

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan (April-Juni) 2022. Pengambilan sampel madu diambil dari pohon dan celah batu di Desa Honuk Kecamatan Amfoang Barat Laut, Kabupaten Kupang. Sampel penelitian diuji di Laboratorium Pendidikan Biologi Universitas Kristen Artha Wacana Kupang.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petrik, bunsen, erlenmeyer, oven, pipet volume, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, autoklaf, inkubator dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel madu yang diambil dari pohon dan celah batu sebanyak 600 mL, bakteri *E. coli* diambil dari isolasi feses manusia menggunakan media EMBA, bakteri *S. aureus* diambil dari Laboratorium Prodi Pendidikan Biologi UKAW (media NA), *Nutrient Agar*, aquades, dan alkohol.

#### **C. Tahapan Penelitian**

Dalam penelitian ini ada beberapa tahapan atau kegiatan yang dilakukan antara lain sebagai berikut :

##### **1. Pengambilan Sampel Madu Pohon dan Sampel Madu dicelah Batu**

Sampel madu diambil dari pohon dan celah batu. Sampel madu pohon diambil dengan menggunakan alat yaitu: sabuk kelapa, api, kain dan sampel

madu dicelah batu diambil dengan menggunakan alat yaitu kain. Masing-masing sampel diambil sebanyak 600 mL.

## 2. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Menimbang media NA sebanyak 4 gr pada neraca analitik kemudian media dituang ke dalam Erlenmeyer, mengukur aquades sebanyak 270 mL pada gelas ukur lalu tuangkan aquades pada Erlenmeyer yang berisi media kemudian media NA dihomogenkan menggunakan *magnetic steerer* dan disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 120°C selama 1 jam, setelah sterilisasi pada autoklaf dan dibiarkan sampai hangat dan tuang kedalam cawan petrik dengan ketebalan 10-15 cm . Agar cawan petri dibiarkan pada suhu ruang hingga media padat dengan sempurna (Oxoid, 2006).

## 3. Pembuatan Konsentrasi Madu

Madu yang diambil dari pohon dan dicelah batu dibuat variasi konsentrasi yaitu 80%, 90%, dan 100% dengan menggunakan aquades sebagai larutan pengencer. Konsentrasi 80% diecerkan dengan cara mengambil 8mL madu dimasukan ke dalam labu ukur dan tambahkan 10mL aquades kemudian di encerkan, konsentrasi 90% diencerkan dengan cara mengambil 9mL madu dimasukan ke dalam labu ukur dan tambahkan 10mL aquades kemudian di encerkan sedangkan untuk konsentrasi 100% tidak di encerkan.

#### 4. Uji Aktivitas Antibakteri Madu

Uji aktivitas antibakteri madu dilakukan dengan menggunakan metode sumuran. Setelah diinokulasi bakteri *S. aureus* dan bakteri *E. coli* menggunakan metode *spread plate* atau sebaran dengan mengambil 1 ose isolate *S. aureus* dan *E. coli* dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi aquades steril 9 mL. Pengenceran bakteri mulai dari  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  dengan dihomogenkan menggunakan vortex dan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam media nutrient agar dan diratakan menggunakan batang L dan diamkan selama 24 jam kondisi pertumbuhan bakteri diamati dengan pertumbuhan koloni di permukaan medium NA.

Pada media NA dibuat 1 sumuran dengan ukuran diameter 0,1 dibagian tengah media dan pada sumuran ditambahkan perlakuan (konsentrasi madu 80%, 90%, dan 100%) diinokulasikan pada inkubator selama 12 jam. Setelah diinokulasi diamati zona bening sekitar sumuran dan diukur diameter zona beningnya.

#### **D. Metode Penelitian**

Metode yang digunakan adalah eksperimen dengan variasi konsentrasi madu 80%,90% dan 100% yang diambil dari pohon dan celah batu dengan pengukuran zona bening atau zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran.

#### **E. Rancangan Penelitian**

Dalam penelitian ini perlakuan yang diberikan adalah variasi konsentrasi madu yang berasal dari 2 sumber (madu pohon dan madu dicelah batu) dan dilakukan variasi konsentrasi 80%, 90%, dan 100%. Kemudian diuji aktivitas antibakteri

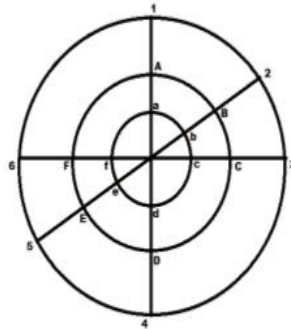
terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* masing-masing 1 perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

## F. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini yaitu data didapatkan dari pengukuran zona bening atau zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran.

## G. Analisis Data

Analisis data secara deskriptif kuantitatif dengan mengukur rata-rata zona bening atau zona hambat di sekitar sumuran dan menyajikan hasil rata-rata diameter zona hambat dalam bentuk grafik/tabel.



Gambar 3.1 Pengukuran Zona Hambat

Kriteria kekuatan daya antibakteri sebagai berikut:

Diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, diameter zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat (Davis dan Stout, 1971).