



Isolasi Bakteri Penghasil Lipase dan Protease yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi dari Limbah Biomedis Cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang

Isolation of Lipase- and Protease-Producing Bacteria Potential as Bioremediation Agent from Liquid Biomedical Waste of Puskesmas Halmahera in Semarang City

Nisa Arifiani¹, Stalis Norma Ethica²

Program Studi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Semarang

¹nisaarifiani1@gmail.com, ²norma@unimus.ac.id

Abstrak

Upaya meningkatkan kualitas kesehatan masyarakat di wilayah kecamatan di Indonesia dilakukan dengan mendirikan berbagai Pusat Kesehatan Masyarakat (Puskesmas). Jumlah Puskesmas yang terus bertambah menciptakan risiko meningkatnya kuantitas limbah biomedis. Limbah biomedis berbahaya karena bersifat infeksius sehingga menimbulkan resiko kesehatan dan mudah mengkontaminasi limbah lain apabila tidak diolah dengan baik. Sebagian besar pengolahan limbah biomedis dengan menggunakan IPAL, namun hanya sedikit Puskesmas yang memiliki IPAL. Bioremediasi merupakan suatu cara yang dapat digunakan untuk mengelola limbah dengan memanfaatkan bakteri indigen penghilang kontaminan. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri indigen penghasil enzim lipase dan protease dan melakukan seleksi patogenitas terhadap isolat bakteri sehingga dapat digunakan sebagai agen bioremediasi limbah biomedis Puskesmas. Kultivasi dan purifikasi koloni bakteri dari sampel limbah cair Puskesmas Halmahera dilakukan pada media *Nutrient Agar* (NA). Seleksi patogenitas bakteri dilakukan dengan media *MacConkey* (MC) dan *Blood Agar Plate* (BAP). Selanjutnya seleksi bakteri proteolitik dilakukan dengan media *Skim Milk Agar* (SMA), sedangkan seleksi bakteri lipolitik dilakukan dengan media *Tributirin 1%*. Proses isolasi bakteri indigen dari limbah biomedis menghasilkan 7 isolat, yaitu H1- H7. Dari hasil seleksi patogenitas diperoleh 3 isolat bakteri yang bersifat tidak patogen H2, H3, H5 dan 1 isolat bakteri dengan tingkat patogenitas rendah H1. Hasil seleksi penghasilan enzim proteolitik menunjukkan isolat H5 mampu menghasilkan enzim protease, sedangkan hasil seleksi penghasilan enzim menunjukkan bahwa dua isolat, yaitu H1 dan H3 mampu menghasilkan enzim lipase. Dapat disimpulkan bahwa dari hasil penelitian ini isolat bakteri H1, H3 dan H5 merupakan isolat bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi limbah biomedis cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang.

Kata kunci: Bioremediasi, limbah Puskesmas, bakteri proteolitik, bakteri lipolitik, limbah biomedis.

Abstract

Efforts to improve the quality of community health in the sub-district area in Indonesia were carried out by establishing Community Health Centers (Puskesmases). The increasing number of Puskesmas creates the risk of increasing the quantity of biomedical waste. Biomedical waste is dangerous because it is infectious leading to health risks and easily contaminates other wastes if not treated properly. Most of the biomedical waste processing utilizes IPAL, but not all Puskesmases have IPAL. Bioremediation is a method that could be used to manage waste by utilizing contaminant-inducing oxygen bacteria. This study aims to obtain indigenous bacteria isolates producing lipase and protease enzymes and to determine their pathogenicity levels, so they could be used as a biomedical waste bioremediation agent at the Puskesmas. Cultivation and purification of bacterial colonies from Halmahera Public Health Center wastewater samples were carried out on Nutrient Agar (NA) media. Bacterial pathogenicity selection was carried out with MacConkey (MC) and Blood Agar Plate (BAP) media. Then the selection of proteolytic bacteria was carried out with Skim Milk Agar (SMA) media, while the selection of lipolytic bacteria was carried out on Tributyrin medium. The process of isolating indigenous bacteria from biomedical waste produced 7 isolates, namely H1-H7. From the results of pathogenicity tests, 3 isolates of non-pathogenic bacteria H2, H3, H5 and 1 isolate of bacteria with a low pathogenicity level H1 were obtained. Proteolytic enzyme income selection results showed that H5 isolate was able to produce protease, while two other isolates, namely H1 and H3 were able to produce lipase. As conclusion, indigenous bacterial



isolates H1, H3 and H5 obtained from this study have the potential as bioremediation agents for liquid biomedical waste of Puskesmas Halmahera of Semarang City.

Keywords: *Bioremediation, Puskesmas wastewater, proteolytic bacteria, lipolytic bacteria, biomedical waste.*

PENDAHULUAN

Puskesmas merupakan unit pelaksana teknis (UPT) dari dinas kesehatan kabupaten/kota yang bertanggungjawab menyelenggarakan pembangunan kesehatan disatu atau sebagian wilayah kecamatan (Kepmenkes, 2004). Dalam pelaksanaannya Puskesmas menghasilkan limbah antara lain limbah biomedis. Aktivitas layanan kesehatan yang tinggi akan meningkatkan jumlah limbah biomedis yang dihasilkan. Limbah biomedis merupakan padatan, cairan, benda tajam, limbah laboratorium, dan kontainer obat yang dihasilkan sebagai hasil kegiatan kesehatan baik untuk manusia maupun hewan (Ethica, 2018). Limbah biomedis berbahaya karena banyak mengandung virus, jamur, bahan kimia beracun, dan bahan radioaktif (Mwaikono dkk., 2015).

Pengolahan limbah biomedis di Indonesia kebanyakan dengan membangun Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL). Namun pembangunan IPAL memerlukan biaya yang sangat tinggi (Mora dkk., 2015). Pusat layanan kesehatan termasuk rumah sakit dan puskesmas kebanyakan menggunakan insinerator dalam mengolah limbah biomedis (Gautam dkk., 2010; Glasser dkk., 1991). Namun penggunaan insinerator menyebabkan permasalahan pencemaran udara dan kebisingan serta efek rumah kaca (Habibi, 2015; DKP, 2018).

Air limbah rumah sakit merupakan akumulasi limbah domestik dan limbah biomedis cair dengan polutan organik berkadar tinggi, sehingga dapat diolah secara biologi (Mora dkk., 2015). Bioremediasi merupakan remediasi biologis yang melibatkan organisme hidup termasuk bakteri untuk mengurangi atau menghilangkan polutan pada daerah terkontaminasi, yang menghasilkan pemulihan ke keadaan semula tanpa gangguan lebih lanjut terhadap lingkungan lokal (Ali dkk., 2009; McKew dkk., 2007; Vidali, 2001). Agen biologis utama pada proses bioremediasi yaitu mikroorganisme dan enzim (Prihati, 2012). Kelompok enzim hidrolase atau disebut juga enzim hidrolitik dan enzim oksidoreduktase merupakan enzim yang paling banyak dieksplorasi untuk keperluan bioremediasi (Piotrowska, 2005).

Untuk mendapatkan agen biologis utama pada proses bioremediasi dapat dilakukan dengan kultivasi dan purifikasi koloni bakteri dari sampel limbah cair Puskesmas Halmahera pada media *Nutrient Agar* (NA). Seleksi patogenitas bakteri dilakukan dengan media MacConkey dan *Blood Agar Plate* (BAP). Selanjut seleksi bakteri proteolitik dilakukan dengan media *Skim Milk Agar* (SMA), sedangkan seleksi bakteri lipolitik dilakukan dengan media *Tributirin 1%*.

Penelitian mengenai bakteri indigen penghasil enzim hidrolitik pada Rumah Sakit telah dilakukan sebelumnya (Ethica dkk., 2018). Namun hingga saat ini belum pernah dilaporkan pengembangan agen bioremediasi dari kelompok bakteri tersebut untuk menangani limbah biomedis puskesmas. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang bertujuan memanfaatkan bakteri indigen penghasil lipase dan protease sebagai agen bioremediasi limbah puskesmas. Penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan bakteri indigen penghasil lipase dan protease sebagai agen bioremediasi limbah biomedis puskesmas.

TINJAUAN PUSTAKA

Bioremediasi

Bioremediasi merupakan salah satu alternatif pengelolaan limbah berbahaya yang ekonomis, mudah dan ramah lingkungan. Teknik ini memanfaatkan aktivitas mikroorganisme untuk mengolah limbah berbahaya menjadi rendah bahayanya atau bahkan tidak berbahaya sama sekali (Juliani dan Rahman, 2011). Penggunaan organisme yang tepat dalam bioremediasi



harus digunakan pada tempat dan faktor-faktor lingkungan yang sesuai (Fuentes dkk., 2014).

Mikroorganisme dapat berupa bakteri, fungi, protozoa dan lain-lain, terdapat di berbagai tempat seperti tanah, debu, air, udara kulit dan selaput lendir (Susilowati dan listyawati, 2001). Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dan metabolit sekunder yang dapat mendegradasi bahan kompleks sehingga dapat dimanfaatkan dalam pengelolaan limbah termasuk limbah biomedis cair, selain itu bakteri nonpatogen pendegrasi limbah berperan penting dalam proses degradasi limbah biomedis sehingga mampu mengurangi mikroorganisme patogen berkembang biak (Djaja, 2006).

Isolasi dan Seleksi Bakteria dengan Kemampuan Bioremediasi

Kultivasi dan purifikasi koloni bakteri dari sampel limbah cair dilakukan pada media NA. Media NA merupakan media umum yang dapat digunakan untuk mengkultivasi berbagai jenis bakteri. Pepton, *yeast*, *beef extract* yang terdapat dalam media berfungsi sebagai sumber nitrogen, sumber karbon, sumber vitamin untuk mendukung pertumbuhan bakteri (Himedia, 2003).

Seleksi patogenitas dapat dilakukan menggunakan media selektif bakteri patogen, yaitu MC dan BAP (Ethica dkk., 2017). Bakteri nonpatogen pada media MC umumnya mampu memfermentasikan laktosa, dan pada media BAP bakteri non-patogen umumnya tidak mampu melisis darah (Ethica, 2018). Media MC merupakan media selektif karena mengandung garam empedu (*bile salts*) dan crystal violet yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Media MC juga merupakan media diferensial karena mampu membedakan bakteri berdasarkan kemampuan memfermentasi laktosa (Leboffe dan Pierce, 2011). Media MC mengandung indikator pH berupa *Neutral red*, sehingga bakteri yang termasuk laktosa fermenter dalam suasana asam akan menghasilkan warna merah muda.

Media BAP merupakan media diperkaya karena mengandung 5% darah, sehingga medium ini mampu mengisolasi dan mengkultivasi berbagai macam bakteri yang umumnya sulit ditumbuhkan. Media BAP juga termasuk media diferensial karena dapat membedakan bakteri berdasarkan kemampuan dalam menghemolisis sel darah merah (Willey dkk., 2009). Ada 3 tipe hemolisis yaitu, β -hemolisis, α -hemolisis, γ -hemolisis. Bakteri dengan tipe β -hemolisis mampu mendestruksi sel darah merah dan hemoglobin secara sempurna sehingga menghasilkan zona jernih disekitar koloninya. Bakteri α -hemolisis mendestruksi sel darah sebagian sehingga menghasilkan warna hijau disekitar koloni. Bakteri γ -hemolisis tidak mampu mendestruksi sel darah merah sehingga tidak mampu mengubah warna media di sekitar koloni (Leboffe dan Pierce, 2011).

Enzim Hidrolitik dan Bioremediasi Limbah Biomedis

Enzim yang paling banyak digunakan untuk bioremediasi adalah enzim kelompok hidrolitik dan oksidoreduktase (Piotrowska, 2005). Contoh enzim hidrolitik yaitu protease, selulase, esterase, lipase, fosfatase, kutinase, dan amilase. Enzim protease dan lipase merupakan salah satu enzim yang penting untuk mendegradasi biomassa dan bahan organik (Schmidt, 2006, Ethica dan Sabdono, 2017).

Enzim protease merupakan enzim pemecah protein, yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polipeptida pada molekul protein (polipeptida) sehingga menghasilkan peptide dan asam amino (Ward, 1983). Isolasi dan kultivasi bakteri proteolitik dapat dilakukan dengan kultur pada media SMA. Susu skim pada media SMA mengandung protein susu kasein yang merupakan sumber nutrisi yang digunakan bakteri proteolitik. Pada proses degradasi kasein oleh bakteri, diharapkan enzim protease ekstraseluler yang disekresi bakteri mampu menghasilkan zona bening di sekitar koloni (Ethica, 2018, Ethica dkk., 2018).

Enzim lipase merupakan enzim yang bekerja untuk menghidrolisis lemak dan minyak menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu asam lemak (Supriyatna dkk., 2015; Bestari dan



Suharjono, 2016). Isolasi bakteri lipolitik dilakukan dengan media yang mengandung lemak atau media agar yang mengandung tributirin 1%, bakteri yang menghasilkan zona bening disekeliling koloni merupakan indikasi penghasil enzim lipase oleh bakteri (Ethica dkk., 2018).

METODE

Alat dan Bahan

Bahan utama untuk isolasi, perhitungan, pemurnian dan seleksi isolat bakteri adalah sampel limbah biomedis cair rumah sakit dari bak penampung primer pada Puskesmas Halmahera Kota Semarang, akuades steril, medium *Nutrient Agar* (Sigma, Jerman), *MacConkey*, agar darah (ketiganya dari Thermo Scientific, UK), agar tributirin (Sigma, Jerman), agar susu skim (Sigma, Jerman), dan $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Jerman), dan pepton. Bahan untuk identifikasi morfologi adalah *Gram-staining reagent set* (Merck, Jerman).

Alat utama dalam sampling adalah botol 100-ml dengan *Teflon-lined septum caps* steril, kantong plastik *zip* dan pendingin. Untuk isolasi, pemurnian dan seleksi isolat bakteri, alat utamanya adalah cawan petri, tabung reaksi bertutup steril, laminar UV, mikroskop binokular, bunsen, labu ukur, *shaker*, inkubator, dan spektroskop UV-VIS. Instrumen untuk identifikasi morfologi, mikroskop optik, *vortex*, dan sentrifugator.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Oseanografi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Diponegoro, Semarang. Variabel yang diamati adalah bakteri penghasil enzim protease dan lipase yang diisolasi dari limbah biomedis cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang. Populasi penelitian ini adalah limbah biomedis cair dari bak primer penampungan limbah Puskesmas Halmahera Kota Semarang.

Sampel limbah biomedis cair dari bak primer Puskesmas Halmahera Kota Semarang diencerkan terlebih dahulu dengan NaCl fisiologis. Sampel limbah biomedis cair diencerkan dengan seri 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Setelah dilakukan pengenceran kemudian sampel dikultur pada media NA dengan teknik *spread*. Setiap koloni bakteri unik yang diperoleh dipurifikasi sebanyak 3 kali pada media NA sehingga diperoleh koloni yang murni. Untuk memastikan koloni sudah murni dan untuk mengetahui bentuk morfologi sel-selnya dilakukan pewarnaan Gram..

Untuk uji patogenitas, setiap koloni bakteri berbeda yang diperoleh pada media NA dilakukan uji patogenitas pada media MC dan BAP. Media yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri nonpatogen pada media MC umumnya mampu memfermentasikan laktosa, dan pada media BAP bakteri tidak mampu meliliskan darah (γ -hemolisis). Jika isolat pada media MC tidak mampu memfermentasikan laktosa (NLF) tetapi pada media BAP tidak mendegradasi sel darah merah (γ -hemolisis), isolat tersebut dianggap memiliki sifat patogenitas relatif rendah.

Isolat dengan patogenitas rendah ditumbuhkan pada media tributirin dan susu skim. Inokulum hasil purifikasi diambil dengan ose mata, digores pada media tributirin dan susu skim dengan metode kuadran, dan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Morfologi koloni yang tumbuh kemudian diamati. Bakteri yang dapat tumbuh dan menghasilkan zona bening di sekeliling koloni pada media tributirin digolongkan sebagai penghasil lipase. Bakteri yang dapat tumbuh dan menghasilkan zona bening di sekeliling koloni pada media susu skim digolongkan sebagai penghasil protease.

HASIL DAN PEMBAHASAN

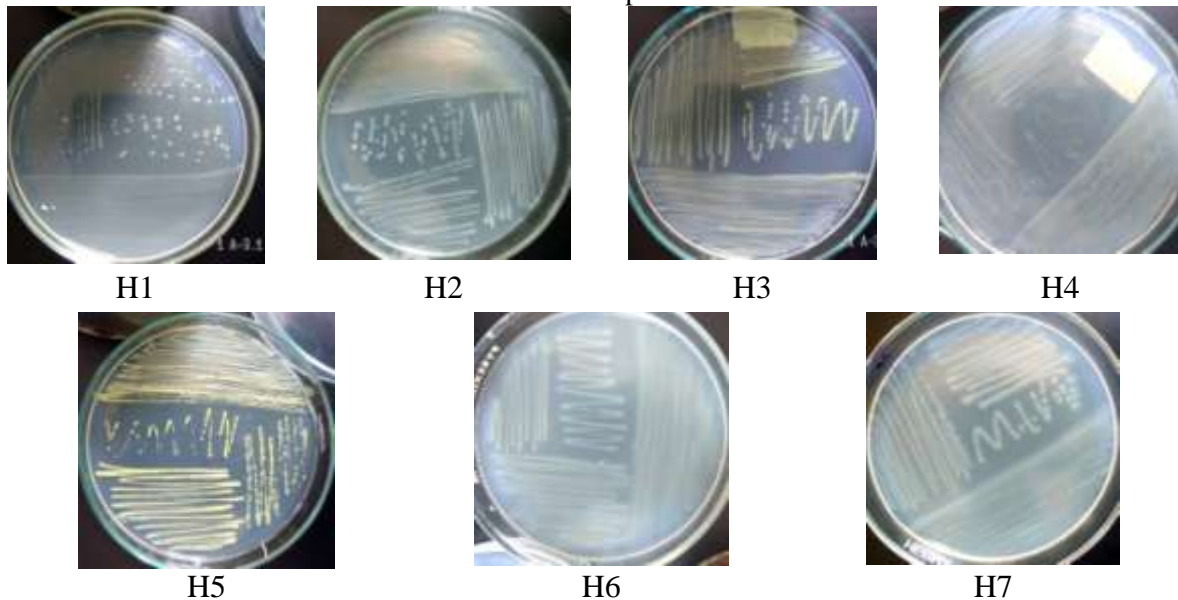
Dari sampel limbah biomedis cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang ditemukan 7 isolat dengan bentuk koloni yang berbeda pada media NA (Tabel 1. dan Gambar 1). Sementara itu,

koloni bakteri hasil isolasi diidentifikasi karakteristik morfologi selnya dengan pewarnaan Gram (Darmawati dkk., 2014; Darmawati dkk., 2015). Hasil karakteristik morfologi sel 7 isolat bakteri yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1:
Karakteristik Morfologi Koloni

Nama Isolat	Kode Isolat	Bentuk	Warna	Ukuran (cm)	Tepi	Elevasi
H1	1.A ⁻³ .1	<i>Round</i>	Putih keruh	0,2	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
H2	1.A ⁻³ .2	<i>Round</i>	Bening	0,2	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
H3	1.A ⁻³ .3	<i>Round</i>	Kuning bening	0,3	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
H4	1.A ⁻³ .4	<i>Round</i>	Bening	0,05	<i>Smooth</i>	<i>Flat</i>
H5	2.A ⁻³ .2	<i>Round</i>	Kuning	0,1	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
H6	2.A ⁻³ .2	<i>Round</i>	Putih	0,05	<i>Smooth</i>	<i>Flat</i>
H7	2.A ⁻³ .3	<i>Round</i>	Putih keruh	0,1	<i>Smooth</i>	<i>Flat</i>

Gambar 1:
Hasil isolasi bakteri pada media NA



Tabel 2:
Karakteristik morfologi sel

Nama Isolat	Kode Isolat	Bentuk	Susunan	Hasil Pengecatan Gram
H1	1.A ⁻³ .1	Basil	Soliter	Gram-positif
H2	1.A ⁻³ .2	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif
H3	1.A ⁻³ .3	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif
H4	1.A ⁻³ .4	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif
H5	2.A ⁻³ .1	<i>Coccus</i>	Berderet	Gram-negatif
H6	2.A ⁻³ .2	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif
H7	2.A ⁻³ .3	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif

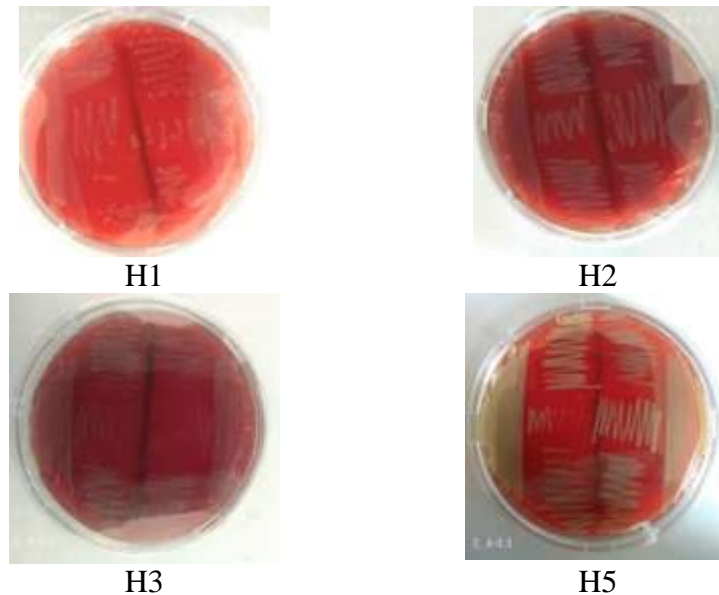
Setelah proses purifikasi koloni, isolat murni dari media NA diuji tingkat patogenitasnya dengan media MC dan BAP. Bakteri nonpatogen pada media MC mampu memfermentasikan laktosa, yaitu H2, H3, H5. Sedangkan pada media BAP bakteri tidak

mampu melisiskan sel darah merah (γ -hemolisis), yaitu H1, H2, H3, H5. Jadi di temukan 4 isolat yang nonpatogen, yaitu H1, H2, H3, H5. Hasil seleksi bakteri patogenitas bakteri pada media MC dapat dilihat pada Gambar 2 dan pada media BAP pada Gambar 3.

Gambar 2:
Hasil seleksi bakteri *lactose fermenter* pada media MC

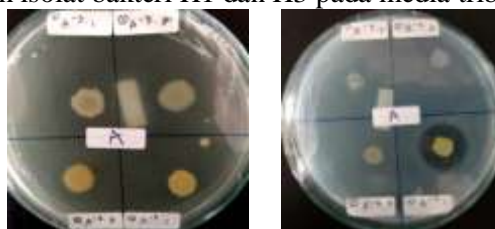


Gambar 3:
Isolat bakteri yang menunjukkan pola γ -hemolisis pada media BAP



Selanjutnya isolat bakteri yang tingkat patogenitasnya rendah dan atau nonpatogen di kultur pada media SMA dan Tributirin dengan hasil 1 isolat bakteri proteolitik H5, dan 2 isolat bakteri lipolitik H1 dan H3 (Gambar 4).

Gambar 4:
A Pembentukan zona bening oleh isolat bakteri H5 pada media SMA. B. Pembentukan zona bening oleh isolat bakteri H1 dan H3 pada media tributirin





Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh bakteri indigen penghasil enzim lipase dan protease dengan tingkat patogenitas rendah dari limbah biomedis puskesmas. Menurut Ethica (2018), bakteri dengan karakteristik tersebut berpotensi untuk dijadikan agen bioremediasi limbah biomedis cair. Namun sebelum dapat digunakan sebagai agen bioremediasi maka uji lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan bakteri dalam memperbaiki parameter limbah cair seperti pH, COD, BOD, TSS, TDS dan lain-lain (Ethica dkk., 2017; Ethica dkk., 2018).

KESIMPULAN

Dari limbah biomedis cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang dapat diperoleh 3 isolat bakteri bersifat tidak patogen yaitu H2, H3, H5 dan 1 isolat bakteri dengan tingkat patogenitas rendah, yaitu H1. Dari 4 isolat tersebut, isolat H5 mampu menghasilkan enzim protease, sedangkan isolat H1 dan H3 mampu menghasilkan enzim lipase. Dengan demikian isolat bakteri H1, H3 dan H5 memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen bioremediasi limbah biomedis cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, N., Hameed, A. And Ahmed, S., 2009. Physicochemical characterization and bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous bacteria. *Journal of hazardous materials*, 164(1), pp.322-328.
- Bestari, N.C. and Suharjono, S., 2016. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 3(3), pp.151-155.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2015. Identifikasi bakteri batang gram negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), pp.64-70.
- Departemen Kesehatan RI, 2014, *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 128/Menkes/SK/II/2004, tentang Konsep Dasar Puskesmas*, Jakarta.
- Djaja, I. M., & Maniksulistya, D. (2006). Gambaran Pengelolaan Limbah Cair di Rumah Sakit X Jakarta Februari 2006. *Jurnal Makara-Kesehatan*, 10(2).
- DKP, 2018, Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) <http://dkp.kecamatanungungsundur.bogorkab.go.id/index.php/multisite/post/1498/pengelolaan-limbah-bahan-berbahaya-dan-beracun-b3-#WrAEaGaB3-Y>
- Ethica, S.N. Saptaningtyas, R., Muchlissin, S.I. and Sabdono, A., 2018. The development method of hospital biomedical waste using hydrolytic bacteria. *Helth and Technology*, pp.1-16.
- Ethica, S.N., *Bioremediasi Limbah Biomedik Cair*, 2018, pp 1-158, Deepublish Publisher, Yogyakarta, ISBN 978-602-475-503-4
- Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R. and Sabdono, A., 2017, Sampling Mikrobiologi Limbah Biomedis Rumah Sakit di Kota Semarang Jawa Tengah. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).
- Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R., Sabdono, A., 2018. Protease Producers Predominate Cultivable Hydrolytic Bacteria Isolated from Liquid Biomedical Waste, *Asian Journal of Chemistry* 30(9): 2035-2038 DOI: 10.14233/ajchem
- Ethica, S.N., Oedjjoni, O., Semiarti, E., Widada, J., Raharjo, T.J., 2018. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Alcaligenes javanensis* JG3 Potential as an Effective Biograder, *Biotropia* 25(1): 1-10 DOI: 10.11598/btb.2018.25.1.583.



- Fuentes, M.S., Alvarez, A., Saez, J.M., Benimeli, C.S. and Asmoroso, M.J., 2014. Methoxyclor bioremediation by defined consortium of environmental *Streptomyces* strains. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(4), pp.1147-1156.
- Gautam, V., Thapar, R., & Sharma, M. (2010). Biomedical waste management: Incinerator vs. Environmental safety. *Indian journal of medical microbiology*, 28(3): 191.
- Glasser, H., Chang, D.P.Y., dan Hickman, D.C (1991). An analysis of biomedical waste management: Incineration. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 41(9): 1180-1188. Jakarta.
- Himedia. 2003. Technical Data for Nutrient Agar. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
- Leboffe, M.J & Pierce, B.E. 2011. *A Photographic Atlas for The Microbiology Laboratory*. 4Th Edition. Morton Publishing Company. USA.
- McKew, B.A., Coulon, F., Ykimov, M.M., Denaro, R., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N. and McGenity, T.J., 2007. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6), pp.1562-1571.
- Mwaikono, K.S., Maina, S., Sebastian, A., Kapur, V., & Gwakisa, P. (2015). 16 Ssrna Amplicons Survey Revealed Unprecedented Bacterial Community in Solid Biomedical Wastes. *American Journal of Microbiological Research*, 3(4): 135-143.
- Piotrowska, A., 2005. Application of enzymes for bioremediation. Part 1. Oxidoreductases. *Ekologi i Technika*, 13(6), pp.259-265.
- Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Gracia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F. And Dannaoui, E., 2006. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), pp.340-349.
- Supriyatna, A., Jauhari, A. A., & Holydaziah, D. (2015). Aktivitas enzim amilase, lipase, dan protease dari larva *Hermetia illucens* yang diberi pakan jerami padi. *JURNAL ISTEK*, 9(2).
- Susilowati, A., & Listyawati, S. (2001). Keanekaragaman Jenis Mikroorganisme Sumber Kontaminasi Kultur In vitro di Sub-Lab. Biologi Laboratorium MIPA Pusat UNS. *Biodiversitas*, 2, 110-114.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), pp.1163-1172.
- Vidali, M., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), pp.237-241.
- Ward, O.P 1983. Proteinase. Di dalam *Microbial Enzyme and Biotechnology*. W.M. Fogart. Applied Science Publisher. New York
- Willey. I.M. Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. 2009. *Prescott's Principles of Microbiology*. McGraw-HILL Higher Education. USA.