



Potensi Bakteri Indigen Penghasil Enzim Protease dan Lipase sebagai Agen Bioremediasi Limbah Biomedis Puskesmas Tlogosari Kulon

Potential of Indigenous Bacteria Producing Protease and Lipase Enzymes as Bioremediation Agents of Biomedical Waste of Puskesmas Tlogosari Kulon

Anisa Nurul Sabrina, Stalis Norma Ethica

Program Studi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan

Universitas Muhammadiyah Semarang

sabrinaanisa5@gmail.com, norma@unimus.ac.id

Abstrak

Jumlah Puskesmas di Provinsi Jawa Tengah terus mengalami peningkatan dalam kurun 2012 – 2016 dan berpotensi meningkatkan kuantitas limbah biomedis cair yang dihasilkan. Kemampuan puskesmas dalam mengelola limbahnya masih belum memadai karena mahalnya biaya operasional IPAL (Instalasi Pengolahan Air Limbah). Polutan organik dari limbah biomedis cair umumnya masih dikelola menggunakan sistem nonbioremediasi sehingga tidak sepenuhnya ramah lingkungan. Penggunaan bakteri indigen pendegradasi bahan organik dengan tingkat patogenitas rendah hingga nonpatogen merupakan upaya untuk mengurangi polutan limbah biomedis cair melalui bioremediasi. Bakteri berkemampuan bioremediasi akan mendegradasikan polutan kompleks menjadi molekul yang tidak berbahaya atau beracun. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri indigen nonpatogen atau berpatogenitas rendah penghasil enzim protease dan lipase untuk digunakan sebagai agen bioremediasi limbah biomedis cair Puskesmas Tlogosari Kulon. Sampel bakteri dari limbah biomedis cair di Puskesmas Tlogosari Kulon diisolasi dan koloninya dipurifikasi dengan media *Nutrient Agar* (NA). Uji patogenitas bakteri dilakukan pada media *MacConkey* dan *Blood Agar Plate* (BAP), sedangkan uji penghasilan enzim hidrolitik dilakukan dengan media *Skim Milk Agar* (SMA) dan *Tributyryn Agar*. Dari hasil penelitian ini diperoleh 6 isolat bakteri hasil purifikasi koloni yaitu T1, T2, T3, T4, T5, dan T6. Hasil uji patogenitas menunjukkan 3 isolat yaitu T2, T3 dan T5 memiliki tingkat patogenitas rendah. Sedangkan hasil uji penghasilan enzim menunjukkan satu isolat yaitu T3 mampu menghasilkan enzim protease dan lipase sekaligus. Dengan demikian isolat T3 berpotensi untuk dijadikan sebagai agen bioremediasi karena memiliki karakteristik: Merupakan bakteri indigen limbah dengan tingkat patogenitas rendah dan mampu menghasilkan enzim pendegradasi bahan organik sebagai bahan utama limbah biomedis.

Kata kunci: Limbah biomedis Puskesmas, Bioremediasi limbah biomedis, Bakteri hidrolitik, Puskesmas Tlogosari Kulon

Abstract

The number of Puskesmas in Central Java Province had increased during 2012-2016 and has the potential to increase the quantity of liquid biomedical waste produced. The ability of puskesmas to manage their waste is still inadequate due to the high operational costs of the WWTP (Waterwaste Treatment Plant). Organic pollutants from liquid biomedical waste are generally managed using a non-bioremmediation systems, which are not fully environmentally friendly. The use of indigenous bacteria that could degrade organic matter with low pathogenicity to nonpathogenic levels is a way to reduce liquid biomedical waste pollutants through bioremediation. Bacteria capable of bioremediation will transform complex pollutants into harmless or toxic molecules. This study aims to isolate low-pathogenicity or non-pathogenic indigen bacteria producing protease and lipase enzymes to be used as a bioremediation agent for liquid biomedical waste at the TlogosariKulon Health Center. Bacterial samples from liquid biomedical waste at the TlogosariKulon Health Center were isolated and the colonies were purified using Nutrient Agar (NA) media. Bacterial pathogenicity tests were carried out on MacConkey and Blood Agar Plate (BAP) media, while hydrolytic enzyme income testing was carried out on Skim Milk Agar (SMA) and Tributyrin Agar media. From this study 6 bacterial isolates resulting from purification of colonies namely T1, T2, T3, T4, T5, and T6 were obtained. Pathogenicity test results showed that 3 isolates namely T2, T3 and T5 had a low level of pathogenicity. Results of enzyme production tests showed that an isolate, T3, was able to produce protease and lipase enzymes at once. Thus the T3 isolate has the potential to be used as a bioremediation agent because for its characteristics: Indigenous bacteria with low pathogenicity and capable of producing enzymes which could degrade organic matter as the main



ingredient of biomedical waste.

Keywords: *Biomedical Waste of Puskesmas, Biomedical Waste Bioremediation, Hydrolytic Bacteria, Puskesmas Tlogosari Kulon*

PENDAHULUAN

Pusat Kesehatan Masyarakat (Puskesmas) sebagai salah satu jenis fasilitas pelayanan kesehatan tingkat pertama memiliki peranan penting dalam sistem kesehatan nasional, khususnya subsistem upaya kesehatan. Profil Kesehatan Indonesia tahun 2016 menyebutkan terdapat 9.754 unit Puskesmas yang menyebar di Indonesia. Pada Tahun 2012 - 2016 di Provinsi Jawa Tengah terjadi peningkatan jumlah Puskesmas dari 873 unit menjadi 875 unit (Kemenkes RI, 2017). Semakin meningkatnya jumlah unit dari Puskesmas, semakin banyak pula kenaikan volume limbah yang dihasilkan dari Puskesmas tersebut.

Sesuai dengan Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Indonesia No.5 Tahun 2014 bahwa setiap Puskesmas diharuskan melakukan pengelolaan limbah agar tidak menimbulkan pencemaran lingkungan (Junairi, 2015). Untuk menangani limbah biomedik cair beberapa Puskesmas masih belum memiliki IPAL karena membutuhkan biaya pembangunan dan perawatan yang tinggi. Seluruh dunia polutan organik dari limbah biomedik cair umumnya dikelola menggunakan sistem non-bioremediasi karena bioremediasi bakteri hanya pada jenis polutan farmasi (Ethicadkk, 2018).

Bakteri hidrolitik khususnya yang memiliki tingkat patogenitas rendah hingga non patogen dan dapat memetabolisme zat-zat organik mempunyai peran penting dalam mempercepat proses degradasi sehingga akan mengurangi kemungkinan mikroorganisme patogen berkembang biak dan akan mengurangi bahaya infeksi dan kontaminasi akibat mikroorganisme patogen tersebut (Emmimoldkk., 2012).

Peneliti di India telah melakukan studi keanekaragaman populasi bakteri dari limbah biomedik yang mempunyai potensi sebagai agen pendegradasi terdiri dari *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, dan *K. pneumonia* masing-masing sebanyak 15%, 12%, 9%, dan 6% (Chitnisdkk., 2003 dan Anithadan Jayraad, 2017). Ethica dan Raharjo (2014) telah melaporkan karakteristik isolat bakteri yang menghasilkan hidrolitik lipase, yaitu *Alcaligenessp. JG3* yang mampu mendegradasi lemak serta gliserol. Sehingga, bakteri tersebut berpotensi menjadi agen biodegradasi dari limbah organik khususnya lemak. Potensi bakteri protease dan lipase sudah teruji, namun penggunaannya sebagai bioremediasi limbah Puskesmas, khususnya di Tlogosari Semarang belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat dari bakteri hidrolitik yang berpatogenitas rendah sampai non-patogen dari sampel limbah biomedik cair Puskesmas di Puskesmas Tlogosari Kulon yang dapat digunakan sebagai agen bioremediasi.

TINJAUAN PUSTAKA

Bioremediasi

Bioremediasi merupakan suatu proses yang melibatkan mekanisme biologis untuk mengurangi (menurunkan, detoksifikasi, termineralisasi atau mengubah) konsentrasi polutan ke keadaan tidak berbahaya (Azubuike dkk., 2016). Mikroorganisme yang ada di lingkungan tercemar akan memecahkan zat pencemar dengan proses biodegradasi dengan syarat lingkungan tersebut cocok untuk pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme tersebut (Verma dan Jaiswal, 2016). Keunggulan dari bioremediasi adalah hemat biaya dan ramah lingkungan dibandingkan dengan metode remediasi kimia dan fisik (Azubuike dkk., 2016).

Kriteria bakteri dapat dijadikan sebagai agen bioremediasiantara lain: Merupakan bakteri indigen limbah, memiliki tingkat patogenitas rendah sampai non patogen dan mampu menghasilkan enzim pendegradasi bahan utama limbah biomedis cair, yaitu karbohidrat,



lemak dan protein (Ethica dkk., 2017; Ethica dkk., 2018).

Media *MacConkey* agar (MC Agar) merupakan media diferensial yang dapat membedakan bakteri berdasarkan fermentasi laktosa (Ellen, 2005). Media ini dapat digunakan untuk uji patogenitas bakteri dengan diperkuat menggunakan media *Blood Agar Plate* (BAP) untuk mengetahui tingkat patogenitasnya melalui sifat hemolitik yang dimiliki bakteri. Pada media BAP terdapat 3 sifat hemolisis yaitu beta hemolisis (β) atau mampu menghemolisis sel darah merah secara sempurna, alfa hemolisis (α) atau dapat menghemolisis sebagian sel darah merah dan gama hemolisis (γ) atau tidak dapat menghidrolisis sel darah merah (Buxton, 2005).

Media selektif untuk menumbuhkan dan menyeleksi bakteri penghasil enzim lipase dalam mendegradasi lemak menggunakan media agar tributirin. (Ankitdkk., 2011; Prasad&Manjunath, 2011; Sirisha, Rajasekar&Narasu, 2010). Media selektif untuk menumbuhkan dan menyeleksi bakteri hidrolitik berdasarkan proses koagulasi dan proteolisis dari kasein menggunakan Media Susu Skim Agar (SMA) (Himedia, 2018). Hasil dari Media Tributirin dan SMA adalah terdapat zona bening di sekitar koloni. Pada bakteri yang dapat menghasilkan enzim lipase dan protease diameter zona bening yang dihasilkan ≥ 12 mm.

METODE

Alat dan Bahan

Bahan utama untuk isolasi, perhitungan, pemurnian dan seleksi isolate 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 coklat, 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 plastic *zip* dan pendingin. Untuk isolasi, pemurnian dan seleksi isolate bakteri, alat utamanya adalah cawan petri, tabung reaksi bertutup steril, laminar UV, mikroskop binokular, bunsen, labuukur, *shaker*, inkubator, dan spektroskop UV-VIS. Instrumen untuk identifikasi morfologi, mikroskop optik, *vortex*, dan sentrifugator.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara aseptis di bak primer limbah cair Puskesmas Tlogosari Kulon Kota Semarang sebanyak 100 ml dengan peralatan berupa botol, plastik zip, *coolbox* dan APD lengkap. Pengenceran dilakukan dengan menyiapkan 6 tabung pengecer yang diisi NaCl fisiologis masing – masing tabung sebanyak 9 ml, lalu tabung reaksi diberi label pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} dan diinokulasikan pada media NA, lalu diinkubasi 1x24 jam temperatur 37°C . Setelah proses inkubasi, setiap koloni unik yang diperoleh dipurifikasi sebanyak 3x pada media NA. Selanjutnya pengecatan Gram dilakukan pada isolat hasil purifikasi. Isolat hasil purifikasi kemudian diuji tingkat patogenitasnya dengan cara ditumbuhkan pada media MC dan BAP secara duplo dan diinkubasi 1x24 jam temperatur 37°C . Setelah proses inkubasi lalu diamati koloni pada media MC yang bersifat *lactosefermenter*, yang ditandai dengan munculnya warna violet pada media MC dan penampakan hemolisis gama (γ) pada media BAP. Setelah didapatkan isolat berpatogenitas rendah dilanjutkan proses uji penghasil enzim protease dan lipase menggunakan media SMA dan agar *Tributirin* yang diinkubasi 1x24 jam pada 37°C . Setelah proses inkubasi diamati adanya zona bening di sekitar koloni pada media SMA dan agar tributirin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

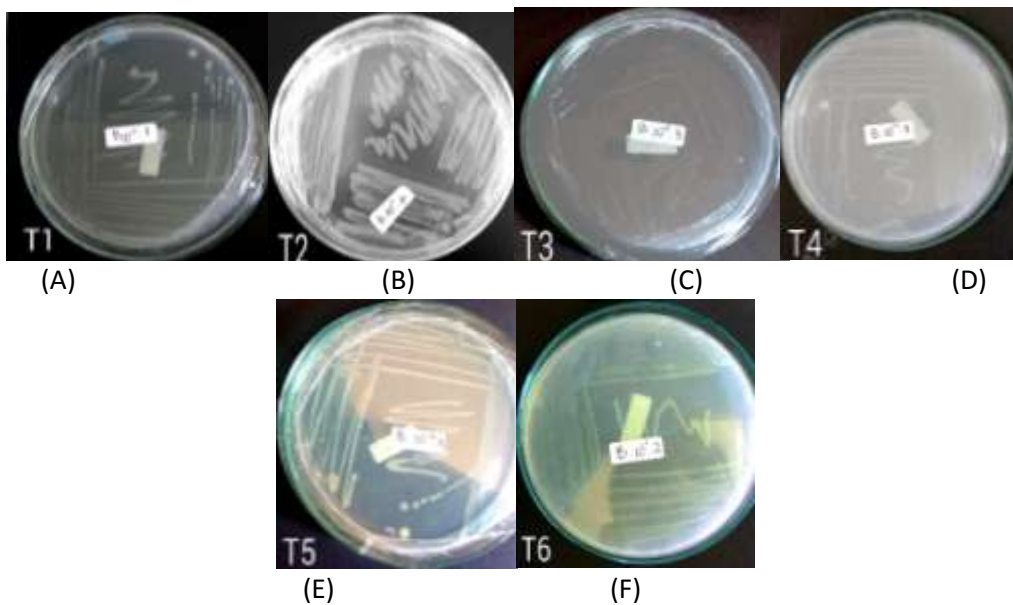
Sampel limbah biomedis cair yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari dari bak penampung primer di Puskesmas Tlogosari kulon dengan karakteristik tidak berwarna namun sedikit berbau. Hasil Isolasi dan Purifikasi yang dilakukan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 6 isolat murni yang berbeda bentuk koloninya (Tabel 1).

Tabel 1:
Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Hasil Isolasi

Nama Sampel	Diameter (cm)	Warna	Bentuk koloni	Tepi	Elevasi	Kode
T1	0,05	Kekuningan	<i>Round with scalloped margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Flat</i>	B.10 ⁰ .1
T2	0,5	Putih keruh	<i>Round with raised margin</i>	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>	B.10 ⁰ .2
T3	0,1	Putih	<i>Round</i>	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>	B.10 ⁰ .3
T4	0,05	Putih	<i>Round with scalloped margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Convex</i>	B.10 ⁻¹ .1
T5	0,1	Kuning	<i>Complex</i>	<i>Wavy</i>	<i>Flat</i>	B.10 ⁻⁴ .1
T6	0,1	Kuning	<i>Round with scalloped margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Flat</i>	B.10 ⁻¹ .2

Gambar 1:

Hasil isolasi dan purifikasi bakteri di Media NA. A. Isolat T1. B. Isolat T2. C. isolat T3. D. Isolat T4. E. Isolat T5. F. Isolat T6



Pengecatan Gram dilakukan pada setiap koloni bakteri hasil purifikasi untuk mengetahui bentuk dan keseragaman sel (Darmawati dkk., 20114; Darmawati dkk., 2015). Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2:
Hasil Pengecatan Gram Isolat Bakteri

Nama Isolat	Bentuk	Susunan	Sifat	Kode
T1	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif	B.10 ⁰ .1
T2	Basil	Berderet	Gram-negatif	B.10 ⁰ .2
T3	Basil	Soliter	Gram-negatif	B.10 ⁰ .3
T4	<i>Coccus</i>	Soliter	Gram-negatif	B.10 ⁻¹ .1
T5	Basil	Soliter	Gram-negatif	B.10 ⁻⁴ .1
T6	Basil pendek	Soliter	Gram-negatif	B.10 ⁻¹ .2

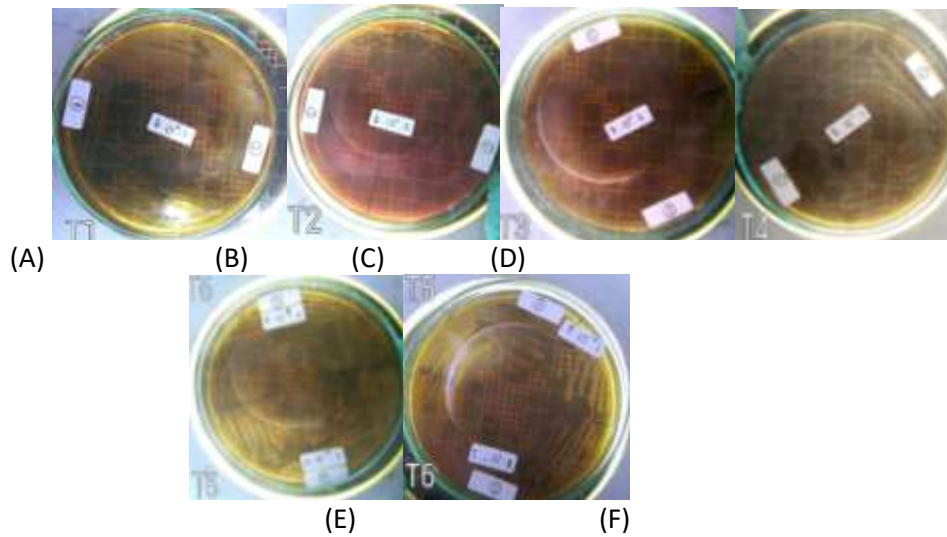
Setelah dilakukan pengecatan Gram, dilakukan uji patogenitas bakteri dengan Media MC dan BAP untuk mengetahui tingkat patogenitas suatu bakteri tersebut. Hasil uji patogenitas bakteri ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3:
Hasil Uji Patogenitas Bakteri pada Media MC dan BAP

Nama	Media MC Agar	BAP	Kode
T1	Non laktosa fermenter	<i>Alpha hemolisis</i> (α)	B.10 ⁰ .1
T2	Non laktosa fermenter	<i>Gamma hemolisis</i> (γ)	B.10 ⁰ .2
T3	Non laktosa fermenter	<i>Gamma hemolisis</i> (γ)	B.10 ⁰ .3
T4	Non laktosa fermenter	<i>Beta hemolisis</i> (β)	B.10 ⁻¹ .1
T5	Non laktosa fermenter	<i>Gamma hemolisis</i> (γ)	B.10 ⁻⁴ .1
T6	Non laktosa fermenter	<i>Beta hemolisis</i> (β)	B.10 ⁻¹ .2

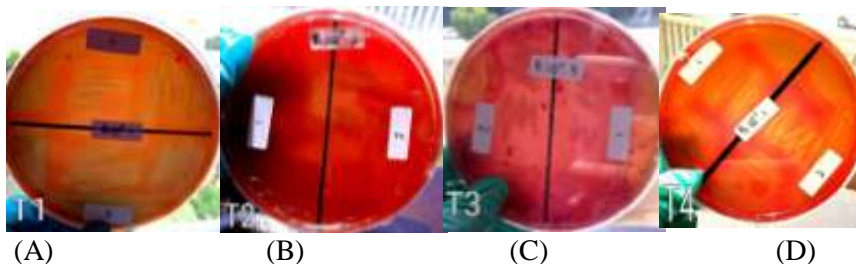
Gambar 2:

Hasil Uji patogenitas di Media MC. A. Isolat T1 non laktosa fermenter. B. Isolat T2 laktosa fermenter. C. Isolat T3 laktosa fermenter. D. Isolat T4 non laktosa fermenter. E. Isolat T5 laktosa fermenter. F. Isolat T6 non laktosa fermenter



Gambar 3:

Hasil uji patogenitas pada media BAP. A. Isolat T1 = hemolisis α . B. Isolat T2 = hemolisis γ . C. Isolat T3 = hemolisis γ . D. Isolat T4 = hemolisis β . E. Isolat T5 = hemolisis γ . F. Isolat T6 = hemolisis β .





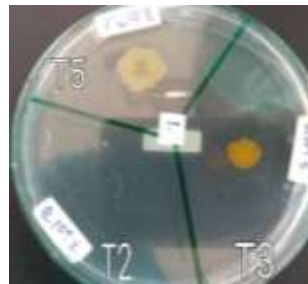
(E)

(F)

Setelah melalui proses seleksi Uji patogenitas bakteri, diketahui isolat T2, T3, dan T6 mempunyai sifat laktosa fermenter pada media MC dan hemolisis γ pada media BAP. Hal ini berarti bahwa isolat tersebut memiliki tingkat patogenitas relatif rendah. Isolat T2, T3 dan T6 kemudian ditumbuhkan pada media Tributirin dan SMA untuk mengetahui kemampuannya menghasilkan enzim lipase dan protease. Pada media SMA isolat T3 tidak menghasilkan zona bening protease, sedangkan pada media agar tributirin (Gambar 4) isolat tersebut mampu menghasilkan zona bening lipolitik.

Gambar 4:

Hasil uji penghasilan enzim lipase isolat T3 pada media tributirin berupa zona bening lipolitik.



Pada media Tributirin dan media SMA, zona bening yang isolat T3 memiliki diameter 15 mm. Dengan demikian, maka isolat T3 menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim lipase. Karena merupakan bakteri indigen limbah biomedis, mampu menghasilkan salah satu enzim pendegradasi bahan organik (pemecah lemak) dan memiliki tingkat patogenitas rendah maka isolat T3 berpotensi untuk dijadikan sebagai agen bioremediasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dari sampel limbah biomedis Puskesmas Tlogosari Kulon dapat diperoleh 6 isolat bakteri dengan bentuk koloni yang berbeda yaitu isolat T1- T6. Dari 6 isolat bakteri yang diperoleh tersebut, 3 isolat memiliki tingkat patogenitas rendah yaitu isolat T2, T3 dan T5, sedangkan satu isolat yaitu T3 mampu menghasilkan zona bening lipase di sekitar koloni. Dengan demikian, isolat T3 memenuhi kriteria sebagai kandidat agen bioremediasi limbah biomedis cair Puskesmas Tlogosari Kulon, Semarang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anitha J, Jayraaj I.A. 2012. Isolation and identification of bacteria in biomedical waste (BMW). *Int J PharmPhamSci*, 4, pp.386 – 8.
- Ankit, M., Yaginik, S. K., Pranali, M., &Yadav, S. K. 2011. Screening and Temperature Optimization for Lipase Producing Bacteria from Waste Contaminated Water. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), pp. 62-69.
- Azubuiké, C.C., Chikere C.B., dan Okpokwasili G.C. 2016. Bioremediation Techniques-Classification Based on Site of Application : Principles, Advantages, Limitations, And Prospects. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(11), pp.180.



- Buxton, R. 2005. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. *American Society for Microbiology*, Amerika Serikat.
- Chitnis, V., Chitnis, S., Vaidya, K., Ravikant, S., Patil, S. and Chitnis, D.S., 2004. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Research*, 38(2), pp. 441-447.
- Ellen, M. E. 2005. MacConkey Agar Plates Protocols. *American Society for Microbiology*, Amerika Serikat.
- Emmimol, A. 2012. Screening of microbes producing extracellular hydrolytic enzyme from Corporation waste dumping site and house hold water for the enhancement of bioremediation methods. *IOSR-JPBS*, 4, pp.54-60.
- Ethica, S.N. and Raharjo, T.J., 2014. *Detection of genes involved in glycerol metabolism of Alcaligenes sp. JG3* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- 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 RumahSakit 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.
- Ethica, S.N., Saptaningtyas, R., Muchlissin, S.I. and Sabdono, A., 2018. The development method of bioremediation of hospital biomedical waste using hydrolytic bacteria. *Health and Technology*, pp.1-16.
- HiMediaLaboratoriesPvt. Ltd. 2018. Tributyrin Agar Base w/o Tributyrin M157. Mumbai, India.
- Junairi, A. 2015. Evaluasi Kinerja Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Unit Sistem Advanced Oxidation Processes dalam Pengolahan Limbah Cair RSUD Dr. H. Yuliddin Away Tapaktuan. (Tesis, Universitas Aisyiah Yogyakarta).
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017. Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2016. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Verma, J.P., Jaiswal, D.K., 2016. Bookreview: advances in bio degradation and bioremediation of industrial waste. *Front Microbiol*, 6, pp.1-2.