

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro, Semarang pada bulan Juli sampai dengan November 2004.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tabung reaksi, pipet tetes, “magnetic stirer”, erlenmeyer 250 mL, erlenmeyer 1000 mL, penangas, lampu spiritus, gelas baker 200 mL, gelas baker 1000 mL, sentrifus, batang pengaduk, jarum ose, pipet ukur, dispenser, kertas pH, “orbital shaker”, mortar, inkubator, oven, tabung “ependorf”, neraca analitik sartorius, spektrofotometer, kuvet spektrofotometer, kuvet sentrifus, mikropipet 25  $\mu$ L dan 50 $\mu$ L, “vaccum pump”, blender, corong gelas, “glass beads”, desikator, autoklaf, “refrigerator”, LAF, lampu “fluoresent” biru intensitas 556 lux.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : biakan *Phaffia rhodozyma* didapat dari BCCM (Belgian Co-Ordinated Collections of Microorganism) yang di temukan oleh Miller *et al.* (1976) sinonim : *Xanthophillomices dendrohour*, Golubev, akuades, HCl 0,1 N; NaOH 0,1 N;

pepton, yeast ekstrak, agar, malt ekstraks, glukosa, DNS, wortel, DMSO 0,1 N; sodium pospat 0,1 N; eter petrol, metanol, alkohol.

### **3.3. Cara Kerja**

#### **3.3.1. Mikroorganisme**

*Phaffia rhodozyma* ditumbuhkan dan disimpan dalam medium Yeast Malt Agar (YMA) dengan komposisi sebagai berikut : glukosa 10 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L dan agar 20 g/L. Temperatur penyimpanan 4°C.

#### **3.3.2. Pembuatan Starter (Inokulum)**

Starter ditumbuhkan pada erlenmeyer 250 mL yang berisi medium Yeast Malt Broth (YMB) dengan komposisi sebagai berikut : glukosa 10 g/L, pepton 5 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L pada pH 5 dan temperatur ruangan. Kultur diinkubasi selama 21 jam pada “orbital shaker” dengan kecepatan 180 rpm.

#### **3.3.3. Penyediaan Jus Wortel**

Pembuatan stok jus wortel dilakukan dengan cara memotong kecil-kecil 300 gram wortel kemudian ditambahkan dengan 600 mL larutan medium YMB. Tahap berikutnya diblender dan disaring dengan kertas saring dengan porositas 0,4  $\mu$ m menggunakan “vaccum pump”. Derajat keasaman (pH) jus diatur sampai dengan pH 5 melalui penambahan NaOH atau HCl 0,1 N. Jus wortel ini dijadikan stock dan dianggap memiliki konsentrasi 50 % (v/v). Stok jus wortel dimasukkan sebanyak 20 mL (10%), 40 mL (20%), 60 mL (30%), dan 80 mL (40%) pada erlenmeyer 250 mL, lalu ditambah medium YMB sampai volume 100 mL.

Medium kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm.

### **3.3.4. Kondisi Pertumbuhan *Phaffia rhodozyma* dan Pengambilan Sampel**

Penelitian dilaksanakan dengan mengamati dua faktor yang berpengaruh, yaitu variasi konsentrasi jus wortel dalam medium dan pengaruh pencahayaan. Perlakuan pertama, medium kerja di “shaker” pada ruang tertutup yang diberi sinar biru dari lampu “fluorescent” 10 watt dengan intensitas 556 lux, panjang gelombang 480 nm dengan jarak 20 cm dari permukaan medium (Hwan and Johnson, 1990). Perlakuan kedua medium di “shaker” tanpa penyinaran, yang diletakkan pada ruang terbuka. Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Masing-masing medium diinokulasi dengan 5% (v/v) starter dengan kepadatan  $3,27 \times 10^7$  /mL yaitu pada waktu inkubasi 21 jam. Perhitungan kepadatan sel dengan menggunakan hemositometer (Brock *et al.*, 1994). Kultur di “shaker” dengan kecepatan 180 rpm pada suhu kamar (Kusdiyantini *dkk.*, 2001) selama 120 jam (5 hari) (Gu and An, 1997). Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam sekali selama 120 jam, kemudian dilakukan pengukuran berat kering sel secara gravimetri, produksi pigmen dan analisis gula pereduksi dengan metode DNS.

### **3.3.5. Metode Analisis**

#### **3.3.5.1. Pertumbuhan (Metode Gravimetri)**

Pertumbuhan ditentukan dengan pengukuran berat kering sel, sebagai berikut : kultur diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung “ependorf” yang

telah diketahui berat kering selnya. Kultur disentrifugasi selama 15 menit (Vazques *et al.*, 1998). Supernatan dibuang kemudian dicuci dengan akuades lalu disentrifugasi lagi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Pelet yang didapat dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 36 jam, kemudian ditimbang dengan neraca analitik sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering dari tabung “ependorf” kosong merupakan berat kering sel *Phaffia rhodozyma* ( g/mL ).

### 3.3.5.2. Analisis Gula Pereduksi

Gula pereduksi dalam medium dianalisis dengan menggunakan metode DNS (Rickwood and Martin, 1994). Sampel sebanyak 0,1 mL ditambah dengan 1 mL reagen DNS, selanjutnya dicampur dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah itu sampel diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kurva standar untuk gula pereduksi ini menggunakan glukosa dengan konsentrasi 0-1 g/L, interval 0,2 g/L.

### 3.3.5.3. Isolasi Sel dan Ekstraksi Pigmen Total

#### 1. Isolasi Sel

Pemecahan sel dilakukan dengan menggunakan metode Sedmak *et al.* (1990) yaitu : kultur sebanyak 1 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, pelet yang didapat kemudian dicuci dengan akuades 2 mL dan disentrifugasi kembali ( Vazques *et al.*,1998 ), kemudian diekstraksi pigmennya.

#### 2. Ekstraksi Pigmen Total

Pigmen total diekstraksi dengan metode Sedmak *et al.* ( 1990 ). Pelet yang diperoleh dari isolasi sel di atas kemudian ditambah dengan 1,0 mL Dimetil

sulfoxide (DMSO ; 0,1M) yang telah dipanaskan 55°C, kemudian ditambahkan dengan *glass beads* lalu dihomogenisasi menggunakan vortek selama 10 menit. Larutan ini kemudian ditambah 1 mL sodium fosfat (0,1 M) pH 7 dan 2 mL eter petrol, serta dihomogenisasi kembali dengan menggunakan vortek selama 5 menit. Tahap selanjutnya adalah sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan akan didapat dua fraksi pada kuvet, yaitu bagian atas berupa pigmen yang larut dalam eter dan bagian bawah berupa debris sel, “glass beads”, DMSO dan sodium fosfat. Pigmen yang larut dalam eter diambil menggunakan mikropipet 50 µL dan dievaporasi, setelah kering kemudian ditambahkan pelarut organik berupa metanol dengan volume yang diketahui. Pengukuran pigmen dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm. Perhitungan total ditentukan dengan koefisiensi ekstinsi (*extinction coefficient*) 1% ( $E_{1cm}^{1\%} = 1600$ ) menurut Sedmak *et al.* (1990), dengan formulasi sebagai berikut :

$$X = \frac{(V)(A-480)}{E_{1cm}^{1\%} (100)(P)} \times 10^6$$

dimana :

X : pigmen total yang dihasilkan (µg/g)

V : volume larutan pigmen (mL)

A-480 : optical densitas yang diukur pada  $\lambda$  480 nm

$E_{1cm}^{1\%}$  : koefisien ekstinsi 1%

P : berat kering (g/L)

### 3.4. Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

#### a. Parameter utama

- Berat kering sel (g/L) *Phaffia rhodozyma* (metode gravimetri)
- Jumlah pigmen total ( $\mu\text{g/g}$ ) yang dihasilkan (Sedmak *et al.*, 1990)

#### b. Parameter pendukung

- Analisis gula pereduksi (g/L) dengan metode DNS (Rickwood and Martin, 1994)

### 3.5. Analisis Data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan pola faktorial yang terdiri dari 5 perlakuan variasi jus wortel dan perlakuan penyinaran, setiap perlakuan diulang tiga (3) kali. Variabel bebasnya adalah konsentrasi jus wortel pada medium YMB (0%, 10%, 20%, 30%, 40%) dan penyinaran dengan sinar biru serta tanpa penyinaran. Variabel tergantungnya adalah berat kering sel dan pigmen total. Waktu inkubasi 72 jam yang menghasilkan berat kering sel dan produksi pigmen karotenoid tertinggi digunakan sebagai acuan hasil perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian dengan taraf uji 5%, kemudian diteruskan dengan uji Duncan dengan taraf uji yang sama bila ada beda nyata.

### 3.6. Matriks Rancangan Perlakuan

Penyinaran	Penambahan jus wortel				
	J0	J1	J2	J3	J4
P1	P1J0	P1J1	P1J2	P1J3	P1J4
P2	P2J0	P2J1	P2J2	P2J3	P2J4

**Keterangan :**

- J0 : kontrol (jus wortel 0%)
- J1 : medium dengan penambahan jus wortel 10%
- J2 : medium dengan penambahan jus wortel 20%
- J3 : medium dengan penambahan jus wortel 30%
- J4 : medium dengan penambahan jus wortel 40%
- P1 : tanpa penyinaran
- P2 : penyinaran menggunakan lampu “fluoresent” biru

