

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

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

1.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang dipergunakan antara lain : erlenmeyer 250 mL, “rotary shaker”, ose, gelas ukur, LAF (“Laminar Air Flow”), kapas, lampu spirtus, pH stick, mikroskop, pipet ukur, tabung reaksi, oven, autoklaf, “beaker glass”, “magnetic stirer”, mikropipet, tabung “eppendorf”, “glass beads”, inkubator, desikator, “hemocytometer”, kuvet sentrifuse, sentrifugasi, kuvet spektrofotometer, spektrofotometer spectronic 20 dan neraca analitik Sartorius.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan antara lain : biakan *Rhodotorula muciliginosa* UICC Y-18 dari Kultur Koleksi Universitas Indonesia, air kelapa, buffer sodium fosfat 0,1 M, Potato Dextrosa Agar (PDA), akuadest, alkohol, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Asam Dinitrosalicil (DNS), $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, metanol, HCl 0,1 N dan KOH 0,1N.

1.3. Cara Kerja

3.3.1. Penyediaan Biakan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (diperoleh dari Jurusan Biologi, Universitas Indonesia Culture Collection) ditumbuhkan pada medium PDA miring dan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Biakan ini selanjutnya akan digunakan sebagai “stock culture” dan disimpan dalam lemari pendingin dengan temperatur penyimpanan 4⁰C.

3.3.2. Pembuatan Medium Air Kelapa

Air kelapa yang akan digunakan berumur sekitar 3 bulan disaring terlebih dahulu dan ditampung dalam erlenmeyer dengan volume 2 L. Air kelapa tersebut diatur pHnya dengan menambahkan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N sehingga pH menjadi 4,0 dan 6,0; sedang pH air kelapa (pH 5,0) digunakan sebagai kontrol. Penambahan HCl ataupun KOH dilakukan sebelum air kelapa disterilkan dan dicek kembali setelah sterilisasi. Air kelapa yang dipergunakan dibagi ke dalam erlenmeyer 250 mL dengan volume 100 mL, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dan tekanan 2 atm selama 20 menit (Fontana *et al.*, 1996). Setelah dingin air kelapa tersebut dapat langsung digunakan untuk medium pertumbuhan khamir.

3.3.3. Pembuatan Kultur Starter

Medium air kelapa sebanyak 100 mL yang telah disterilkan diinokulasi dengan kultur *R. mucilaginosa* UICC Y-18. Kultur starter ini diinkubasi pada

“rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm (Kusdiyantini dkk, 2001) pada suhu kamar selama ± 20 jam (sampai densitas selnya mencapai 10^7 – 10^8 sel/mL). Pengukuran densitas sel dilakukan dengan menggunakan “hemocytometer” dengan penambahan metilen biru (Brock *et al.*, 1994).

3.3.4. Inokulasi dan Inkubasi

Medium yang telah disiapkan untuk pertumbuhan diinokulasi dengan 5 % (v/v) starter. Setiap biakan di “shaker” dengan kecepatan 200 rpm dan 250 rpm pada suhu kamar selama 120 jam (5 hari). Masing-masing perlakuan ini diulang sebanyak 4 kali. Pengukuran pertumbuhan dilakukan selama inkubasi 120 jam dengan interval waktu 12 jam. Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan pengukuran pigmen total, gula pereduksi dan pH medium.

3.3.5. Pengukuran Pertumbuhan (Metode Gravimetri)

Berat kering sel didapatkan dengan cara sebagai berikut : sampel diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung “eppendorf” yang telah diketahui beratnya. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit (Vazques *et al.*, 1998). Supernatan dibuang dan pelet yang didapat dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C sampai mendapatkan berat kering yang konstan (sekitar 36 jam). Berat kering tersebut ditimbang dengan menggunakan neraca analitik Sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering tabung “eppendorf” merupakan berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (g/L).

3.3.6. Analisis Konsentrasi Gula Pereduksi (Metode DNS)

Gula pereduksi yang terdapat di medium air kelapa di analisis dengan menggunakan metode Asam Dinitrosalicil (DNS) (Rickwood and Martin, 1994). Sampel sebanyak 0,1 mL ditambah 1,0 mL reagen DNS dan dihomogenkan, kemudian dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 10 menit dan didinginkan dengan cepat hingga mencapai suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 5 mL akuades dan diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar gula dengan konsentrasi 0-1 g/L dengan interval 0,2 g/L.

3.3.7. Isolasi Sel dan Ekstraksi Pigmen Total

3.3.7.1. Isolasi Sel

Kultur sebanyak 1 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan 2 mL air destilasi dan disentrifugasi kembali (Vazques *et al.*, 1998). Pelet yang dihasilkan selanjutnya diekstraksi pigmennya.

3.3.7.2. Ekstraksi Pigmen Total

Pigmen total diekstraksi dengan metode Sedmak *et al.*, (1990). Pelet yang diperoleh dari isolasi sel diatas kemudian ditambah dengan 1,0 mL sodium fosfat (0,1 M) pH 7, “glass beads”, dan 1,0 mL Dimethyl Sulfoxide (DMSO) yang telah dipanaskan hingga temperatur 55⁰C. Campuran tersebut dihomogenisasi dengan menggunakan “vortex” selama 15 menit, kemudian ditambahkan 2 mL diethyl eter. Setelah dihomogenisasi selama 15 menit, kemudian disentrifugasi

kembali. Dua fase yang diperoleh dipisahkan, pigmen akan terdapat dibagian atas tercampur dengan larutan eter, diambil dengan mikropipet untuk dipindahkan ke tabung reaksi dan dievaporasi sampai kering. Setelah eter menguap/kering, pigmen ditambah dengan 5 mL metanol dan dipindahkan ke kuvet spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm untuk mendapatkan nilai absorbansinya.

3.3.8. Pengukuran Pigmen Total (PCT, 1988)

Pigmen total ditentukan dengan koefisien ekstinsi (extinction coefficient)

1% ($E_{1cm}^{1\%}=2680$), dengan formulasi sebagai berikut :

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

dimana :

X : pigmen total yang dihasilkan ($\mu\text{g/g}$)

V : volume larutan pigmen (mL)

A-480 : optikal densitas yang diukur pada $\lambda = 480 \text{ nm}$

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

P : berat kering sel (g/mL)

3.4. Parameter yang diamati :

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Parameter utama :

3.4.1 Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (metode gravimetri)

3.4.2 Produksi pigmen total (metode spektrofotometri)

3.4.3 pH medium selama waktu inkubasi

- Parameter pendukung :

3.4.4 Analisis gula pereduksi (metode DNS)

3.5. Rancangan Percobaan

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan pola faktorial yaitu perlakuan pH awal medium dengan P1 (pH 4,0), P2 (pH 5,0), P3 (pH 6,0) dan kecepatan agitasi yaitu A1 (200 rpm) dan A2 (250 rpm) serta pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

Bentuk Rancangan Penelitian

Perlakuan pH	Kecepatan agitasi	
	A1	A2
P1	P1A1	P1A2
P2	P2A1	P2A2
P3	P3A1	P3A2

Keterangan :

A1 : Kecepatan agitasi 200 rpm

A2 : Kecepatan agitasi 250 rpm

P1 : pH awal medium air kelapa 4,0

P2 : pH awal medium air kelapa 5,0 (pH kontrol)

P3 : pH awal medium air kelapa 6,0

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (Ansira) dengan taraf uji 5%, kemudian diteruskan dengan uji Duncan dan uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf uji yang sama bila terdapat beda nyata antar perlakuan.

