

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro dari bulan Juli sampai dengan bulan Oktober 2003.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dari Laboratorium mikrobiologi UI, PDA (Merck), glukosa, maltosa, sukrosa, xilosa, galaktosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , "yeast extract", reagen dinitro salisilat (DNS), di metil sulfo oxide (DMSO), eter, metanol.

3.2.2. Alat

Adapun alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 50 ml, tabung reaksi, tabung ependorf, "cuvet" spektrofotometer, "cuvet" sentrifuge, "glass bead", pipet ukur, pipet tetes, termometer, lampu spiritus, jarum ose bulat, kertas pH, kapas, "rotary shaker", timbangan, neraca analitik sartorius, "magnetic stirer", penangas air, spektrofotometer, sentrifuge, oven, hemositometer, "vortex", mikropipet, eksikator.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Penyediaan biakan murni

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia, dibuat subkultur pada media PDA miring dan diinkubasi pada suhu ruang selama \pm 48 jam. Biakan ini selanjutnya akan digunakan sebagai “stock culture” dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.2. Pembuatan medium standar

Menurut Costa (1987), *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dapat ditumbuhkan dalam medium yang mengandung KH_2PO_4 5,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,7 g/L, yeast extract 1,0 g/L dan glukosa 10 g/L. Sebagai perlakuan, glukosa diganti sumber karbon yang lain (maltosa, sukrosa, xilosa, dan galaktosa) dengan konsentrasi yang sama. pH medium diatur menjadi 6,5.

3.3.3. Pembuatan starter

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada media PDA miring umur 48 jam yang telah diinkubasikan pada suhu ruang dibuat suspensi dengan menambahkan aquadest steril 5 mL, kemudian dinokulasikan pada medium standar sebanyak 1 % (v/v) dengan menggunakan pipet ukur 1 mL yang steril. Diinkubasi pada “rotary shaker” selama 24 jam pada temperatur kamar untuk mendapatkan kepadatan sel 10^7 sel/mL (Trismilah, 1995).

3.3.4. Pertumbuhan *R. Mucilaginosa* UICC Y-18

Ke dalam media cair masing-masing perlakuan diinokulasi dengan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 sebanyak 10 % (v/v) yang mempunyai kepadatan sel sebesar 10^7 sel/mL, selanjutnya diinkubasi selama 120 jam dengan agitasi

220 rpm pada suhu ruang (Frengova *et al.*, 1997). Setiap 12 jam diambil sampel untuk pengukuran pertumbuhan dan pigmen karotenoid.

3.3.5. Pengukuran pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18

Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dapat diukur dengan menggunakan metode gravimetri dengan cara: kultur diambil sebanyak 1 mL, disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang didapatkan dicuci dengan air destilasi untuk kemudian disentrifugasi lagi. Terakhir pelet dikeringkan dalam oven 80°C selama \pm 36 jam sampai mencapai berat konstan.

3.3.6. Analisis Konsentrasi Gula Reduksi dengan metode DNS (Chaplin and Kennedy, 1994)

Supernatan sebanyak 0,1 mL ditambah 1 mL reagen DNS kemudian dicampur dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa dengan interval 0,2.

3.3.7. Pengukuran Pigmen Karotenoid (Sedmak *et al.*, 1990)

Pigmen total *R. mucilaginosa* UICC Y-18 didapatkan dengan memecah selnya dengan cara sebagai berikut: kultur sebanyak 2 mL disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet yang didapatkan selanjutnya dicuci dengan air destilasi dan disentrifugasi lagi. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 0,5-1 mL DMSO yang telah dipanaskan pada temperatur 55°C. Pelet yang merupakan sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 ini kemudian dipecah dengan menggunakan “vortex” dengan penambahan “glass bead” selama 15 menit,

kemudian ditambah 0,1 M sodium phospat pH 7 dan 2 mL pelarut organik (eter petrol). Setelah itu di pecah lagi dengan “vortex” selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pigmen karotenoid dalam eter dipisahkan dengan cara evaporasi. Setelah kering ditambah pelarut organik (metanol) pada volume yang diketahui. Pigmen total diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm.

3.3.8. Pengukuran Pigmen Karotenoid (PCT, 1988)

Pigmen karotenoid ditentukan dengan koefisien ekstinsi (extinction coefficient) 1% ($E_{1cm}^{1\%} = 2680$) dengan formulasi sebagai berikut:

$$X' = \frac{(A - 480)(v_1)}{(E_{1cm}^{1\%})(v_2)} \times 10^4$$

$$X'' = \frac{X'}{P} \times 10^3$$

Keterangan:

X' = pigmen yang dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$)

X'' = pigmen yang dihasilkan ($\mu\text{g/g}$)

A-480 = optical densitas yang diukur pada λ 480 nm

v_1 = volume pelarut (metanol) (mL)

v_2 = volume sampel (mL)

$E_{1cm}^{1\%}$ = koefisien ekstinsi 1% (mL)

P = berat kering sel (g/L)

3.4. Parameter-parameter yang Diamati

- Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dengan mengukur berat kering sel menggunakan metode gravimetri
- Produksi pigmen *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dengan mengukur absorbansi pigmen menggunakan metode spektrofotometri
- Konsumsi gula pereduksi dengan mengukur konsentrasi gula reduksi berdasarkan metode DNS

3.5. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan lima perlakuan sumber karbon yang berbeda, yaitu : glukosa (P_1), maltosa (P_2), sukrosa (P_3), xilosa (P_4), dan galaktosa (P_5) dimana setiap perlakuan diulang lima kali. Data yang diperoleh dianalisa dengan Anova pada taraf uji 5%, bila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan ataupun Uji BNT pada taraf uji yang sama.