



PEWARNAAN GRAM ISOLAT BAKTERI DARI LIMBAH BIOMEDIS CAIR RUMAH SAKIT UNHAS DENGAN METODE ZIEHL NEELSEN

Suci Wulandhani, Universitas Patompo, Indonesia
Ayu Wahyuni, Universitas Patompo, Indonesia
Ahmad Hasyim, Universitas Patompo, Indonesia
Misnarliah, Universitas Megarezky, Indonesia
*Corresponding author E-mail: swulandhani@gmail.com

Abstract

Hospital wastewater is an accumulation of domestic waste and liquid biomedical waste. To get bacteria that have the potential to decompose naturally can be done by isolating the waste itself. The purpose of this study was to identify bacteria using Ziehl Neelsen gram staining. The research was conducted by taking samples of liquid biomedical waste, making culture media, inoculation, isolation of bacteria and purification so as to obtain bacterial isolates which were then gram staining. Gram staining is a method to distinguish the types or species of gram-positive bacteria and gram-negative bacteria. The results showed that there were two bacterial isolates that were gram-negative namely isolate codes UH1.1 and UH1.2 (bacillus form) marked by the appearance of brick-red cells and five isolate were gram-positive namely isolate codes UH1.3, UH2.1 (bacillus form) UH2.2, UH2.3 and UH3.1 (coccus form) marked by the appearance of purple cells. The difference in color is due to differences in the composition of the cell walls of each bacteria.

Keywords: *Isolate, Gram stain, Biomedical waste, Ziehl Neelsen*

Abstrak

Air limbah rumah sakit merupakan akumulasi dari limbah domestik dan limbah biomedis cair. Untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi sebagai pengurai secara alamiah dapat dilakukan dengan mengisolasi limbah itu sendiri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri dengan pewarnaan gram *Ziehl Neelsen*. Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel limbah biomedis cair, pembuatan media kultur, inokulasi, isolasi bakteri dan purifikasi sehingga di dapatkan isolat bakteri yang selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram merupakan suatu metode untuk membedakan jenis atau spesies bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat dua isolat bakteri yang bersifat gram negatif yaitu kode isolat UH1.1 dan UH1.2 (bentuk basil) ditandai dengan penampakan sel berwarna merah bata dan lima isolat bersifat gram positif yaitu kode isolat UH1.3, UH2.1 (bentuk basil) UH2.2, UH2.3 dan UH3.1 (bentuk coccus) di tandai dengan penampakan sel berwarna ungu. Perbedaan warna tersebut disebabkan karena perbedaan komposisi dinding sel dari masing-masing bakteri.

Kata Kunci: *Isolat, Pewarnaan gram, Limbah Biomedis, Ziehl Neelsen*

© 2024 Universitas Cokroaminoto Palopo

Correspondence Author :
Universitas Patompo
Jl.Inspeksi Kanal No.10, Tombolo, Kec. Rappocini, Makassar

p-ISSN 2573-5163
e-ISSN 2579-7085

PENDAHULUAN

Rumah sakit sebagai sarana pelayanan kesehatan menjadi tempat berkumpulnya orang sakit maupun yang sehat yang memungkinkan terjadinya penularan penyakit serta terjadinya gangguan kesehatan dan pencemaran lingkungan (Depkes RI, 2002). Limbah rumah sakit merupakan semua limbah baik dalam bentuk padat, cair, gel (pasta) maupun gas yang dihasilkan dari kegiatan rumah sakit yang mengandung mikroorganisme patogen yang sifatnya infeksius, bersifat radioaktif dan bahan kimia beracun (Depkes, 2006) mikroorganisme ini yang menjadi penyebab penyakit tipus, kolera, disentri, dan hepatitis. Oleh karena itu, limbah harus diolah terlebih dahulu sebelum masuk ke lingkungan (Syamsuddin, 2018).

Rumah sakit menghasilkan limbah yang cukup potensial untuk mencemari lingkungan. Limbah rumah sakit dapat digolongkan menjadi limbah infeksius dan limbah non infeksius. Limbah infeksius adalah limbah yang termasuk dalam kategori limbah bahan beracun berbahaya (B3). Menurut Undang-Undang Nomor 32 tahun 2009 tentang perlindungan dan pengelolaan lingkungan hidup, Limbah B3 merupakan zat, energi dan/atau komponen apapun yang karena sifat, jumlah dan/atau konsentrasi baik secara langsung maupun tidak langsung dapat mencemari, merusak dan dapat membahayakan lingkungan hidup, kesehatan dan kelangsungan hidup manusia serta makhluk hidup lainnya. Oleh karena itu harus dikelola secara baik agar tidak merugikan kehidupan makhluk hidup. Limbah non infeksius adalah limbah yang termasuk ke dalam kategori limbah rumah tangga atau limbah domestik. Limbah infeksius merupakan limbah yang dapat membahayakan dan menimbulkan berbagai penyakit (Zainab, 2009).

Limbah biomedis meliputi benda padat, cairan, benda tajam, limbah laboratorium, dan wadah obat yang dihasilkan selama perawatan medis pada manusia dan hewan (Ethica, 2018). Limbah cair yang dihasilkan rumah sakit seringkali mengandung bakteri, virus, bahan kimia dan obat-obatan yang berbahaya bagi kesehatan masyarakat di sekitar rumah sakit. Limbah yang berasal dari laboratorium seharusnya sangat perlu untuk diwaspadai. Bahan kimia yang digunakan dalam proses

pengujian laboratorium tidak dapat diuraikan hanya dengan aerasi atau lumpur aktif. Bahan-bahan tersebut mengandung logam berat dan penyakit menular sehingga harus disterilkan atau distandarisasi sebelum dibuang ke lingkungan (Alamsyah, 2007).

Limbah biomedis di Indonesia terutama diolah melalui pembangunan instalasi pengolahan air limbah (IPAL). Namun pembangunan IPAL membutuhkan biaya yang mahal. Fasilitas layanan kesehatan seperti rumah sakit dan pusat kesehatan masyarakat sering menggunakan insinerator untuk mengolah limbah biomedis (Gautham *et al.*, 2010). Prinsip pengelolaan limbah dimulai dari sejak limbah dihasilkan sampai dengan penimbunan yang merupakan rangkaian kegiatan pemilahan, pewadahan, pengumpulan, pengangkutan, penyimpanan, pengolahan limbah B3 sampai dengan penimbunan hasil pengolahan telah diatur oleh Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan Nomor P.56/Menlhk-Setjen/2015 tentang Tata Cara dan Persyaratan teknis Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun dari Fasilitas Pelayanan Kesehatan.

Air limbah rumah sakit merupakan kombinasi limbah cair dan biomedis dengan kandungan polutan organik yang tinggi dan dapat diolah secara biologis (Mora *et al.*, 2015). Limbah cair merupakan semua air buangan termasuk tinja yang berasal dari kegiatan Rumah Sakit yang mengandung mikroorganisme bahan beracun, zat radioaktif dan darah yang berbahaya bagi kesehatan. Air limbah ini berasal dari proses seluruh kegiatan rumah sakit yang meliputi limbah cair domestik buangan kamar dari rumah sakit, bahan kimia beracun dan radioaktif (Said, 1999)

Bakteri sangat sulit dilihat dan diamati ketika masih hidup karena tidak berwarna, transparan dan berukuran kecil, sehingga metode pewarnaan sel bakteri merupakan salah satu metode terpenting untuk penelitian mikrobiologi (Rizki, 2008). Pewarnaan gram merupakan salah satu cara untuk mengklasifikasikan bakteri yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri gram positif berwarna ungu dan bakteri gram negatif berwarna merah (NauE, *et al.*, 2022). Dengan melakukan pewarnaan gram kita dapat mengetahui morfologi sel seperti bentuk sel, sifat gram dan penataan sel (Yuniarty dan

Misbach, 2016). Bakteri Gram positif adalah bakteri yang dapat mempertahankan warna ungu pada noda gram meskipun tubuhnya dihancurkan oleh alkohol atau aseton. Dengan cara ini, tubuh bakteri tetap berwarna ungu meskipun diwarnai dengan warna yang berlawanan. Di sisi lain, bakteri yang tidak tahan terhadap pewarna menjadi tidak berwarna lagi setelah menggunakan alkohol dan ketika pengecatan dengan pewarna kontras, mereka memperoleh warna dari zat kontras. Bakteri yang mempertahankan reaksi semacam ini adalah bakteri Gram negatif (Irianto, 2014). Kegunaan pewarnaan bakteri untuk memberi warna pada sel atau bagian-bagiannya sehingga menambah kontras dan agar terlihat lebih jelas (Susanto, 2016). Pewarnaan *Ziehl Neelsen* merupakan pewarnaan bakteri yang umum pada organisme tahan asam, khususnya *mycobacteria*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri dari limbah biomedis cair dengan pewarnaan gram *Ziehl neelsen*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental berskala laboratorium. Sampel digunakan dalam penelitian ini adalah limbah biomedis cair yang diambil dari rumah sakit Unhas Makassar. Sampel limbah biomedis cair yang telah diambil menggunakan 3 botol bersih yang berbeda kemudian diberi label (UH 1, UH 2, dan UH 3). Selanjutnya sampel disimpan pada cooler cool bag selama menuju laboratorium untuk segera diisolasi. Alat yang digunakan yaitu sarung tangan, mikroskop, kaca objek/preparat, pipet ukur, bunsen, gelas kimia, rak tabung, tabung reaksi, kapas, autoklaf, kertas label, neraca analitik, hot plate, ose, penjepit slide, erlemeyer dan cawan petri. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain limbah biomedis cair, NaCl 0,9%, Kristal violet, lugol/iodine, larutan safranin, alkohol

95%. Pengumpulan data dilakukan dengan melakukan pengamatan secara langsung ke objek penelitian mulai dari pengambilan sampel, pembuatan media, sterilisasi alat, inokulasi, purifikasi dan pewarnaan gram.

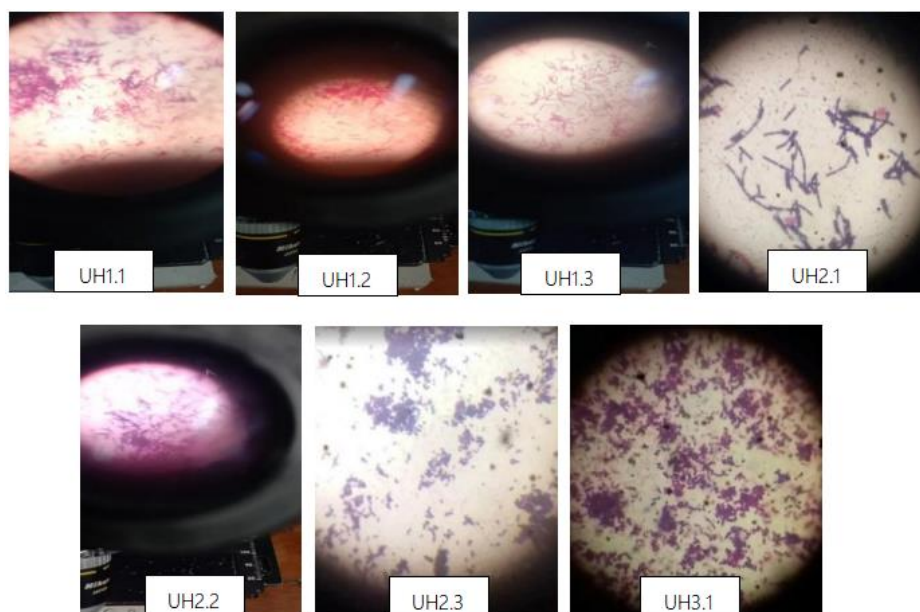
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Sebelum melakukan pewarnaan gram terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat dengan memasukkan semua alat yang akan digunakan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 2 ATM selama 15 menit. Sterilisasi merupakan proses pemusnahan seluruh mikroorganisme sehingga apabila ditumbuhkan pada suatu media kultur tidak terdapat lagi mikroorganisme yang dapat berkembang biak. Setelah dilakukan sterilisasi alat dan bahan dilakukan pembuatan media kultur, inokulasi, isolasi bakteri dan purifikasi sehingga di dapatkan isolat bakteri yang selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram merupakan suatu teknik pengecatan dimana bakteri bisa dibagi menjadi dua kelompok yaitu gram positif dan gram negatif. Tujuan dilakukan pewarnaan gram untuk mengetahui karakteristik dari bakteri tersebut. Pewarnaan sangat diperlukan untuk dapat melihat bakteri secara jelas (Rosnawati, 2008).

Hasil uji pewarnaan gram disajikan pada gambar 1 dan tabel 1 di bawah ini. Berdasarkan jumlah koloninya basil dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok seperti monobasil yakni sel bakteri yang berbentuk satu batang tunggal, diplobasil yakni sel bakteri yang berbentuk batang bergandeng dua dan streptobasil berbentuk batang yang bergandeng memanjang membentuk rantai (Irianto, 2012).

Berdasarkan hasil pewarnaan gram terlihat bahwa 2 isolat bersifat gram negatif dan 5 isolat bersifat gram positif.



Gambar 1. Hasil Uji Pewarnaan Gram Sampel Biomedis Cair

Tabel 1. Hasil Pengamatan Mikroskopis Pewarnaan Gram

Kode Sampel	Sifat Gram	Warna	Bentuk sel
UH1.1	Negatif	Merah bata	Basil
UH1.2	Negatif	Merah bata	Basil
UH1.3	Positif	Ungu	Basil
UH2.1	Positif	Ungu	Basil
UH2.2	Positif	Ungu	Cocus
UH2.3	Positif	Ungu	Cocus
UH3.1	Positif	Ungu	Cocus

Pembahasan

Isolat bakteri yang termasuk gram negatif yaitu UH1.1 dan UH1.2 yang ditandai dengan basil gram berwarna merah. Isolat bersifat gram positif ada 5 isolat yaitu, UH1.3, UH2.1, UH2.2, UH2.3 dan UH3.1 yang ditandai dengan basil berwarna ungu. Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan dinding sel masing-masing bakteri. Sel bakteri yang bentuknya seperti batang dinamakan *Basilus* yang ujungnya tampak bundar atau bulat, persegi dan ada pula yang meruncing atau lancip seperti cerutu. Basil juga ada yang saling melekat satu dengan lainnya/ujung dengan ujung sehingga memberikan penampilan seperti rantai (pelczar & Chan, 2008). Hasil penelitian yang didapatkan sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Forster *et all* (2002) dimana hasil penelitian tersebut

menunjukkan bahwa proporsi sel bakteri gram positif dan bakteri gram negatif tidak berbeda secara signifikan. Pewarnaan gram terbukti efektif dalam menganalisis kultur bakteri dari air limbah. Penelitian yang telah dilakukan oleh Ramadhan (2015) memperoleh hasil identifikasi lima bakteri uji dengan bentuk basil dan kokus, warna ungu dan merah yang bersifat gram positif maupun negatif. Berikut hasil identifikasi bakteri dari uji aktivitas antibakteri senyawa-senyawa hasil modifikasi struktur Etil p-Metoksisinamat melalui reaksi esterifikasi terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Tabel.2). Penelitian ini juga sejalan dengan yang telah dilakukan oleh Anitha pada tahun 2012 yang telah mengisolasi bakteri dari limbah biomedis, setelah di isolasi dan di identifikasi di temukan spesies *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* yang tergolong bakteri gram positif dan spesies *Klebsiella pneumonia* dan *E.Coli* yang tergolong bakteri gram negatif. Penelitian yang dilakukan oleh Ahmad *et all* (2023)

menemukan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel peptidoglikan yang tebal sehingga menghasilkan warna ungu dan

bakteri gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis yang menghasilkan warna merah/merah muda.

Tabel 2. Identifikasi Bakteri Pewarnaan Gram

No	Bakteri Uji	Bentuk	Warna	Sifat Gram
1	<i>Propionibacterium acne</i>	Basil	Ungu	Positif
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kokus	Ungu	Positif
3	<i>Escherichia coli</i>	Basil	Merah	Negatif
4	<i>Pseudomonas aerognosa</i>	Basil	Merah	Negatif
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kokus	Ungu	Positif

Identifikasi bakteri melalui pewarnaan gram dilakukan untuk memastikan kebenaran bakteri yang diujikan dan memastikan bahwa bakteri yang akan diuji tidak terkontaminasi mikroorganisme lain. Dari hasil pewarnaan gram, bakteri uji sesuai dengan literatur (Dwijoseputro, 1994). Pengujian pewarnaan gram yang dilakukan untuk menentukan karakteristik (Lay, 1994) isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel antara bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram negatif umumnya memiliki dinding sel dengan kandungan lipida yang tinggi (Lay, 1994). lipida larut oleh aseton alkohol sehingga kompleks zat warna kristal violet pada dinding sel tidak dapat dipertahankan dan mengikat zat warna merah safranin pada waktu pewarnaan sehingga warna merah yang tetap dipertahankan. Pada gram positif, dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yang larut oleh aseton alkohol sehingga warna biru kompleks zat warna kristal violet tetap dipertahankan pada waktu pewarnaan. Gambar 1 menunjukkan bahwa kode isolat UH1.1 dan UH1.2 mampu memfermentasikan laktosa ditandai dengan koloni bakteri dikelilingi oleh endapan garam empedu. Sedangkan kode isolat UH1.3, UH2.1, UH2.2, UH2.3 dan UH3.1 tidak dapat memfermentasikan laktosa.

Selain pengamatan reaksi bakteri terhadap pewarnaan gram, pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan bentuk selnya. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa empat isolat memiliki bentuk basil yaitu isolat UH1.1, UH1.2, UH1.3 dan UH2.1 sedangkan tiga isolat memiliki bentuk coccus yaitu isolat UH2.2, UH2.3 dan UH3.1.

Pewarnaan gram menurut hasil penelitian Ahmad *et all* (2023) membuktikan bahwa dengan adanya metode ini telah meningkatkan

efisiensi, akurasi dan kecepatan sehingga dapat meningkatkan kemampuan kita untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi bakteri.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian pewarnaan gram isolat bakteri pada limbah biomedis cair maka dapat disimpulkan bahwa terdapat 2 isolat bakteri yang bersifat gram negatif yaitu kode isolat UH1.1 dan UH1.2 sedangkan isolat bakteri yang bersifat gram positif adalah kode isolat UH1.3, UH2.1, UH2.2, UH2.3 dan UH3.1. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa empat isolat memiliki bentuk basil yaitu isolat UH1.1, UH1.2, UH1.3 dan UH2.1 dan 3 isolat berbentuk coccus yaitu isolat UH2.2, UH2.3 dan UH3.1.

Perlu dilakukan riset lanjutan untuk mengetahui isolat bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi yang digunakan untuk mengurangi pencemaran lingkungan.

DAFTAR RUJUKAN

- Anitha and Indira, 2012. *Isolation and Identification of Bacteria From Biomedical Waste (BMW)*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 4, Suppl 5, 286-388
- Ahmad Ansar, Manju Singh, Mohsin Amin dan Amandeep, 2023. *Gram Straining*. International Journal of Research and Review Vol. 10.
- Alamsyah, B. 2007. *Pengelolaan Limbah di Rumah Sakit Pupuk Kaltim Bontang untuk Memenuhi Mutu Lingkungan..* Tesis. Semarang; Universitas Diponegoro.
- Depkes RI, 2002. *Pedoman Sanitasi Rumah Sakit di Indonesia*. Depkes: Jakarta

- Depkes RI, 2006. *Pedoman Teknis Sarana dan Prasarana Rumah Sakit*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Dwijoseputro, 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta; Djambatan
- Ethica, 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Lipase dan Protease yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Dari Limbah Biomedis Cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol.1.2018)
- Forster Scoot, *et all.* 2002. *Simultaneous Fluorescent Gram Staining and Activity Assessment of Activated Sludge Bacteria*. Applied and Environmental Microbiology. United Kingdom. Vol.68 No. 10 p 4772-4779.
- Gautam, V., Thapar, R., & Sharma, M. 2010. *Biomedical waste management*
- Irianto, K., 2012, *Mikrobiologi Menguk Dunia Mikroorganisme*, Bandung.
- Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. 2014. *Hasil Penilaian PROPER Periode 2013-2014*.
- Lay, 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta Raja Grafindo Persada.
- Mora, Y, 2015. *Evaluasi Dimensi Unit Instalasi Pengolahan Air Limbah Domestik Rumah Sakit Dr. Ernaldi Bahar Kota Palembang*. Jurnal Dampak, 12 (2).
- NauE, Karneli, Syailendra, Syafitri, Wulandari dan Julianti, 2022. *Buah Bit Sebagai Alternatif Safranin Pada Pewarnaan Gram*. Husada Mahakam: Jurnal Kesehatan, Vol 24 (12) p 19-24
- Pelczar, Michael J dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 1*. Jakarta: UI Press
- Ramadhan, aditya., 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa-senyawa Hasil Modifikasi Struktur Etil p-Metoksisinamat Melalui Reaksi Esterifikasi terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif*. Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Rizki, 2008. *Mikrobiologi Umum Pewarnaan Gram*.
- Said, 1999. *Kesehatan Masyarakat dan Teknologi Peningkatan Kualitas Air*. Direktorat Teknologi Lingkungan Deputi Bidang Teknologi Informasi Makanan, Energi, Material dan Lingkungan BPPT. Jakarta.
- Susanto, 2016. *Pemeriksaan Protozoa, PPPPTK Bisnis dan Pariwisata*. Depok
- Syamsuddin, S, 2018. *Pengaruh Debit Dalam Proses Aerasi Menurunkan Kadar BOD Dan TSS Pada Air Limbah RSUD Daya Kota Makassar*. Jurnal Media Komunikasi Sivitas Akademika Dan Masyarakat. 18 (1)
- Undang-undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2008 tentang Pengelolaan Sampah.
- Undang-undang Republik Indonesia Nomor 32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup.
- U. S. Environmental Protection Agency (EPA). How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-95-007)
- Yuniarty, T dan Misbach, 2016. *Pemanfaatan Ubi Jalar Ungu (Ipomea batatas) Sebagai Bahan Zat Pewarna Pada Pewarnaan Staphylococcus aureus*. Jurnal Teknologi Laboratorium. Vol 5 (2), p 59-63.
- Zainab, 2009. *Analisa Limbah Rumah Sakit*. Makassar. Laporan Penelitian