

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2003 sampai bulan Februari 2004 di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro.

#### **3.2. Bahan**

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dari Universitas Indonesia Culture Collection, PDA, glukosa, akuades,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , ammonium sulfat, ekstrak yeast, urea, ammonium nitrat, pepton, HCl 0.1 N, NaOH 0.5 N, DMSO, sodium fosfat 0.1 N, eter, metanol, katalis N ( $\text{K}_2\text{HSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ), kertas saring, kapas,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat 97%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.2%, indikator MO (Metil Orange), spiritus, NaOH-Tiosulfat, dan alkohol 70%.

#### **3.3. Alat**

Adapun alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah gelas ukur 50 mL, gelas beker 500 mL, oven, erlenmeyer 250 mL, autoklaf, buret, soklet, lampu spiritus, termometer, sentrifuge, cuvet sentrifuge, vortex, mikropipet, glass beads, spektrofotometer, cuvet spektrofotometer, eksikator, jarum ose, batang pengaduk, tabung reaksi, pH stick, kapas, pipet tetes, pipet ukur, tabung endorff, labu Kjedahl, labu alas bulat, neraca analitis, hemositometer, "Rotary shaker", magnetic stirer, dan penangas air.

### 3.4. Cara Kerja

#### 3.4.1. Pembuatan medium PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA instan dalam bentuk serbuk sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 50 mL akuades. Setelah itu diatur pH-nya menjadi 5.5 dengan menambahkan HCl 0.1 N. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama  $\pm 20$  menit pada temperatur 121 °C dengan tekanan 2 atmosfer.

#### 3.4.2. Penyediaan biakan murni

Biakan murni *R. mucilaginosa* berasal dari Universitas Indonesia Culture Collection, Universitas Indonesia, dibuat subkultur pada medium PDA miring dan diinkubasi pada temperatur 30 °C selama  $\pm 72$  jam. Biakan ini selanjutnya akan digunakan sebagai “stock culture” dan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.4.3. Pembuatan medium standar

Menurut Costa *et al.* (1987), *R. mucilaginosa* dapat ditumbuhkan dalam medium yang mengandung glukosa (10.0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5.5 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.7 g/L) dan ekstrak yeast (1.0 g/L). Sebagai perlakuan, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ammonium sulfat) diganti dengan sumber nitrogen yang lain (urea, ammonium nitrat, dan pepton) dengan konsentrasi yang sama. pH medium diatur menjadi 6.5 dengan penambahan HCl 0.1 N atau NaOH 0.1 N. Seluruh medium selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121 °C pada tekanan 2 atm selama  $\pm 20$  menit.

#### 3.4.4. Pembuatan starter

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium PDA miring umur tiga hari (dari perlakuan 3.4.2.) dibuat suspensi dengan menambahkan akuades steril 5 mL, kemudian diinokulasikan pada medium starter sebanyak 1% ( $v/v$ ). Diinkubasi pada “rotary shaker” dengan agitasi 220 rpm selama 20-24 jam pada temperatur kamar sampai didapatkan kepadatan  $10^7$  sel/mL (Trismilah, 1995).

#### 3.4.5. Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18

Ke dalam media perlakuan diinokulasikan starter sebanyak 10% ( $v/v$ ) dengan kepadatan sel  $10^7$  sel/mL, selanjutnya diinkubasi pada rotary shaker dengan agitasi 220 rpm dan temperatur ruang (Frengova *et al.*, 1997). Masing-masing perlakuan diulang 5 kali. Pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap interval waktu inkubasi 12 jam selama 5 hari. Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan pengukuran pigmen total dan pengukuran pH.

### 3.5. Parameter-parameter yang Diamati

#### 3.5.1. Biomassa

Tabung endorff dioven dan ditimbang. Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung endorff kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Setelah supernatan dipisahkan, pelet dicuci dengan akuades 1 mL dan disentrifugasi kembali. Tabung yang berisi pelet dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur  $80^{\circ}\text{C}$  sampai didapatkan berat konstan (Sudarmadji dkk., 1997).

### 3.5.2. Produksi pigmen karotenoid

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam cuvet sentrifuge dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 0.1 mL sodium fosfat pH 7 dan 1 mL DMSO (Dimethyl Sulfoxide) yang telah dipanaskan hingga temperatur 55 °C serta “glass beads”. Campuran dihomogenisasi selama 15 menit dengan menggunakan vortex kemudian ditambah dengan 2.0 mL eter. Campuran dihomogenisasi kembali selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Dua fasa yang diperoleh dipisahkan, pigmen akan terdapat di fasa atas tercampur eter, diambil dengan mikropipet untuk dipindahkan ke tabung reaksi dan dievaporasi sampai kering. Setelah eter menguap/kering, pigmen ditambah dengan metanol 3 mL dan dipindahkan ke cuvet spektrofotometer untuk mendapatkan nilai absorbansinya (Sedmak *et al.*, 1990).

Pengukuran pigmen total (PCT, 1988) ditentukan dengan koefisiensi ekstinsi (extinction coefficient) 1% ( $E_{1cm}^{1\%} = 2680$ ) dengan formulasi sebagai berikut :

$$X' = \frac{(A - 480)(v_1)}{(E_{1cm}^{1\%})(v_2)} \times 10^4 \rightarrow X'' = \frac{X'}{BK} \times 10^3$$

Keterangan :

- $X''$  = pigmen total yang dihasilkan ( $\mu\text{g/g}$ )
- $V_1$  = volume larutan pigmen (methanol) (mL)
- A-480 = optical densitas yang diukur pada  $\lambda$  480 nm
- $E_{1cm}^{1\%}$  = koefisien ekstinsi 1% (mL)
- $V_2$  = volume sampel
- BK = berat kering

### 3.5.3. Kadar nitrogen total

Kadar nitrogen total dianalisis sebelum inkubasi dan pada akhir inkubasi setelah 5 hari ( $t_{10}$ ). Kadar nitrogen total dianalisis dengan metode Mikro-Kjedahl yang dimodifikasi (Sudarmadji dkk., 1997). Sampel, dalam hal ini adalah supernatan, yang ada dalam ependorff ditimbang terlebih dahulu kemudian dipindahkan ke dalam labu Kjedahl, ditambah dengan katalis N yang terdiri atas  $K_2HSO_4$  dan  $CuSO_4$ , setelah itu ditambah dengan  $H_2SO_4$  pekat 97% sebanyak 25 mL. Semua bahan yang ada dalam labu dipanaskan (destruksi) secara perlahan-lahan dalam lemari asam selama  $\pm 1$  jam sampai warna berubah menjadi jernih kehijauan. Setelah dingin dimasukkan ke dalam alat destilasi Mikro-Kjedahl. Destilat ditampung dalam 25 mL  $H_2SO_4$  1.2% kemudian ditambah dengan 50 mL NaOH dan destilasi dilanjutkan sampai warna berubah menjadi coklat. Destilat ditampung sebanyak  $\pm 60$  mL, ditambah dengan indikator Metil Orange sebanyak  $\pm 6$  tetes, dan dititrasi dengan larutan standar NaOH 0.3 N sampai warna berubah dari merah menjadi kuning/oranye. Perhitungan kadar nitrogen dalam bahan (% N) adalah:

$$\% N = \frac{(ml\ NaOH_{blanko} - ml\ NaOH_{sampel}) \times 0.01408 \times N\ NaOH}{Berat\ sampel\ (mg)} \times 100\ \%$$

Dari kadar nitrogen awal dan akhir didapatkan besarnya konsumsi nitrogen pada masing-masing perlakuan dengan rumus :

$$\% N_{total} = \% N_{awal} - \% N_{akhir}$$

### 3.6. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan sumber nitrogen. Setiap perlakuan diulang lima kali. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya. Jika asumsi normalitas dan homogenitas diterima, maka dilanjutkan dengan Analisis Sidik Ragam pada taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% bila koefisien keragaman  $\geq 10\%$ , dan Uji BNT bila koefisien keragaman sebesar 5-10%.

Tabel 01. Perlakuan sumber nitrogen

Waktu Inkubasi (jam)	Perlakuan			
	Amm. Sulfat	Urea	Pepton	Amm. Nitrat
0	P1T0	P2T0	P3T0	P4T0
12	P1T1	P2T1	P3T1	P4T1
24	P1T2	P2T2	P3T2	P4T2
36	P1T3	P2T3	P3T3	P4T3
48	P1T4	P2T4	P3T4	P4T4
60	P1T5	P2T5	P3T5	P4T5
72	P1T6	P2T6	P3T6	P4T6
84	P1T7	P2T7	P3T7	P4T7
96	P1T8	P2T8	P3T8	P4T8
108	P1T9	P2T9	P3T9	P4T9
120	P1T10	P2T10	P3T10	P4T10