substrat plastik.
- c. Mengkarakterisasi fenotipik dan genotipik dari isolat fungi yang mampu mendegradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE).
- d. Menentukan hubungan kekerabatan di antara isolat fungi pendegradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE) dari daerah mangrove Wonorejo Surabaya dengan fungi lain berdasarkan sekuen daerah ITS (*Internal Transcriber Sequence*) rDNA.
- e. Menentukan karakter enzim alkana hidroksilase ekstraseluler yang berperan pada proses degradasi polimer plastik sintetis *High Density Polyethylen* (HDPE).

1.4. Manfaat Penelitian

- a. Memperkaya informasi mengenai jenis-jenis fungi yang berasal dari daerah mangrove Wonorejo Surabaya yang memiliki kemampuan dan potensi dalam mendegradasi polimer plastik sintetis HDPE, serta mampu menghasilkan enzim alkana hidroksilase.
- b. Memperoleh informasi mengenai karakterisasi kerja enzim alkana hidroksilase yang diproduksi oleh fungi daerah mangrove Wonorejo, untuk dimanfaatkan pada penelitian lain terutama untuk proses bioremediasi.

- c. Memperoleh informasi kondisi optimal dalam proses degradasi plastik HDPE skala laboratorium. Pengkondisian yang tepat, akan menghemat waktu dalam rangka mengurangi volume sampah plastik di lingkungan.
- d. Isolat diharapkan dapat menjadi agen bioremediasi yang potensial untuk menyelesaikan masalah limbah plastik terutama di Indonesia, sebagai bentuk tanggung jawab bangsa penghasil sampah plastik terbesar kedua di dunia.