

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2004 di Laboratorium Mikrobiologi dan Analisis Balai Riset dan Standardisasi Perindustrian dan Perdagangan, Semarang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah pipet ukur, tabung“cuvet”, jarum ose, sentrifuga, “rotary shaker”, gelas ukur, LAF (“Laminar Air Flow”), lampu spirtus, pH stick, mikroskop, tabung reaksi, oven, gelas piala, autoklaf, spektrofotometer (Spectronic 21, Milton Roy Company), desikator, neraca analitik sartorius, vortek, “eppendorf” (“microtube”), tabung steril (tabung vakum).

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah biakan *Phaffia rhodozyma* dari Belgian Co-Ordinated Collection of Microorganism . (BCCM) {diidentifikasi oleh Miller *et al.* (1976)} dan sinonim dengan *Xanthophyllomyces dendrorhous* Golubev, air kelapa, buffer sodium fosfat 0,1 M, PDA (Merck), akuades, alkohol, kapas, Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Merck), dietil eter, metanol, HCl, KOH, kertas saring, serbuk xilosa (Merck).

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Penyediaan Biakan *Phaffia rhodozyma*

P. rhodozyma diremajakan pada medium PDA miring, kemudian ditumbuhkan dalam suhu ruang *P. rhodozyma* yang telah tumbuh kemudian disimpan dalam lemari es dengan suhu penyimpanan 4⁰C.

3.3.2. Pembuatan Medium Pertumbuhan

Air kelapa disaring dengan kertas saring dan ditampung dalam gelas piala, kemudian dibagi dalam enam tabung steril sebagai berikut:

- tabung 1 : air kelapa (kontrol)
- tabung 2 : air kelapa + xilosa pada konsentrasi 5 g/L
- tabung 3 : air kelapa + xilosa pada konsentrasi 10 g/L
- tabung 4 : air kelapa + xilosa pada konsentrasi 15 g/L
- tabung 5 : air kelapa + xilosa pada konsentrasi 20 g/L
- tabung 6 : air kelapa + xilosa pada konsentrasi 25 g/L

Medium yang telah disiapkan pada tabung tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 20 menit. Sebelum dan sesudah disterilisasi diatur pHnya (5,5) dengan penambahan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N secara aseptis (Fontana *et al.*, 1996).

3.3.3. Pembuatan Starter

Biakan dari medium PDA miring dipindahkan sebanyak 2 ose dalam medium air kelapa 100 mL, kemudian kultur diagitasi pada “rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm dengan kepadatan 10^7 - 10^8 /mL pada suhu kamar (selama \pm 18 jam – 20 jam) (Kusdiyantini dkk., 2001).

3.3.4. Inokulasi dan Inkubasi

Medium pertumbuhan diinokulasi dengan 5% (v/v) starter, kemudian kultur diagitasi dengan kecepatan 180 rpm pada “rotary shaker” dengan suhu $25,2^{\circ}\text{C}$ selama 120 jam (5 hari) (Johnson *et al.*, 1997). Pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap 12 jam sekali selama inkubasi 120 jam. Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan pengukuran pigmen total (karotenoid) dan analisis gula pereduksi.

3.3.5. Pengukuran Berat Kering Sel (Metode Gravimetri)

Kultur cair diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung “ependorf” yang telah diketahui beratnya. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang didapat dicuci dengan akuades, kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama selama 15 menit (Vázquez *et al.*, 1998). Pelet yang didapat dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 36 jam atau lebih hingga berat kering konstan setelah ditimbang dengan neraca analitik Sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat tabung ependorf merupakan berat kering sel *P. rhodozyma* (g/L).

3.3.6. Ekstraksi Pigmen Total (Metode Sedmak *et al.*,1990)

Kultur cair sebanyak 1 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, pelet yang didapat kemudian dicuci dengan aquades 2 mL dan disentrifugasi kembali selama 15 menit (Vázquez *et al.*,1998). Pelet yang dihasilkan selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan metode Sedmak *et al.* (1990). Pelet tersebut ditambah dengan 1 mL Dimethyl Sulfoxide (DMSO) yang telah dipanaskan hingga temperatur 55⁰C dan “glass beads”. Campuran tersebut dihomogenisasi selama 15 menit dengan vortek, kemudian ditambahkan 1 mL (0,1 M) sodium fosfat pH 7 dan 2 mL pelarut organik (dietyl eter). Dihomogenisasi kembali selama 5 menit dengan vortek, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Dua fasa yang diperoleh dipisahkan, pigmen yang terdapat di bagian atas (terlarut dalam eter) diambil untuk kemudian dievaporasi. Pigmen yang didapatkan ditambah pelarut organik (metanol) dengan volume 5 mL dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Spectronic 21, Milton Roy Company) pada panjang gelombang 480 nm.

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

Pigmen total ditentukan dengan koefisiensi ekstinsi (extinction coefficient) 1% ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1600$) dengan formulasi sebagai berikut :

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

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

V = volume larutan pigmen (mL)

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

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = koefisien ekstinsi 1%

P = berat kering sel (g/mL)

3.3.8. Analisis Konsentrasi Gula Pereduksi Dengan Metode DNS (Chaplin and Kennedy, 1994)

Supernatan sebanyak 0,1 mL ditambahkan 1mL reagen DNS, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C dalam “water batch” selama 10 menit. Kemudian sample diukur dengan spektrofotometer (Spectronic 21, Milton Roy Company) dengan panjang gelombang 570 nm.

Kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar xilosa pada konsentrasi 0-1 g/100mL dengan interval 0,2 g/100mL (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1)

3.3.9. Parameter

Parameter yang diukur terdiri dari :

Parameter utama :

- Berat kering sel *Phaffia rhodozyma* (Metode Gravimetri)
- Produksi pigmen *Phaffia rhodozyma* (Metode Sedmak *et al.*, 1990)

Parameter pendukung :

- Konsentrasi gula pereduksi (Metode DNS)

3.4. Model Rancangan Percobaan Dan Analisis Data

Percobaan dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal, yaitu konsentrasi xilosa. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Hasil penelitian akan dianalisis dengan menggunakan ANOVA (Analysis Of Varian) dengan taraf uji 5% dan apabila ada beda nyata dilakukan uji lanjut menggunakan Uji Duncan pada taraf uji 5% (Gomez dan Gomez, 1995).

Ulangan Perlakuan	1	2	3	4	5
P0	P01	P02	P03	P04	P05
P1	P11	P12	P13	P14	P15
P2	P21	P22	P23	P24	P25
P3	P31	P32	P33	P34	P35
P4	P41	P42	P43	P44	P45
P5	P51	P52	P53	P54	P55

Keterangan:

P0: Konsentrasi xilosa 0 g/L

P3: Konsentrasi xilosa 15 g/L

P1: Konsentrasi xilosa 5 g/L

P4: Konsentrasi xilosa 20 g/L

P2: Konsentrasi xilosa 10 g/L

P5: Konsentrasi xilosa 25 g/L