

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui uji antimikroba minyak dan residu dengan katalisator Etilen Glikol dan N-Heksana pada limbah medis tanpa jarum suntik hasil pirolisis terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimen sungguhan (*True Eksperimen*) *Postes Only Design* dengan kelompok pertama yaitu sampel sebagai kontrol adalah minyak dan residu tanpa menggunakan katalisator. Sedangkan kelompok kedua sampel yang dikontakan dengan minyak dan residu hasil pirolisis dengan menggunakan katalisator Etilen Glikol dan N-Heksana sebagai eksperimen.

3.3 Unit Sampel

Minyak dan residu hasil pirolisis limbah medis tanpa jarum suntik baik tanpa menggunakan katalisator maupun dengan variasi katalisator Etilen Glikol dan N-Heksan. (Sampel limbah medis padat tanpa jarum suntik pasca sterilisasi disampling di RS Dustira Cimahi)

3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari s/d April 2024 bertempat di:

1. Rumah sakit Dustira, jalan Dustira no.1, Cimahi tengah, Kota Cimahi, Jawa barat
2. UPTD Laboratorium Lingkungan Hidup DLH Jawa barat Jl.A.HNasution No.117, Pasir Endah Kec.Ujung Berung, Kota Bandung, Jawa Barat 40619.
3. Badan Riset Inovasi Nasional (BRIN) Jl.Sangkuriang, Dago, Kec. Coblong, Kota Bandung, Jawa Barat 40135.

3.5 Teknik Pengumpulan Data dan Prosedur Penelitian

3.5.1 Cara Pengumpulan Data

Sampel yang diperoleh dianalisa dan dilakukan perlakuan sehingga menghasilkan data, kemudian data tersebut dianalisis sehingga didapat kesimpulan. Data pada penelitian ini merupakan data zona hambat yang diukur setelah sampel

yang dikontakan oleh bakteri hidrokarbonoklastik *pseudomonas aureginosa* dan bakteri non hidrokarbonoklastik *Staphylococcus aureus*. Dengan jumlah pengulangan yang dihitung dengan rumus federer sebagai berikut :

$$\begin{aligned} (t-1)(r-1) &\geq 15 \\ (6-1)(r-1) &\geq 15 \\ 5r-5 &\geq 15 \\ r &\geq \frac{15+5}{5} \\ r &\geq \frac{20}{5} \\ r &\geq 4 \end{aligned}$$

Keterangan :

t = Perlakuan

r = Pengulangan

15 = Derajat Kebebasan Umum (Suhaerah, 2012)

Berdasarkan rumus Federer diketahui dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian data akan dianalisis menggunakan ANOVA oneway.

3.5.2 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan beberapa tahap :

1. Disiapkan sampel limbah medis tanpa jarum suntik.
2. Persiapan alat dan bahan untuk uji antimikroba.
3. Melakukan pengumpulan data.
4. Analisis data.
5. Pembahasan dan kesimpulan.

3.5.2.1 Persiapan sampel limbah medis tanpa jarum suntik.

Sampel limbah didapatkan dari proses pirolisis pasca sterilisasi dengan metode sterilwaf di suhu 110°C selama 45 menit di Rumah Sakit Dustira.

3.5.2.2 Persiapan alat dan bahan untuk uji antimikroba.

•Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat tulis, alat sterilisasi, autoklaf, batang drugalsky, bunsen, cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, gelas

ukur, hotplate, inkubator, kaca preparat, kertas timbang, label, LAF (Laminar Air Flow), mikropipet, mikroskop, ose, penggaris, penjepit kayu, pinset, pipet, spatula, sumbat, sumuran (cork borer), tabung reaksi, timbangan analitik, tip mikropipet.

• **Bahan**

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah akuades, alkohol, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus aureus*, kristal violet, lugol, media agar NA, safranin, sampel minyak kontrol dan dengan variasi katalisator hasil pirolisis.

3.5.2.3 Pengumpulan data.

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

- a) Alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun dan air bersih lalu keringkan.
- b) Dibungkus rapat semua alat dan bahan yang akan disterilisasi dengan plastik dan atau alumunium foil.
- c) Dilakukan pengecekan banyak air pada autoklaf sebelum melakukan sterilisasi. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, tambahkan air destilasi hingga batas tersebut.
- d) Alat dan bahan dimasukkan kedalam tabung autoklaf. Jika mensterilisasi botol yang bertutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
- e) Autoklaf ditutup dengan rapat lalu baut pengaman dikencangkan agar tidak ada udara yang keluar dari bibir autoklaf. Jangan mengencangkan klep pengaman terlebih dahulu.
- f) Timer diatur dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C, kemudian menyalakan autoklaf.
- g) Tunggu sampai air mendidih sehingga upaya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu hingga selesai. Perhitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 1 atm.
- h) Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam

kompartment turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada pressure gauge menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.(Pradana A, 2020)

B. Pembuatan Media Natrium Agar

- a) Disiapkan alat dan bahan
- b) Diambil media Nutrien agar sebanyak 8 gram dan ditambahkan aquades sebanyak 250 ml.
- c) Dipanaskan sambil diaduk sampai media nutrient agar larut dengan sempurna sehingga media menjadi bening.
- d) Media dibungkus dengan plastic tahan panas lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm sehingga menghasilkan media yang steril.
- e) Dituangkan ke cawan petri saat media hangat-hangat kuku.(Nuryanti, 2015)

C. Pewarnaan Gram

Tahap pengujian ini berupa pewarnaan gram bakteri hidrokarbonoklastik dan bakteri non hidrokarbonoklastik yang digunakan, yaitu *P. aeruginosa* dan *S.aureus*. Pewarnaan gram bakteri hidrokarbonoklastik dan bakteri non hidrokarbonoklastik dengan cara melihat morfologi dari bakteri kemudian dicocokkan dengan jurnal penelitian serta dengan pewarnaan Gram.

- Tahapan pewarnaan gram
 - a) Dibuat apusan bakteri pada kaca objek kering dan bersih.
 - b) Dilakukan fiksasi diatas nyala api bunsen atau di udara.
 - c) Dilakukan pewaraan dengan larutan kristal violet selama 1 - 1,5 menit.
 - d) Dicuci dengan air suling.
 - e) Ditetaskan dengan larutan garam iodin, dan biarkan selama 1 menit.
 - f) Dicuci dengan larutan alkohol 95 % sampai warnanya terhapus, biasanya selama 0,5 menit (30 detik).
 - g) Dicuci dengan air.

- h) Dilakukan Pewarnaan dengan safranin atau karbol fuhsin selama 2 menit.
- i) Dicuci dengan air, dan buang kelebihan air dengan menggunakan kertas hisap, tanpa menggosok sediaan.
- j) Dikeringkan diudara atau diatas nyala api bunsen.
- k) Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. (ingat pakai minyak imersi).
- l) Dicatat pengamatan saudara.(Sujaya, 2016)

D. Pengujian Total Plate Count (TPC)

- a) Disiapkan sampel bakteri *Pseudomonas aureginosa* dan *Staphylococcus aureus*.
- b) Dilakukan pengenceran bertingkat dengan NaCl Fisiologis 95%.
- c) Dari setiap pengenceran ditanam ke media Nutrient Agar dengan menggunakan metode sebar.
- d) Diinkubasi pada suhu tertentu (biasanya 35-37°C) selama 24-48 jam.
- e) Koloni yang tumbuh dihitung(koloni yang optimal yang bisa dihitung antara 30-300 koloni per cawan petri) (Nurhayati dkk., 2020).

E. Pengujian Zona hambat

Pengujian zona hambat dilakukan dengan menggunakan metode Sumuran, metode sumuran mempunyai kelebihan yang lebih mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena isolat beraktivitas tidak hanya di permukaan atas nutrient agar tetapi juga sampai bawah (I gede dkk.,2022)

- a) Disiapkan media agar yang dipakai, yaitu NA (Nutrient Agar) yang telah dibuat.
- b) Bakteri uji *P. aeruginosa* dan *S.aureus* di pipet 0,1 ml dan diinokulasikan pada permukaan NA yang telah mengeras menggunakan metode *spread* (disebar di permukaan media agar). Pastikan bakteri merata dan membentuk lapisan bakteri tipis di atas agar.
- c) Setelah itu, dibuat lubang pada media agar dengan alat sumuran atau

- cork borer* (6 mm) lalu tempatkan sampel masing-masing pada ke 2 media NA minyak sebanyak 0,2 ml dan residu pada lubang sumuran.
- d) Sampel minyak diambil menggunakan mikropipet, sedangkan untuk residu diambil menggunakan spatula ataupun ose.
 - e) Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dalam inkubator.
 - f) Setelah diinkubasi, dilihat zona hambat yang muncul di sekitar sampel minyak dan residu. Diukur diameter zona hambat dengan menggunakan penggaris. Semakin kecil diameter zona bening, semakin efektif pengolahan limbah. Pengujian dilakukan sebanyak empat kali pengulangan. (Nurhayati dkk., 2020)

Tabel 3. 1 Tabel Pengulangan Bakteri *Pseudomonas aureginosa*

Pengulangan	Diameter Zona Hambat <i>Pseudomonas aureginosa</i>					
	Minyak			Residu		
	MA	MB	MC	RA	RB	RC
1	MA ₁	MB ₁	MC ₁	RA ₁	RB ₁	RC ₁
2	MA ₂	MB ₂	MC ₂	RA ₂	RB ₂	RC ₂
3	MA ₃	MB ₃	MC ₃	RA ₃	RB ₃	RC ₃
4	MA ₄	MB ₄	MC ₄	RA ₄	RB ₄	RC ₄

Keterangan :

MA =Minyak (kontrol)

MB=Minyak (katalisator Etilen Glikol)

MC=Minyak (katalisator N-Heksan)

RA=Residu (kontrol)

RB=Residu (katalisator Etilen Glikol)

RC=Residu (katalisator N-Heksan)

Tabel 3. 2 Tahap Pengulangan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengulangan	Diameter Zona Hambat <i>Staphylococcus aureus</i>					
	Minyak			Residu		
	MA	MB	MC	RA	RB	RC
1	MA ₁	MB ₁	MC ₁	RA ₁	RB ₁	RC ₁
2	MA ₂	MB ₂	MC ₂	RA ₂	RB ₂	RC ₂
3	MA ₃	MB ₃	MC ₃	RA ₃	RB ₃	RC ₃
4	MA ₄	MB ₄	MC ₄	RA ₄	RB ₄	RC ₄

3.6 Interpretasi Hasil

Zona hambat merupakan petunjuk kepekaan mikroba terhadap bahan antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat (Vandepite .,2015). Diameter zona hambat diukur kemudian dikategorikan kekuatan daya antimikrobanya berdasarkan penggolongan menurut Davis (1971) yaitu,

Tabel 3. 3 Kategori Daya Hambat

Diameter	Kekuatan Daya Hambat
<5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat kuat

3.7 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh menggunakan metode deskriptif yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar. Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Diameter zona bening yang terbentuk pada media kultur bakteri uji, yaitu *P. aeruginosa* dan bakteri *S.aureus* yang didifusikan dengan sampel minyak lalu dilihat dan diukur panjang diameternya. Hasil pengukuran kemudian dijumlahkan lalu dirata-rata kemudian dikurangi 6 mm (diameter *cork borer*). Untuk melihat perbedaan variasi katalisator yang digunakan pada minyak hasil pengolahan limbah medis padat pasca sterilisasi terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *S.aureus* menggunakan uji ANOVA satu faktor (*oneway ANOVA*). Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, uji dilanjutkan dengan uji Post Hoc. Untuk melihat efektivitas pengolahan limbah medis padat pasca sterilisasi dilakukan dengan cara melihat kategori zona daya hambatnya.

$$\frac{d1 + d2}{2} - X$$

Menurut Warbung dkk., (2014), rumus untuk menghitung zona hambat adalah sebagai berikut:

Keterangan:

d1 = diameter vertikal zona bening pada media

d_2 = diameter horizontal zona bening pada media

X = lubang sumuran (6 mm)

3.7.1 Uji Normalitas

Uji normalitas adalah suatu prosedur yang digunakan untuk mengetahui apakah data berasal dari populasi yang terdistribusi normal atau berada dalam sebaran normal. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Dasar pengambilan keputusan adalah jika nilai L hitung $>$ L tabel maka H_0 ditolak, dan jika nilai L hitung $<$ L tabel maka H_0 diterima. Hipotesis statistik yang digunakan:

H_0 : sampel berdistribusi normal

H_1 : sampel data berdistribusi tidak normal

Meskipun demikian, apabila sebaran data suatu penelitian yang mengungkapkan kemampuan siswa ternyata diketahui tidak normal hal itu bukan berarti harus berhenti penelitian itu sebab masih ada fasilitas statistik nonparametrik yang dapat dipergunakan apabila data tadi tidak berdistribusi normal (Murwani, 2019).

3.7.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas adalah suatu prosedur uji statistik yang dimaksudkan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variansi yang sama. Pada analisis regresi, persyaratan analisis yang dibutuhkan adalah bahwa galat regresi untuk setiap pengelompokan berdasarkan variabel terikatnya memiliki variansi yang sama. Jadi dapat dikatakan bahwa uji homogenitas bertujuan untuk mencari tahu apakah dari beberapa kelompok data penelitian memiliki variansi yang sama atau tidak. Dengan kata lain, homogenitas berarti bahwa himpunan data yang kita teliti memiliki karakteristik yang sama. Pengujian homogenitas juga dimaksudkan untuk memberikan keyakinan bahwa sekumpulan data yang dimanipulasi dalam serangkaian analisis memang berasal dari populasi yang tidak jauh berbeda keragamannya (Murwani, 2019) Untuk kesimpulan dari uji normalitas dapat dilihat dari:

- Jika nilai signifikan (sig.) $<$ 0,05, maka dikatakan bahwa variansi dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama (tidak homogen).

- Jika nilai signifikan ($\text{sig.} > 0,05$), maka dikatakan varians dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama (homogen) (Artha & Intan, 2021).

3.7.3 Uji ANOVA

ANOVA adalah suatu metode analisis statistika yang termasuk ke dalam cabang statistika inferensi. Uji dalam anova menggunakan uji F karena dipakai untuk pengujian lebih dari 2 sampel. Dalam praktik, analisis varians dapat merupakan uji hipotesis (lebih sering dipakai) maupun pendugaan (estimation, khususnya di bidang genetika terapan).

ANOVA (Analysis of variances) digunakan untuk melakukan analisis komparasi multivariabel. Teknik analisis komparatif dengan menggunakan tes “t” yakni dengan mencari perbedaan yang signifikan dari dua buah mean hanya efektif bila jumlah variabelnya dua. Untuk mengatasi hal tersebut ada teknik analisis komparatif yang lebih baik yaitu Analysis of variances yang disingkat anova.

ANOVA digunakan untuk membandingkan rata-rata populasi bukan ragam populasi. Jenis data yang tepat untuk anova adalah nominal dan ordinal pada variabel bebasnya, jika data pada variabel bebasnya dalam bentuk interval atau ratio maka harus diubah dulu dalam bentuk ordinal atau nominal. Sedangkan variabel terikatnya adalah data interval atau ratio.

ANOVA dapat digolongkan kedalam beberapa kriteria, yaitu :

1. Klasifikasi 1 arah (One Way ANOVA)

Anova klasifikasi 1 arah merupakan ANOVA yang didasarkan pada pengamatan 1 kriteria atau satu faktor yang menimbulkan variasi.

2. Klasifikasi 2 arah (Two Way ANOVA)

ANOVA klasifikasi 2 arah merupakan ANOVA yang didasarkan pada pengamatan kriteria atau 2 faktor yang menimbulkan variasi.

3. Klasifikasi banyak arah (MANOVA)

ANOVA banyak arah merupakan ANOVA yang didasarkan pada pengamatan banyak kriteria. (Budi, 2013)

Untuk kesimpulan dari uji ANOVA satu arah dapat dilihat dari:

- Jika nilai signifikan (sig.) $> 0,05$ (α), maka hipotesis H_0 diterima yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan nilai rata-rata antar kategori/level faktor.
- Jika nilai signifikan (sig.) $< 0,05$ (α), maka hipotesis H_0 ditolak yang berarti paling sedikit terdapat perbedaan dua nilai rata-rata antar kategori/level faktor (Aziza dkk., 2024).

3.7.4 Uji Post-Hoc

Analisis post-hoc adalah untuk menemukan pola setelah penelitian selesai, dan untuk menemukan hasil yang bukan merupakan tujuan utama. Dengan demikian, semua analisis yang dilakukan setelah eksperimen selesai yang tidak direncanakan sebelumnya dianggap sebagai analisis post-hoc.

Uji post hoc digunakan setelah menemukan hasil yang signifikan secara statistik. Uji post hoc dapat digunakan untuk menilai perbedaan di antara beberapa kelompok sekaligus menghindari kesalahan eksperimen. Beberapa uji post hoc telah diformulasikan, dan sebagian besar memberikan hasil yang serupa (Mariam dkk., 2020)

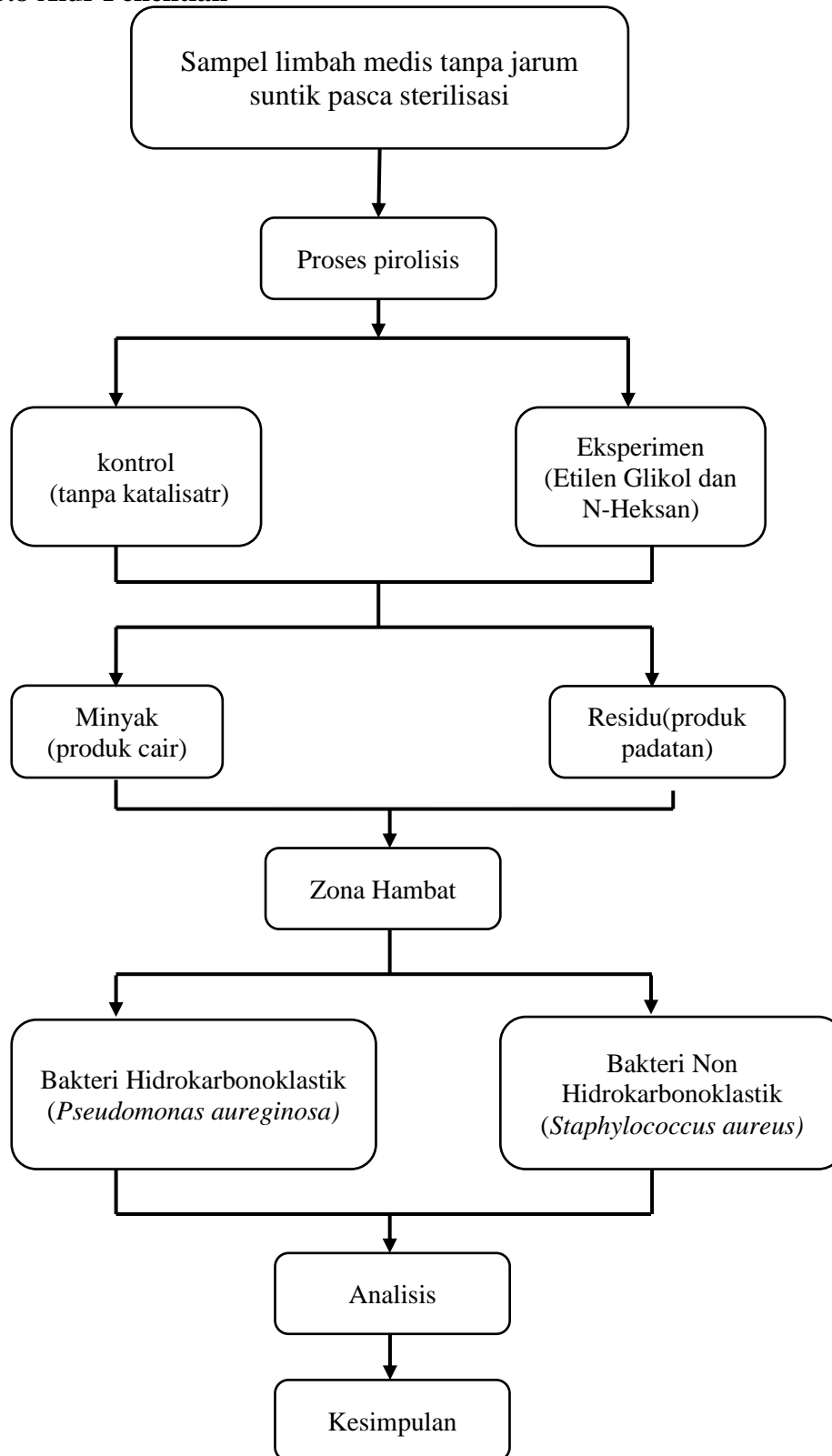
3.7.5 Uji T

Uji t digunakan untuk menguji tingkat signifikan dari pengaruh variabel independen secara parsial terhadap variabel dependen. Uji dilaksanakan dengan langkah membandingkan t hitung dengan t tabel. Dengan ketentuan jika t hitung $>$ t tabel dan nilai signifikan $< 0,05$ ($\alpha : 5\%$), maka variabel independen secara parsial berpengaruh signifikan terhadap variabel dependen (Budi, 2013)

3.7.6 Standar Deviasi

Standar deviasi (atau disebut juga deviasi standar) adalah ukuran statistik yang digunakan untuk mengukur sejauh mana data dalam satu set data tersebar dari nilai rata-rata (mean) dari set data tersebut. Standar deviasi memberikan informasi tentang sejauh mana variasi atau penyebaran data dalam set data. Semakin besar nilai standar deviasi, semakin besar variasi dalam data (Febriani, 2022).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3 .1 Diagram alur penelitian