BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2021 - Juli 2021. Penelitian madu lebah tak bersengat dilakukan kebun botani Pendidikan Biologi UIN Raden Fatah Palembang. Kultur bakteri dan uji efektivitas madu lebah tak bersengat dilakukan di laboratorium Pendidikan Biologi UIN Raden Fatah Palembang.

B. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen kuantitatif karena pelaksanaannya melalui penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium serta analisis kuantitatif bekerja dengan pengolahan statistik. jenis ini digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu. Pengumpulan data pada jenis penelitian ini menggunakan intrumen penelitian, analisis data bersifat kuantitatif/statistik dengan tujuan untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan (Sugiono, 2016).

C. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram untuk melihat zona hambat madu lebah tak bersengat terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi, Escheriachia coli* dan *Staphylococcus aureus.*

D. Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Terikat

Adapun variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, *Escheriachia coli* dan *Staphylococcus aureus* di media *Nutrient agar* yang diukur diameternya menggunakan penggaris dengan satuan millimeter (mm).

2. Variabel bebas

Adapun variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah Madu Lebah Tak bersengat dengan konsentrasi 3%, 5%, 7%, 9% dan Tetrasiklin 1% (kontrol positif).

E. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini ialah sebanyak 5 jenis perlakuan konsentrasi diantaranya 3%, 5%, 7%, 9% dan Tetrasiklin 1% (kontrol positif).

2. Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Eksperimental laboratorium Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang merupakan rancangan bahan percobaan dengan cara acak dengan undian (Suhaerah, 2016). Pada uji efektivitas antibakteri madu lebah tak bersengat dengan 5 Perlakuan 5 pengulangan. Perlakuan yang digunakan konsetrasi 3%, 5%, 7% dan 9% dan kontrol positif dengan

menggunakan Tetrasiklin 1%. Penentuan jumlah perlakuan dan ulangan dapat di tentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut :

$$(t-1).(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = perlakuan

r = pengulangan

Dalam penelitian ini, t = 5, sehingga didapatkan :

$(5-1).(n-1) \geq 15$

$4.(n-1) \geq 15$

$4n-4 \geq 15$

$4n \geq 19$

$n \geq 19/4$

$n \geq 5$ (hasil pembulatan).

Jadi banyaknya pengulangan pada penelitian uji efektivitas antibakteri madu lebah tak bersengat adalah sebanyak 5 kali. Maka jumlah keseluruhan sampel yang digunakan sebanyak 25 sampel dan penempatan perlakuan secara acak pada seluruh percobaan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu mikroskop, *objec glass* dan *deck class*, optilab, gelas vial 10 ml, plastic buah, jangka sorong ketelitian 0.05, gelas ukut 50 ml, inkubator, *autoclave*, kulkas, spatula, timbangan analitik, gelas kimia 500 ml , cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, pipet, pinset, Erlenmeyer 250 ml, ose, korek api, bunsen, kertas, alat tulis, label, kapas swab, *stopwatch, tissue*, kamera, corong gelas 75 mm, cawan porselin 50 ml,

sarung tangan plastic, botol semprot, mikropipet dan *blue tip*, hotplate stirrer dan *Laminary air flow*.

2. Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu madu lebah tak bersengat (*Tetragonula laeviceps*), Media *Nutrient agar* (NA), Aquades steril, Alkohol 70%.

A. Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Seluruh peralatan yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu lalu dikeringkan dan dibungkus dengan kertas. Kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 180ºC selama ±30 menit dan jarum ose dibakar dengan pembakaran di atas api langsung (Muljono, 2016).

2. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media NA di timbang seberat 2,3 gram kemudian serbuk NA dipidahkan ke gelas beker lalu ditambahkan *aquades* sebanyak 100 ml lalu pindahkan ke dalam Erlenmeyer. Homogenkan larutan dengan bantuan pemanasan dan pengadukan selama ±10 menit (pelarutan harus sempurna sehingga tidak ada kristal yang tersisa). Setelah itu disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121ºC selama 15 menit. Setelah itu dituangkan *nutrient agar* tersebut ke dalam cawan petri Masukkan media kedalam incubator (37ºC) selama 24 jam untuk kualitas media, posisi cawan petri terbalik (Hafizah, 2015).

3. Pembuatan Agar Miring

Nutrient Agar (NA) ditimbang sebanyak 0,46 gr kemudian dilarutkan dalam 20 ml aquades steril dan masukkan ke dalam labu. Setelahnya di homogenkan dengan stirrer di atas hotplate sampai mendidih. Kemudian dituang ke 3 tabung sebanyak 5 ml lalu ditutup dengan kapas. Kemudian di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit, kemudian di biarkan pada suhu ruangan selama ±30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30º. Media ini guna inokulasi bakteri (Lay, 1994).

4. Inokulasi Bakteri Pada Media Agar Miring

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril lalu ditanamkan pada media miring dengan cara menggores pada bagian agar dengan goresan zig-zag. Lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37ºC. Perlakuan yang sama pada setiap bakteri uji (Lay, 1994).

5. Kultur bakteri

Biakan murni bakteri yang diperlukan ialah bakteri *Salmonella typhi, Escheriachia coli* dan *Staphylococcus aureus* diambil sebanyak 1 ose lalu digoreskan pada masing – masing *Nutrient Agar* yang berbeda secara aseptis lalu cawan petri ditutup. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC (Ngantung, 2016)

6. Pembuatan Variabel konsentrasi

Untuk membuat konsentrasi madu lebah tak bersengat dengan variasi 3%, 5%, 7% dan 9% maka digunakan rumus :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 = konsentrasi pelarut

V_1 = volume pelarut

M_2 = konsentrasi terlarut

V_2 = konsentrasi terlarut

Semua volume campuran dibuat dalam 5 ml, sehingga volume zat terlarut yang digunakan saat konsentrasi 3%, 5%, 7% dan 9% berturut-turut yaitu , 0,15 ml, 0,26 ml, 0,38 ml dan 0,5 ml.

7. Uji Efisiensi Madu terhadap bakteri

Siapkan biakan bakteri uji. Kemudian buat Media Agar Miring guna inokulasi bakteri. Lalu bagi daerah pada cawan petri menjadi 4 bagian dan diberi keterangan di setiap bagian. celupkan swab kapas ke dalam larutan biakan bakteri tersebut lalu digoreskan secara merata ke *nutrient agar* yang telah berada di cawan petri. Biarkan 5-10 menit agar biakan berdifusi kedalam media. Lalu *Blank disc* di celup di dalam masing – masing tabung reaksi konsentrasi madu lebah tak bersengat. Letakkan *blank disk* dengan steril, atur jarak antara masing-masing *blank disk* pada cawan petri lalu di wraping. Kemudian di inkubasi didalam inkubator dengan suhu 37ºC selama 24 jam. Setelah itu *blank disc* akan berdifusi pada media nutrient agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya *nutrient agar* (pada penelitian ini). Kemudian diukur diameter zona hambat tersebut menggunakan jangka corong dengan ukuran millimeter (mm). Lakukan Perlakuan yang sama pada setiap bakteri uji (Hafizah, 2015).

8. Teknik Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data yang digunakan untuk adalah analisa data yang di dapat dari hasil zona hambat madu lebah tak bersengat menggunakan teknik observasi. Teknik observasi ialah teknik pengumpulan data dengan mengamati langsung objek yang diteliti, disini yang menjadi objeknya adalah diameter zona hambat dari madu lebah tak bersengat terhadap bakteri *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yang terdapat di media *Nutrient agar* yang telah dicampur dengan aquades steril dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 3%, 5%, 7%, 9% dan kontrol positifnya Tetrasiklin 1%, satuan pengamatan dalam milimeter (mm). Menurut Sutrisno Hadi (1986) mengemukakan bahwa observasi merupakan proses yang kompleks dan tersusun akan proses pengematannya dari berbagai proses biologis dan psikologis.

Melakukan pengukuran terhadap fenomena social maupun alam adalah suatu prinsip meneliti (Emory, 1985). Pada dasarnya melakukan pengukuran itu harus ada alat ukur yang baik. Penelitian ini mengguakan alat ukur yang bernama intrumen penelitian. Intrumen yang digunakan adalah jangka sorong. pengukuran daya hambat yang dilakukan menggunakan jangka sorong dengan rumus :

$$R = \frac{(D_V - D_C) + (D_H - D_C)}{2}$$

Adapun formatan dalam pengambilan data berupa tabel hasil pengamatan adalah sebagai berikut.

Tabel 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Pengulangan				
U_1	U_2	U_3	U_4	U_5
$P_{2\,2}$	$P_{3\,3}$	$P_{2\,1}$	$P_{3\,5}$	$P_{0\,3}$
$P_{2\,4}$	$P_{4\,5}$	$P_{4\,4}$	$P_{1\,1}$	$P_{0\,2}$
$P_{2\,3}$	$P_{4\,3}$	$P_{4\,1}$	$P_{0\,5}$	$P_{1\,4}$
$P_{0\,1}$	$P_{1\,2}$	$P_{1\,5}$	$P_{1\,3}$	$P_{3\,4}$
$P_{3\,2}$	$P_{2\,5}$	$P_{0\,4}$	$P_{4\,2}$	$P_{3\,1}$

Keterangan:

U_1 = pengulangan ke- 1
U_2 = pengulangan ke- 2
U_3 = pengulangan ke- 3
U_4 = pengulangan ke- 4
U_5 = pengulangan ke- 5
$P_{0\,1}$ = kontrol positif pengulangan ke-1
$P_{0\,2}$ = kontrol positif pengulangan ke-2
$P_{0\,3}$ = kontrol positif pengulangan ke-3
$P_{0\,4}$ = kontrol positif pengulangan ke-4
$P_{0\,5}$ = kontrol positif pengulangan ke-5
$P_{1\,1}$ = Perlakuan 3% pengulangan ke-1
$P_{1\,2}$ = Perlakuan 3% pengulangan ke-2
$P_{1\,3}$ = Perlakuan 3% pengulangan ke-3
$P_{1\,4}$ = Perlakuan 3% pengulangan ke-4
$P_{1\,5}$ = Perlakuan 3% pengulangan ke-5
$P_{2\,1}$ = Perlakuan 5% pengulangan ke-1
$P_{2\,2}$ = Perlakuan 5% pengulangan ke-2
$P_{2\,3}$ = Perlakuan 5% pengulangan ke-3
$P_{2\,4}$ = Perlakuan 5% pengulangan ke-4
$P_{2\,5}$ = Perlakuan 5% pengulangan ke-5
$P_{3\,1}$ = Perlakuan 7% pengulangan ke-1
$P_{3\,2}$ = Perlakuan 7% pengulangan ke-2
$P_{3\,3}$ = Perlakuan 7% pengulangan ke-3
$P_{3\,4}$ = Perlakuan 7% pengulangan ke-4
$P_{3\,5}$ = Perlakuan 7% pengulangan ke-5
$P_{4\,1}$ = Perlakuan 9% pengulangan ke-1
$P_{4\,2}$ = Perlakuan 9% pengulangan ke-2
$P_{4\,3}$ = Perlakuan 9% pengulangan ke-3
$P_{4\,4}$ = Perlakuan 9% pengulangan ke-4
$P_{4\,5}$ = Perlakuan 9% pengulangan ke-5

Setelah pengamatan dilakukan data dianalisis menggunakan uji *one way* ANOVA jika distribusi data normal selanjutnya di uji menggunakan Duncan dengan tingkat kesalahan adalah 5% untuk

mengetahui pengaruh perlakuan yang diujikan. Kemudian dilakukan Uji Statistik *One way* ANOVA guna melihat adanya perbedaan bermakna atau tidak antara konsentrasi terhadap pertumbuhan masing-masing bakteri. Selanjutnya di Analisis menggunakan Uji *Duncan* untuk menentukan konsentrasi berapa yang memiliki kebermaknaan. Analisis data menggunakan program SPSS *for Windows version 24.00.*

Pada Sumbangsih penelitian berupa RPP dan poster yang akan di analisis datanya ditunjukkan pada table 3.1 dengan nilai yang sudah di validasi oleh dosen ahli.

Tabel 3.2 Intrumen Nilai validitas RPP pada KD 4.4

No	Aspek yang dinilai	Dosen ahli	
		Nilai (%)	Keterangan
1	Perumusan tujuan pembelajaran		
2	Isi yang disajikan		
3	Alokasi waktu		

Tabel 3.3 Intrumen Nilai validitas Poster Efektivitas Madu Lebah Tak Bersengat.

No	Aspek yang dinilai	Dosen Ahli	
		Nilai (%)	Keterangan
1	Penggunaan bahasa		
2	Isi dan konsep materi		
3	Tampilan media		

Nilai validasi yang diperoleh dari setiap aspek yang diamati , kemudian disesuaikan dengan kriteria validasi media pembelajran menurut widoyoko (2015).

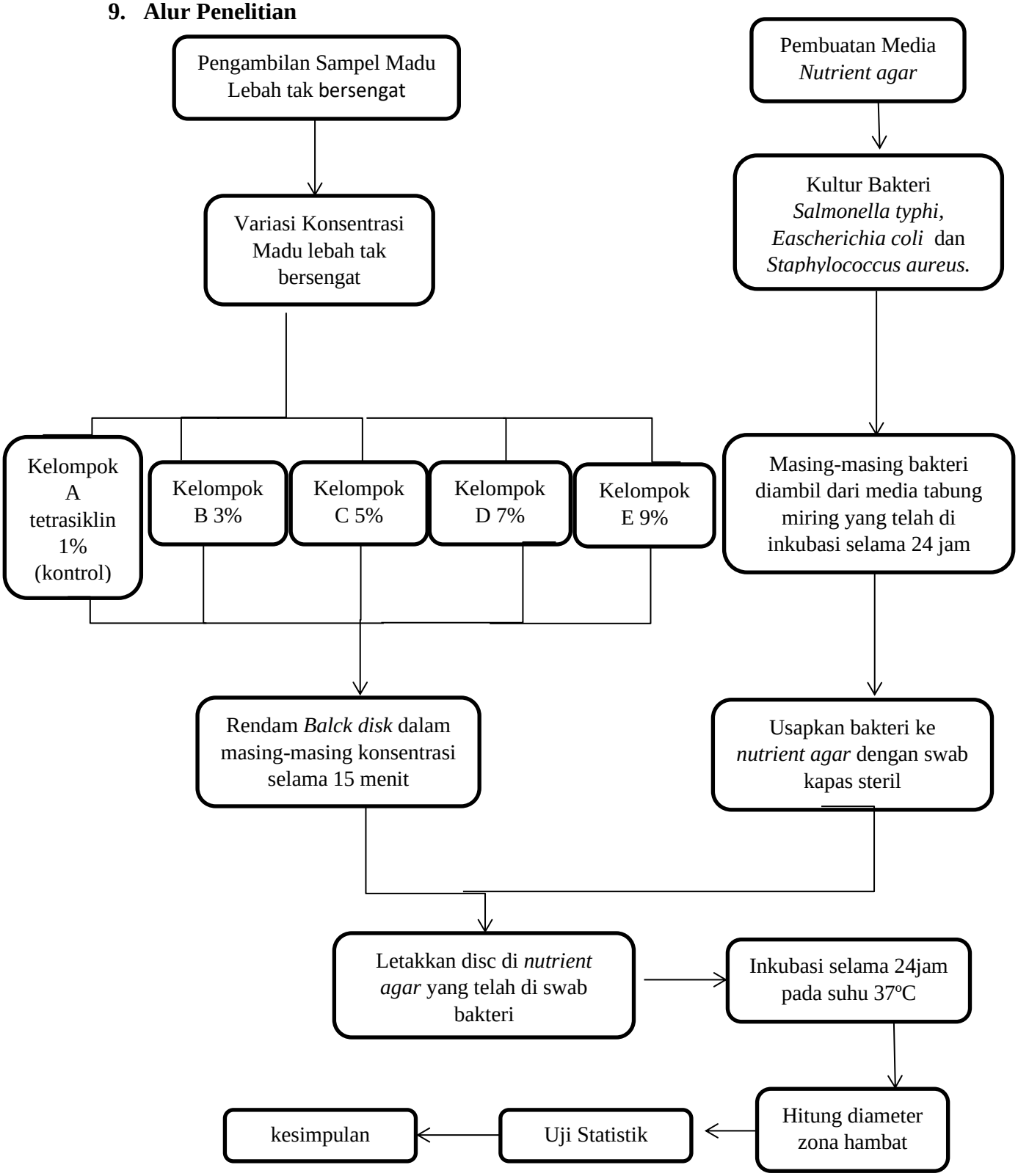
Tabel 3.4 Kriteria Validasi Media Pembelajaran

Skor	Kategori
3,26 - 4	Sangat Sesuai
2,6 – 3,25	Sesuai
1,76 – 2,5	Kurang Sesuai
1 – 1,75	Tidak Sesuai

Agar dapat menentukan kriteria validasi media pembelajaran pada tabel 3.5, maka perlu perhitungan rerata skor yang di dapat dengan rumus berikut.

$$Rerata\ Skor = \frac{\Sigma \text{ skor jawaban validator}}{\Sigma \text{ butir instrumen}}$$

Keterangan:

$Rerata\ Skor$ = rata – rata dari hasil perhitungan
Σ skor jawaban validator = jumlah skor yang didapat
Σ butir instrumen = jumlah butir intrumen

9. Alur Penelitian