

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Objek Penelitian**

Objek dalam penelitian ini adalah 7 isolat *Streptomyces* yang diisolasi dari rizosfer jagung (*Zea mays*), hasil dari penelitian sebelumnya.

#### **B. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah survei eksploratif dengan pemeriksaan laboratorium.

#### **C. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama 12 bulan. Tempat penelitian : 1). Peremajaan isolat dan pemeriksaan morfologi sel dengan pewarnaan gram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2). Identifikasi isolat dengan mikroskop elektron (SEM) dilakukan di laboratorium Zoologi LIPI.

#### **D. Alat dan Bahan Penelitian**

##### 1. Alat Penelitian

###### a. Peremajaan isolat:

- 1). Cawan petri
- 2). Jarum ose
- 3). Buncen
- 4). Inkubator

###### b. Pewarnaan Gram

- 1). Jarum ose

- 2). Obyek glass
  - 3). Cover glass
  - 4). Mikroskop
- c. Pemeriksaan dengan mikroskop elektron
- 1). Cawan petri
  - 2). *Cork borer*
  - 3). SEM

## 2. Bahan Penelitian

### a. Peremajaan isolat:

- 1). Media SCA
- 2). Alkohol 70%
- 3). Kapas

### b. Pewarnaan Gram

- 1). Pewarna Gram A (Carbol gentian violet)
  - 2). Pewarna Gram B lugol)
  - 3). Pewarna Gram C (Alkohol 95%)
  - 4). Pewarna Gram D (Safranin)
  - 5). Minyak imersi
- 3). Xylol

## **F. Tahapan Penelitian**

### **1. Peremajaan Isolat**

Isolat *Streptomyces* yang ditumbuhkan pada medium cair diisolasi pada media *Starch Casein Agar* (SCA) dengan metode streak. Diinkubasi pada suhu 25°C selama 4 hari.

### **1. Pewarnaan Gram**

Pada isolat yang telah dipurifikasi dilakukan pewarnaan gram. Caranya : diambil *objek glass* dan difiksasi dengan melidah apikan di atas bunsen sebanyak 2-3 kali secara cepat. Selanjutnya diambil 1 ose biakan *Streptomyces* dan letakkan di atas *objek glass*. Kemudian biakan *Streptomyces* diratakan dengan jarum ose. Setelah itu dilakukan fiksasi dengan melidah apikan bagian yang tidak ada *Streptomyces*nya di atas bunsen 2-3 kali dengan cepat. Langkah selanjutnya dituangkan pewarna Carbol gentian violet, dibiarkan selama 1 menit, setelah 1 menit preparat dicuci dengan air mengalir. Setelah itu preparat dikeringkan dengan membiarkan di udara terbuka. Selanjutnya dituangkan pewarna Iodium, dibiarkan selama 2 menit. Setelah 2 menit preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara terbuka. Berikutnya preparat dipucatkan dengan alkohol 95% (sampai warna ungu hilang), lalu dibilas dengan air mengalir. Langkah terakhir dituangkan pewarna Safranin sebagai warna penutup / pembanding, dan dibiarkan selama 30 detik. Setelah 30 detik preparat dicuci dengan air mengalir. Setelah itu preparat dikeringkan dengan meletakkan diantara 2 buah kertas tissue. Kemudian preparat dilihat di bawah mikroskop, digunakan pembesaran lemah dulu baru pembesaran kuat dengan terlebih dahulu menambahkan minyak imersi (Prescott *et al.*, 1999).

### **2. Colour Grouping**

Dari hasil peremajaan dilakukan *colour grouping* pada media *Oatmeal Agar* (Sembiring *et al.*, 2000). Hal ini dilakukan untuk mengelompokkan isolat berdasarkan warna aerial miselium, vegetatif miselium dan mengetahui apakah warna pigmen yang dihasilkan terdifusikan atau tidak.

### **3. Pemeriksaan dengan Mikroskop Elektron**

Untuk mengetahui morfologi dan ornamen permukaan rantai spora dari isolat yang representatif dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop elektron (SEM), kultur yang diperiksa ditumbuhkan pada medium *Starch Casein agar* pada suhu 25°C sampai berumur 14 hari. Morfologi rantai spora dapat ditentukan dengan menggunakan mikroskop optik binokuler. Ornamen permukaan spora ditentukan menggunakan prosedur berikut. Agar blok yang mengandung spora *Streptomyces* difiksasi dengan direndam dalam 2% glutaraldehyde pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian didehidrasi dengan seri etanol bertingkat (air, etanol 5%, etanol 14,5%, etanol 27,5%, etanol 42%, etanol 56,5%, etanol 69,5%, etanol 80%, etanol 89%, etanol 95,6%, dan etanol 100%). Setelah itu, dilakukan pengeringan dengan alat *critical point drying* (pengering dengan karbon dioksida cair). Selanjutnya, spesimen ditempatkan pada *stub* (holder) menggunakan lem khusus (*mounting drying*). Langkah selanjutnya dilakukan *coating*, yaitu pelapisan sampel dengan emas murni dengan alat *gold sputter*. Selanjutnya, dilakukan pengamatan dengan SEM.

### **G. Cara Pengumpulan Data**

Data dikumpulkan dari hasil pewarnaan gram untuk menentukan morfologi sel dan ornamen permukaan rantai spora hasil SEM.

### **H. Analisis Data**

Analisis data dilakukan secara deskriptif untuk menggambarkan morfologi sel *Streptomyces* hasil pewarnaan gram dan morfologi serta ornamen permukaan rantai spora hasil SEM.