

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia mengalami peningkatan signifikan dalam timbunan sampah *non-biodegradable*, yang mencerminkan lemahnya sistem pengelolaan limbah serta rendahnya kesadaran masyarakat terhadap dampak jangka panjang terhadap lingkungan. Salah satu jenis limbah yang menjadi perhatian utama adalah limbah *styrofoam* (*polistirena*), yaitu bahan sintesis berbasis minyak bumi yang banyak digunakan sebagai kemasan makanan, alat pelindung barang elektronik, dan bahan insulasi karena awet, mudah didapat, murah, dan lebih praktis untuk sekali pemakaian (Nanda *et al.*, 2024). Hal tersebut yang mempengaruhi jumlah peningkatan produksi *styrofoam* setiap tahunnya, yaitu tingginya jumlah produksi yang berbanding lurus dengan permintaan pasar (Hendrata *et al.*, 2024). *Styrofoam* merupakan bahan yang sangat sulit terurai secara alami, di mana proses dekomposisinya di dalam tanah dapat memakan waktu mulai dari 500 tahun hingga mencapai 1 juta tahun (Widayoko & Yuliani, 2024).

Masalah yang timbul akibat sampah *styrofoam* semakin mengkhawatirkan apalagi cara dalam menanggulangi dan mengurangnya dilakukan dengan membakar, menimbun, atau membuangnya ke sungai. Hal ini justru akan menimbulkan masalah baru bagi lingkungan. Walaupun dalam pengelolaan sampah *styrofoam* dapat dilakukan dengan cara mendaur ulang. Tetapi, cara tersebut tidak dapat dilakukan secara terus menerus terhadap satu bahan yang sama karena akan menghasilkan produk yang kurang berkualitas dan justru dapat berbahaya bagi kesehatan jika pemakaiannya kurang tepat (Maisyaroh *et al.*, 2024). Berdasarkan permasalahan tersebut, salah satu cara untuk mengatasi masalah sampah *styrofoam* yang telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya yaitu proses biodegradasi dengan menggunakan ulat hongkong.

Biodegradasi merupakan proses dimana bahan organik dipecah oleh bakteri dan jamur. Proses biodegradasi polimer berdasarkan aktivitas enzimnya, terbagi menjadi dua kategori yaitu depolimerase ekstraseluler dan intraseluler. Eksoenzim dari bakteri akan memecah polimer menjadi oligomer, dimer, atau monomer yang dapat melewati membran semipermeabel bakteri dan akan dimanfaatkan sebagai sumber karbon hingga bakteri menghasilkan produk akhir metabolismenya yaitu CO₂ dan H₂O (Hidayah *et al.*, 2020).

Ulat hongkong merupakan larva dari serangga yang bernama latin *Tenebrio molitor* L., yang merupakan hama dari produk biji bijian (Oktaviani & Fitri, 2021). Siklus hidup ulat hongkong ini terdiri dari 4 tahap, yaitu telur, larva, kepompong, dan ulat dewasa. Umur larva *Tenebrio molitor* L. kurang lebih 3-4 bulan yaitu hingga fase ulat menjadi kepik atau serangga. Ulat hongkong ialah pakan alami yang mempunyai kandungan suplemen untuk dikonsumsi burung kicau, hamster, reptil dan ikan hias. Ulat hongkong memiliki kandungan protein tinggi serta asam amino lengkap, ketersediaan ulat hongkong juga cukup banyak, berbeda dengan sumber protein yang kebanyakan merupakan bahan impor (Lazuardi *et al.*, 2020).

Penelitian terkini menunjukkan bahwa ulat hongkong mampu menguraikan *styrofoam*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yang *et al.*, (2015) bahwa

pada saluran pencernaan ulat hongkong terdapat bakteri yang bersimbiosis dengan saluran pencernaan yang mampu mensekresikan enzim ekstraseluler yang mengkatalis reaksi depolimerisasi fragmen *styrofoam* menjadi molekul-molekul kecil dan karbondioksida (CO₂). Yang *et al.*, (2015) juga membuktikan bahwa ulat hongkong dapat dijadikan sebagai pengurai *polystyrene*. Berdasarkan penelitian tersebut, telah terbukti bahwa di dalam tubuh ulat hongkong terdapat mikroba yang mampu mengonsumsi dan menguraikan *styrofoam*. Mikroba tersebut mampu untuk mengurai *polystyrene* sebagai komponen penyusun *styrofoam*. Ulat hongkong mengubah *styrofoam* menjadi karbondioksida dan butiran-butiran materi yang dapat diuraikan (Iza *et al.*, 2024).

Berdasarkan hal tersebut bahwa terdapat bakteri simbiosis pada saluran pencernaan ulat hongkong yang mampu mengonsumsi dan menguraikan *styrofoam* sehingga mengubah *styrofoam* yang sulit terurai di alam menjadi butiran-butiran materi yang dapat diuraikan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan isolat bakteri dan mengidentifikasi jenis bakteri yang mampu dalam mendegradasi *styrofoam*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, rumusan masalah penelitian ini sebagai berikut.

1. Apakah terdapat bakteri simbiosis pada saluran pencernaan ulat hongkong yang mampu mendegradasi *styrofoam*?
2. Bagaimana laju degradasi dari bakteri simbiosis yang mampu mendegradasi *styrofoam* pada saluran pencernaan ulat hongkong?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Memperoleh bakteri simbiosis dari saluran pencernaan ulat hongkong yang mampu mendegradasi *styrofoam*.
2. Mengetahui laju degradasi dari bakteri simbiosis yang mampu mendegradasi *styrofoam* pada saluran pencernaan ulat hongkong

Berdasarkan tujuan tersebut, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yaitu menambah informasi mengenai karakteristik morfologi bakteri simbiosis yang terdapat pada saluran pencernaan ulat hongkong dalam mendegradasi *styrofoam*.

1.4 Landasan Teori

1.4.1 Styrofoam

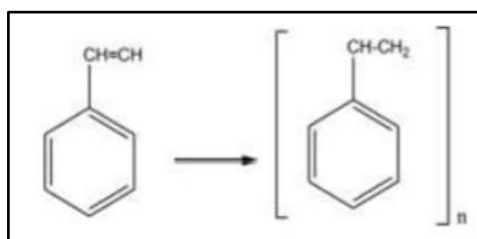
Saat ini bahan plastik merupakan bagian yang tidak terpisahkan dan sangat penting dari ekonomi global dan kehidupan sehari-hari manusia. Salah satu jenis plastik yang sering digunakan adalah *styrofoam* yang terbentuk dari senyawa polistirena. *Styrofoam* mengandung <98% *Polystyrene* yang jika dibakar akan merusak lapisan ozon pada atmosfer dan apabila dikubur dalam tanah, akan mencemari tanah karena *styrofoam* sulit terurai. Stirena adalah hidrokarbon aromatik cair yang berasal dari minyak bumi, dan merupakan monomer prekursor polistirena

(PS). PS adalah termoplastik yang biasanya padat pada suhu ruangan, meleleh pada suhu tinggi selama pencetakan atau ekstrusi, dan kemudian memadat.

Styrofoam pada umumnya berwarna putih bersih dan bentuknya yang simpel membuat *styrofoam* terlihat praktis. *Styrofoam* yang terbuat dari kopolimer *styrene* menjadi pilihan bisnis pangan banyak kalangan pelaku usaha. Akibatnya, limbah *styrofoam* meningkat drastis yang berdampak serius pada alam dan kesehatan makhluk hidup, yaitu pembentukan utama mikroplastik dan racun yang diduga (Yang *et al.*, 2023). Keunggulan yang dimiliki *Styrofoam* sangat banyak yakni, kuat tetapi ringan, tidak mudah bocor, dan praktis dibawa kemana mana. Akan tetapi *styrofoam* juga memiliki kekurangan yaitu *styrofoam* merupakan polistirena yang termasuk ke dalam golongan plastik nomor 6 dalam klasifikasi plastik sehingga *styrofoam* lebih berbahaya dibandingkan plastik yang lainnya karena sulitnya terurai di alam (Putri *et al.*, 2024).

Styrofoam merupakan bahan yang sangat sulit terurai secara alami, di mana proses dekomposisinya di dalam tanah dapat memakan waktu mulai dari 500 tahun hingga mencapai 1 juta tahun (Widayoko & Yuliani, 2024). Hal ini dikarenakan bahan dasar *styrofoam* terdiri dari 90-95% polistirena dan 5-10% gas n-butana dan untuk bisa menjadikan *styrofoam* ini menjadi lentur ditambahkan *plasticizer* atau pelembut seperti diop tiptalat (DOP) dan butil hidroksi toluen (BHT). Kemudian pada saat pembuatannya di hembuskan gas (CFC). Proses polimerisasi monomer stirena melalui pembentukan radikal bebas yang merupakan rute utama dalam sintesis polistirena. Polistirena bersifat lebih tahan panas, keras, fleksibel, dan tidak dapat tembus cahaya. Polistirena termasuk suatu polimer atau makromolekul rantai panjang yang memiliki derajat polimer tinggi. Polistirena termasuk polimer termoplastik, dimana akan lunak bila dipanaskan dan akan mengeras kembali ketika telah dingin (Capricho *et al.*, 2020).

Secara industri, polimerisasi stirena bisa dilakukan menggunakan katalis koordinasi. Proses polimerisasi akan menghasilkan rantai linear yang berbentuk -A-A-A-A-, dimana A merupakan stirena. Stirena adalah cairan tak berwarna yang menyerupai minyak dengan bau seperti benzena. Stirena bisa didapatkan dari sumber alam, yaitu petroleum. Rumus kimia stirena yaitu $C_6H_5CH=CH_2$ atau C_8H_8 (Humaira *et al.*, 2022).



Gambar 1. Reaksi Polimerisasi Polistirena
Sumber : Humaira *et al.*, 2022

Ketidakmampuannya untuk terurai secara alami, mengakibatkan limbah polistirena seringkali dibakar atau dibuang di tempat pembuangan sampah, yang menyebabkan masalah lingkungan yang signifikan. Insinerasi menghasilkan sejumlah besar abu, asap, dan gas berbahaya yang dapat membahayakan semua

makhluk hidup dan berkontribusi terhadap perubahan iklim, sementara tempat pembuangan sampah menempati sejumlah besar lahan. Proses daur ulang limbah polistirena melibatkan pemanasan, mengompresi, dan memberikan tekanan hingga meleleh atau larut. Namun, metode ini membutuhkan energi yang cukup besar karena harus mengompresi dan memanaskan material berdensitas rendah. Selain itu, proses ini sulit dilakukan dan membutuhkan biaya yang mahal. Adapun penggunaan pelarut organik untuk pelarutan menghasilkan limbah beracun dari pelarut kimia, yang berdampak negatif pada kesehatan organisme hidup. Alternatif yang ramah lingkungan adalah dengan proses biologis yaitu biodegradasi dengan memanfaatkan mikroba seperti bakteri ataupun jamur (Srinivasan *et al.*, 2024).

1.4.2 Biodegradasi

Degradasi adalah proses yang melibatkan perubahan fisik atau kimia dalam polimer sehingga putusnya rantai polimer menjadi molekul-molekul yang lebih kecil akibat faktor lingkungan seperti cahaya, panas, kondisi kimia atau aktivitas biologis (Safaat, 2020). Degradasi polimer dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti *thermal degradation*, *oxidative degradation*, dan *biodegradation*. Biodegradasi merupakan sebuah proses yang melibatkan senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme terutama oleh bakteri. Proses biodegradasi, bahan-bahan organik dapat terdegradasi secara aerobik dan anaerobik. Beberapa mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan *actinomyces* memiliki kemampuan untuk mendegradasi plastik sintesis secara alami (biodegradasi).

Menurut Safaat, (2020) proses biodegradasi, bahan-bahan organik dapat terdegradasi secara aerobik dan anaerobik. Degradasi oleh bakteri adalah salah satu strategi utama yang digunakan untuk bioremediasi senyawa organik. Keberlangsungan proses bioremediasi tergantung pada potensi degradasi dan transformasi mikroorganisme. Keunikan metode bioremediasi adalah karena faktanya dapat menghilangkan pencemar dari lingkungan alam atau mengurangi polutan menggunakan komunitas mikroba indigenous yang tersedia di alam.

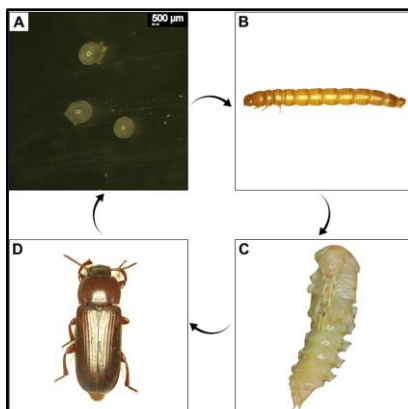
Proses degradasi secara biologi terjadi karena adanya bantuan dari organisme yang berperan sebagai agen remediasi seperti mikroorganisme yang menghasilkan enzim untuk mendegradasi mikroplastik (Rindiani & Agustiani, 2024). Proses biodegradasi polimer terdiri dari empat tahap :

1. Tahap *biodeterioration*, yaitu terjadinya perpaduan aktivitas dari mikroorganisme, dekomposer lain dan faktor abiotik yang memecah komponen polimer menjadi lebih sederhana.
2. Tahap depolimerisasi, yaitu mikroorganisme mensekresikan senyawa katalitik (berupa enzim dan radikal bebas) membentuk biofilm yang mampu memutus rantai polimer secara progresif menjadi lebih sederhana : Oligomer, Dimer, dan Monomer.
3. Tahap asimilasi di dalam sitoplasma mikroorganisme, yaitu terjadinya proses metabolisme untuk menghasilkan produk berupa energi, biomassa, cadangan makanan serta metabolit primer maupun sekunder.
4. Tahap mineralisasi, yaitu beberapa metabolit sederhana dan kompleks yang kemungkinan diekskresikan menuju bagian ekstraseluler (misalnya asam organik, aldehid, terpen, antibiotic, dan lain lain).

1.4.3 Ulat Hongkong *Tenebrio molitor* L.

Klasifikasi Ulat Hongkong *Tenebrio molitor* L.

Kingdom : Animalia
 Filum : Arthropoda
 Kelas : Insecta
 Ordo : Coleoptera
 Famili : Tenebrionidae
 Genus : *Tenebrio*
 Spesies : *Tenebrio molitor* L.



Gambar 2. Siklus Hidup *Tenebrio molitor* L. A.Telur; skala 500 μ m, B.Larva, C.Pupa, D. Dewasa

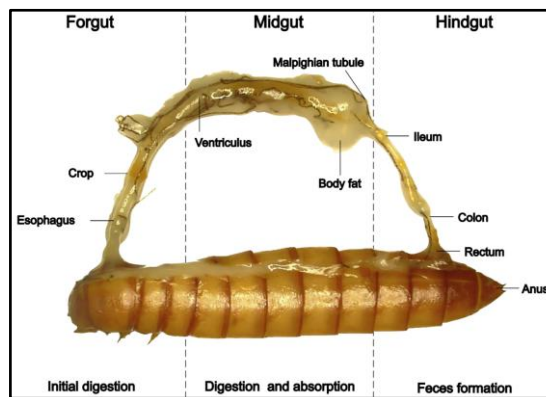
Sumber : Syahrulawal *et al.*, 2023

Tenebrio molitor L. adalah serangga holometabolik dengan empat tahap metamorfosis yang jelas, yaitu telur, larva, pupa, dan dewasa seperti pada Gambar 1. Telur menetas dan menjadi larva setelah 3–9 hari pada suhu 25°C. Larva yang baru menetas berwarna putih pucat dan memiliki panjang antara 0,34 cm hingga 3,16 cm pada instar ke-20. Larva memiliki bentuk memanjang dan silindris, dengan larva dewasa memiliki berat rata-rata 0,2 g, tubuh yang telah mengeras, dan memiliki enam kaki di belakang kepala serta dua tonjolan kecil di ujung abdomen. Tahap larva biasanya berlangsung selama dua hingga empat bulan, tergantung pada suhu pertumbuhan dan ketersediaan pakan. Larva akhirnya berhenti makan dan membentuk pupa, selama tahap ini serangga mengalami metamorfosis dan berubah menjadi dewasa. Tahap pupa berlangsung sekitar 5–9 hari, setelah itu kumbang dewasa muncul dan kawin untuk memulai siklus kembali. Umur dewasa berkisar antara 37–97 hari (Syahrulawal *et al.*, 2023).

Ulat Hongkong lebih dikenal dengan sebutan *Meal Worm* atau *Yellow Meal Worm* dan merupakan larva dari. Ulat ini dijumpai pada toko pakan burung, ikan-ikanan, reptil dan ternak lainnya. Ulat ini sering dijadikan sebagai suplemen atau makanan utama pada hewan-hewan peliharaan dalam bentuk masih hidup maupun

berbentuk pelet. Ulat Hongkong dijadikan sebagai pakan favorit karena memiliki kandungan nutrisi yang baik untuk hewan ternak. Kandungan *Tenebrio molitor* dalam larva *Tenebrio molitor* ini meliputi protein kasar 37,80%, lemak kasar 28,63%, kadar abu 13,36%, serat kasar 7,28%, dan bahan kering 84,31% (Kusuma *et al.*, 2022).

Tenebrio molitor L. diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi sampah *styrofoam*. Menurut Yang *et al.*, (2015) bakteri *Exiguobacterium* sp. YT2 pada usus larva *Tenebrio molitor* L. berperan penting dalam degradasi *styrofoam*. *Styrofoam* dihancurkan menjadi fragmen kecil dan tertelan ke dalam usus. Kemudian fragmen *polystyrene* yang terdegradasi atau mengalami mineralisasi diubah menjadi CO₂ dan karbon yang dihasilkan melalui proses asimilasi sebagai biomassa. Residu fragmen *styrofoam* dan zat lainnya oleh bakteri usus disekresikan menjadi fecula (Maha *et al.*, 2022).



Gambar 3. Saluran Pencernaan *Tenebrio molitor* L.

Sumber : Syahrulawal *et al.*, 2023

Hasil penelitian (Ica *et al.*, 2022), larva Tenebrionidae memiliki beberapa bakteri di usus tengahnya, yang memungkinkan mereka untuk menguraikan sampah *styrofoam* (polistirena). Diketahui bahwa larva mampu memakan dan mencerna plastik seberat 1 gram dalam waktu yang lama yaitu 3-5 hari. Larva dapat memakan plastik secara berlebihan untuk memenuhi kebutuhan energinya yang meningkat di lingkungan yang dingin dan bersuhu rendah (Matyja *et al.*, 2020).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2025 hingga Desember 2025 di Laboratorium Biologi Terpadu dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat tiga jenis alat diantaranya alat gelas (gelas ukur, gelas kimia, gelas arloji, pipet ukur, cawan petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, batang pengaduk, objek glass, kaca preparat), alat non gelas (ose bulat, scalpel, spoit, mikropipet, tip, labu semprot, gegep, bunsen, rak tabung reaksi, spatula, sendok tanduk), alat instrumen (water bath, spektrofotometer, shaker rotator, mikroskop, vortex, timbangan analitik, Laminar Air Flow (LAF), lemari pendingin, hot plate, inkubator, oven), dan alat non instrumen yaitu enkas dan autoklaf.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu larva Ulat Hongkong *Tenebrio molitor* L. berumur 25 hari, media selektif *Mineral Salt Medium* (0.2 gr NaH_2PO_4 , 0.05 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gr KH_2PO_4 , 0.05 gr *Ammonium Sulfate*, 0.02 gr CaCl_2 , 0.5 gr *Peptone*, 8 gr Agar), pewarna gram (Kristal Violet, Iodin, Alkohol-Aseton, dan Safranin), alkohol 70%, aquades, diklorometana, cloroform, 0.2% Sarkosyl, minyak emersi, *styrofoam*, kapas, aluminium foil, *cling wrap*, plastic steril, dan label.

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel Larva Ulat Hongkong *Tenebrio molitor* L.

Pengambilan sampel larva ulat hongkong *Tenebrio molitor* L. diambil di Pondok Ulat Hongkong Risma Mustafa tepatnya di Dusun Mattiro Deceng, Kabupaten Maros. Larva ulat hongkong *Tenebrio molitor* L. yang diambil adalah larva yang berumur 25 hari. Kemudian sampel larva dibawa ke laboratorium untuk dilakukan tindakan lebih lanjut.

2.3.2 Pemeliharaan Larva Ulat Hongkong *Tenebrio molitor* L.

Larva ulat hongkong dibagi 2 kelompok, yaitu kelompok 54 dan kelompok 110 yang berumur 25 hari dipelihara selama 24 hari dengan 3 hari merupakan fase adaptasi. Pada fase adaptasi selama 24 jam diberikan pakan dedak dan sekam perbandingan 1:1 dengan berat masing-masing pakan adalah 6,4 gram. Setelah 24 jam, pakan adaptasi diganti dengan diberikan pakan ampas tahu (6,4 gram) yang dicampur dengan *styrofoam* butiran (6,4 gram) selama 48 jam. Setelah fase adaptasi, kedua kelompok ulat mulai diberikan *styrofoam* sebagai pakan utama dan kelompok

ulat 54 diberikan tambahan dedak sebanyak 1,2 gram selama 21 hari, serta kelompok kontrol yang hanya diberikan pakan dedak dan sekam perbandingan 1:1.

2.3.3 Pembuatan Larutan Emulsi *Styrofoam*

Larutan emulsi *styrofoam* dibuat dengan melarutkan 2 g *styrofoam* ke dalam 40 ml diklorometana, kemudian ditambahkan 2 ml sarkosyl 2% dan 100 ml aquades. Larutan yang diperoleh disonikasi selama 10 menit (*Sonics Vibra Cell VCX500*) untuk menguapkan diklorometana. Kemudian larutan emulsi *styrofoam* yang telah disonikasi dimasukkan kedalam *water bath* pada suhu 80° C selama 2 jam.

2.3.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

2.3.4.1 Metode Panas Kering

Sterilisasi dengan metode panas kering dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 180° C selama 2 jam. Metode panas kering digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas seperti gelas arloji, cawan petri, dan tabung reaksi.

2.3.4.2 Metode Panas Membara

Sterilisasi dengan metode panas membara dilakukan dengan menggunakan api bunsen. Metode panas membara digunakan untuk mensterilkan alat berupa jarum ose. Sterilisasi dilakukan dengan cara jarum ose dilidahkan di atas nyala api bunsen hingga merah membara.

2.3.4.3 Metode Panas Basah

Sterilisasi dengan metode panas basah dilakukan dengan menggunakan autoklaf yang dilengkapi dengan katup pengaman, pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm. Metode panas basah digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan . Sterilisasi alat dan bahan dilakukan selama 15 menit.

2.3.5 Pembuatan Media

2.3.5.1 Media MSMA (*Mineral Salt Medium Agar*)

Sebanyak 0.2 gr NaH_2PO_4 , 0.05 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gr KH_2PO_4 , 0.05 gr *Ammonium Sulfate*, 0.02 gr CaCl_2 , 0.5 gr *Peptone*, 8 gr Agar, 10 mL larutan emulsi *styrofoam* dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.5.2 Media MSMB (*Mineral Salt Medium Broth*)

Sebanyak 0.2 gr NaH_2PO_4 , 0.05 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gr KH_2PO_4 , 0.05 gr *Ammonium Sulfate*, 0.02 gr CaCl_2 , 0.5 gr *Peptone*, 10 mL larutan emulsi *styrofoam* dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.6 Isolasi Bakteri Pendegradasi Styrofoam

Sampel larva ulat hongkong *Tenebrio molitor* L. yang telah dipelihara selama 21 hari kemudian dibersihkan dan dibelah dari kepala hingga rektum untuk diambil bagian anatomi keseluruhan, selanjutnya bagian anatomi dibagi menjadi tiga bagian yaitu depan (D), tengah (T), belakang (B). Kemudian ketiga bagian tersebut diletakkan dalam gelas arloji steril dan ditambahkan aquades steril untuk dilakukan pengenceran bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Selanjutnya, diambil 1 mL dari semua tingkat pengenceran untuk diinokulasikan ke media MSMA dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*). Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 3×24 jam. Pertumbuhan bakteri pendegradasi ditandai dengan adanya koloni halus berwarna putih yang terbentuk pada media.

2.3.7 Pemurnian Bakteri Pendegradasi Styrofoam

Pemurnian dimulai dengan memilih koloni-koloni halus berwarna putih. Koloni bakteri tersebut kemudian diinokulasikan pada media MSMA dengan metode gores sinambung untuk mendapatkan koloni murni. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3×24 jam. Tahap pemurnian ini dapat dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni bakteri yang benar-benar murni.

2.3.8 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Pendegradasi Styrofoam

Setelah tahap pemurnian, setiap koloni murni yang tumbuh pada media MSMA kemudian dilakukan inokulasi pada media MSMA miring sebagai stok untuk uji-uji selanjutnya.

2.3.9 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Pendegradasi Styrofoam

2.3.9.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Setelah dilakukan pemurnian, setiap koloni bakteri yang tumbuh pada media MSMA kemudian diamati morfologinya. Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan mengamati secara langsung dibawah mikroskop stereo dengan perbesaran 1000. Adapun hal-hal yang diamati meliputi bentuk koloni (*shape*), bentuk tepian (*margin*), warna (*colour*), dan permukaan koloni (*elevation*).

2.3.9.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri

Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan melakukan teknik pewarnaan gram. Pewarnaan gram diawali dengan dibuat ulasan bakteri pada permukaan kaca preparat menggunakan ose bulat, lalu dilakukan fiksasi menggunakan bunsen. Kemudian, sebanyak 2-3 tetes gram A (*crystal violet*), ditetaskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, sebanyak 2-3 tetes Gram B (larutan Iodin) ditetaskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Ulasan bakteri pada permukaan kaca preparat

selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan didiamkan selama 30 detik. Kaca preparat kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu sebanyak 2-3 tetes larutan safranin ditetaskan pada preparat dan didiamkan selama 30 detik. Kaca preparat kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir, diamati di bawah mikroskop yang terlebih dahulu telah ditambahkan minyak imersi. Hasil pewarnaan bakteri Gram positif ditandai dengan koloni berwarna ungu, dan bakteri Gram negatif ditandai dengan koloni berwarna merah.

2.3.10 Seleksi Isolat Unggul Berdasarkan Nilai *Optical Density* (OD)

Seleksi isolat unggul dilakukan berdasarkan kemampuan pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan oleh nilai *Optical Density* (OD). Isolat bakteri hasil tahap isolasi diremajakan pada media MSMB selama 3×24 jam pada suhu 30°C, kemudian masing-masing diinokulasikan ke dalam media MSMB yang baru. Kultur diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan inkubator shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 3×24 jam. Pertumbuhan bakteri diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm (λ 580 nm). Isolat dengan nilai OD tertinggi dan pola pertumbuhan paling stabil ditetapkan sebagai isolat unggul untuk tahap penelitian selanjutnya.

2.3.11 Pembuatan Lempeng *Styrofoam*

Ditimbang sebanyak 10 gr *styrofoam* kemudian dilarutkan kedalam 150 mL *cloroform* lalu dicetak pada wadah aluminium yang permukaannya datar dan didiamkan selama 24 jam di suhu ruang agar membentuk sebuah lempengan.

2.3.12 Uji Viabilitas

2.3.12.1 Persiapan Kultur Bakteri Pendegradasi *Styrofoam*

Diinokulasikan sebanyak 1 mL masing-masing isolat bakteri yang telah diseleksi yang diambil dari stok kultur ke dalam media MSMB 50 mL kemudian dishaker selama 3×24 jam pada suhu ruang. Pra kultur bertujuan untuk meremajakan isolat bakteri yang diperoleh dari stok kultur.

2.3.12.2 Pengukuran Kurva Pertumbuhan

Diinokulasikan sebanyak 1 mL masing-masing kultur bakteri yang diperoleh dari hasil pra kultur ke dalam media MSMB 100 mL kemudian dishaker selama 8×24 jam pada suhu ruang. Dilakukan pengukuran pada awal inkubasi menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm (λ 580 nm). Dikalibrasi alat spektrofotometer menggunakan blanko. Setelah itu, sebanyak 5 mL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Setelah dikalibrasi, dimasukkan tabung reaksi kecil yang berisi suspensi bakteri ke dalam spektrofotometer untuk mengukur OD (*Optical Density*). Dilanjutkan pengukuran dengan interval waktu 24 jam selama 8×24 jam untuk menghitung tingkat pertumbuhannya. Dilakukan pengukuran sampai hasilnya mendapatkan minimal dua kali nilai transmittan yang sama.

2.3.12.3 Laju Degradasi Berdasarkan Kurva Pertumbuhan

Penentuan laju degradasi *styrofoam* dilakukan berdasarkan kurva pertumbuhan isolat bakteri unggul. Isolat terpilih diinokulasikan ke dalam MSMB kemudian diinkubasi selama 7×24 jam pada suhu 30°C menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm. Pertumbuhan bakteri dipantau dengan mengukur nilai OD (λ 580 nm) secara berkala pada interval waktu 48 jam, 96 jam, 144 jam untuk membentuk kurva pertumbuhan bakteri yang meliputi fase lag, eksponensial, stasioner, dan kematian. Pengukuran laju degradasi *styrofoam* dilakukan dengan membandingkan parameter degradasi pada setiap fase pertumbuhan, sehingga dapat ditentukan fase pertumbuhan bakteri yang menunjukkan laju degradasi *styrofoam* tertinggi.

2.3.12.4 Uji Degradasi Bakteri Pendegradasi *Styrofoam*

Uji degradasi *styrofoam* dilakukan menggunakan isolat bakteri unggul yang telah dikultur terlebih dahulu. Kultur bakteri selanjutnya diinokulasikan sebanyak 5 mL ke dalam MSMB 25 mL yang baru untuk masing-masing isolat. Kemudian dimasukkan ke dalam setiap media lempeng *styrofoam* steril berukuran 1 × 1 cm sebagai sumber karbon. Kultur kemudian diinkubasi menggunakan shaker pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm selama 20 hari. Setelah masa inkubasi, lempeng *styrofoam* diambil dan dibersihkan dari sisa biomassa bakteri, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80°C selama 2 jam hingga diperoleh berat kering konstan. Berat kering *styrofoam* selanjutnya digunakan untuk menentukan tingkat degradasi *styrofoam* oleh isolat bakteri uji.