

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro dari bulan Maret sampai Juni 2003.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Gelas beker, oven, erlenmeyer, autoklaf, “cuvet”, spektrofotometer Spectronic – 20, lampu spiritus, termometer, sentrifuge, jarum ose, batang pengaduk, tabung reaksi, kertas pH, pipet tetes, pipet ukur, tabung eppendrof, timbangan elektronik, “hemocytometer”, mikroskop, “rotary shaker”, dan penangas air.

3.2.2 Bahan

Kultur murni *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y – 18 dari University of Indonesia Culture Collection Jakarta, PDA (“Potato Dekstrosa Agar”) merk “DIFCO”, medium standart *R. mucilaginosa*, aquadest, tauge kacang hijau, alkohol, reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat), biru metilen dan kapas.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan Kultur Kerja

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y – 18, dibuat subkultur pada medium PDA miring dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Biakan ini selanjutnya digunakan sebagai “stock culture” dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu penyimpanan 4°C.

3.3.2 Pembuatan Medium Standar dan Medium Perlakuan

Medium standar yang selanjutnya dinyatakan sebagai medium kontrol (P₀), mengandung glukosa (10,0 g/l), KH₂PO₄ (5,5 g/l), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/l), (NH₄)₂SO₄ (3,7 g/l) dan ekstrak yeast (1,0 g/l). Sebagai medium perlakuan, ekstrak yeast diganti dengan ekstrak tauge dengan konsentrasi 5% (b/v) (P₁), 10% (b/v) (P₂) dan 15% (b/v) (P₃), pH medium diatur menjadi 5 dengan penambahan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N. Semua medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm selama ± 20 menit.

3.3.3 Pembuatan Kultur Starter

Diambil satu ose biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y – 18 dalam medium PDA miring umur 48 jam, kemudian diinokulasikan ke dalam 100 ml medium standar. Kultur starter diinkubasi pada “rotary shaker” dengan kecepatan 220 rpm pada suhu kamar selama 36 jam. Kerapatan sel ditentukan sampai kepadatan 10⁻⁷ menggunakan “hemocytometer” dengan penambahan biru metilen (Frengova *et al.*, 1994).

3.3.4 Inokulasi dan Inkubasi

Ke dalam 100 ml medium perlakuan diinokulasikan kultur starter sebanyak 5 % (v/v), selanjutnya diinkubasi selama 5 hari pada “rotary shaker” dengan kecepatan 220 rpm pada suhu kamar (Frengova, *et al.*, 1997). Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Pengambilan sampel untuk pengukuran biomassa sel dan konsentrasi gula reduksi dilakukan setiap interval waktu 12 jam.

3.3.5 Pengukuran Biomassa *R. mucilaginosa* UICC Y – 18

Biomassa diukur dengan metode gravimetri, kultur diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang. Pelet yang didapatkan dicuci dengan aquades dan disentrifugasi kembali. Pelet selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80⁰C selama 36 jam sampai mencapai berat konstan.

3.3.6 Analisis Konsentrasi Gula Reduksi dengan Metode DNS (Rickwood dan Hames, 1994)

Sampel (supernatan hasil dari sentrifugasi) sebanyak 0,1 ml ditambah 1 ml reagen DNS kemudian digojog lalu dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 10 menit. Didinginkan dalam suhu ruang lalu diukur dengan spektrofotometer Spectronic-20. “Optical Density” (OD) dibaca pada panjang gelombang 570 nm, sebagai blanko digunakan reagen DNS tanpa sampel. Kadar gula dalam sampel ditentukan dengan mempertimbangkan faktor pengenceran. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa yang dibuat dengan konsentrasi 0 – 1 mg/ml dengan interval 0,2 (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1) kemudian dibuat persamaan regresi hubungan OD dengan kadar gula standar.

3.4 Parameter yang Diamati

Parameter utama yang diamati adalah biomassa sel, yang ditentukan melalui pengukuran berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y – 18, sebagai parameter pendukung adalah konsumsi gula reduksi dengan standar glukosa.

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu konsentrasi ekstrak taube dengan dasar konsentrasi ekstrak taube dalam medium TEA yaitu 20% (g/l). Ekstrak taube disubstitusikan dalam medium standar dengan 4 perlakuan dan 6 kali ulangan yaitu :

P₀ = medium standar dengan ekstrak yeast (kontrol)

P₁ = medium standar dengan substitusi ekstrak taube 5 %

P₂ = medium standar dengan substitusi ekstrak taube 10 %

P₃ = medium standar dengan substitusi ekstrak taube 15 %

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA ("Analysis of Varian") dengan taraf uji 1% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 1 %.