

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro pada bulan September-Desember 2004.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah gelas ukur 100 mL, gelas beker 200 mL, oven, erlenmeyer 250 mL, autoklaf, "Laminair Air Flow", kuvet spektrofotometer, kuvet sentrifuse, lampu spiritus, sentrifuse, jarum ose, tabung reaksi, mikropipet, tabung "eppendorf", neraca analitik sartorius, "magnetic stirer", spektrofotometer, "rotary shaker", pipet ukur, desikator, corong gelas, pipet tetes, penangas, batang pengaduk, inkubator, hemositometer, "glass beads", pH stick dan oven.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dari University of Indonesia Culture Collection, HCl, KOH, magnesium sulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), buffer sodium fosfat ($Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$), kertas saring, kapas, air kelapa muda, alkohol, akuades, DNS (Dinitrosalicyl

Acid), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), spirtus, eter, metanol, metilen biru, PDA (Merck).

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Penyediaan Biakan Murni

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 ditumbuhkan pada medium PDA miring. Biakan disimpan dalam lemari es dengan suhu penyimpanan 4°C. Apabila akan dipergunakan, biakan dipindah pada medium air kelapa (pengadaan starter). Starter ditumbuhkan dalam erlenmeyer 250 mL pada “rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm pada suhu kamar selama 24 jam (Kusdiyantini *dkk*, 2001).

3.3.2. Pembuatan Medium Air Kelapa

Air kelapa disaring dan ditampung dalam erlenmeyer, diatur pH 5 melalui penambahan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N. Pengaturan pH dilakukan sebelum air kelapa disterilkan dan dicek kembali setelah sterilisasi. Air kelapa yang telah diatur pH-nya dibagi dalam empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (tanpa penambahan MgSO₄.7H₂O), penambahan MgSO₄.7H₂O sebanyak 0,75 g/L; 1,00 g/L dan 1,25 g/L. Air kelapa yang telah diperlakukan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 20 menit, setelah dingin dapat dipergunakan sebagai media pertumbuhan khamir (Fontana *et al.*, 1996).

3.3.3. Pembuatan Starter

Biakan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang telah ditumbuhkan dalam medium PDA miring dipindahkan ke dalam medium air kelapa yang telah steril sebanyak 2 ose. Starter ini kemudian diagitasi dengan “rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm pada temperatur kamar selama 24 jam (sampai densitas sel mencapai 10^7 - 10^8 sel/mL) Pengukuran densitas sel dilakukan dengan menggunakan hemositometer dengan penambahan metilen biru (Brock *et al.*, 1994).

3.3.4. Pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Starter sebanyak 5% (v/v) dengan kepadatan sel 10^7 - 10^8 sel/mL diinokulasikan ke dalam media perlakuan, selanjutnya diinkubasi selama 120 jam (5 hari) dengan kecepatan agitasi 200 rpm dan 250 rpm pada suhu kamar. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Pengukuran pertumbuhan dilakukan pada inkubasi dengan interval waktu 12 jam (Kusdiyantini *dkk.*, 2001). Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan analisis gula pereduksi dan pengukuran pigmen total.

3.3.5. Pengukuran Pertumbuhan dengan Metode Gravimetri (Berat Kering)

Berat kering sel didapat dengan cara mengambil kultur sebanyak 1,0 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung “ependorf” yang telah diketahui beratnya. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit (Vazques *et al.*, 1998). Supernatan dibuang dan pelet yang didapat dikeringkan

dalam oven suhu 80°C sampai berat konstan, ditimbang berat keringnya dengan neraca analitik sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat tabung “eppendorf” merupakan berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18.

3.3.6. Analisis Konsentrasi Gula Pereduksi (Metode DNS)

Sampel sebanyak 0,1 mL ditambah 1,0 mL reagen DNS, dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu kamar. Selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Analisis gula pereduksi dilakukan setiap 12 jam inkubasi. Konsentrasi gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa dengan interval 0,2 g/L (Chaplin and Kennedy, 1994).

3.3.7. Isolasi Sel dan Ekstraksi Pigmen Total

1. Isolasi Sel

Kultur sebanyak 1 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Pelet yang didapat dicuci dengan akuades 2 mL dan disentrifugasi kembali (Vazques *et al.*, 1998). Pelet yang dihasilkan diekstraksi pigmennya.

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

Pelet yang diperoleh dari isolasi sel di atas ditambah dengan 1,0 mL sodium fosfat (0,1M) pH 7, “glass beads” dan 1,0 mL DMSO yang telah dipanaskan hingga temperatur 55°C. Campuran dihomogenisasi selama 15 menit kemudian ditambah dengan 2,0 mL eter. Campuran dihomogenisasi kembali agar larutan tercampur, lalu disentrifugasi selama 10 menit. Dua fasa yang diperoleh

dipisahkan. Pigmen akan terdapat di fasa atas tercampur dengan eter, diambil dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk kemudian dikeringuapkan. Setelah eter menguap, pigmen ditambah dengan 5 mL metanol, dipindahkan ke kuvet spektrofotometer, selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm.

3.3.8. Pengukuran Pigmen Total (An *et al.*, 1989)

Pigmen total ditentukan dengan koefisiensi ekstinsi (“extinction coefficient”) 1% ($E_{1cm}^{1\%} = 2680$) dengan formulasi sebagai berikut :

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

Keterangan :

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

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

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

P : berat kering (g/L)

3.4. Parameter-parameter yang Diamati

- Berat kering sel (g/L) *R. mucilaginos*a UICC Y-18.
- Produksi pigmen karotenoid ($\mu\text{g/g}$) *R. mucilaginos*a UICC Y-18.
- Konsentrasi gula pereduksi (g/L) *R. mucilaginos*a UICC Y-18.

3.5. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan 2 faktor perlakuan, yaitu konsentrasi magnesium sulfat dengan variasi M_0 (tanpa penambahan magnesium sulfat), M_1 (penambahan magnesium sulfat 0,75 g/L), M_2 (penambahan magnesium sulfat 1,00 g/L) dan M_3 (penambahan magnesium sulfat 1,25 g/L) dan kecepatan agitasi dengan variasi 200 rpm dan 250 rpm, setiap perlakuan diulang 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (Ansira), bila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Tabel 03. Bagan percobaan

Magnesium sulfat	Agitasi	
	A ₁	A ₂
M_0	M_0A_1	M_0A_2
M_1	M_1A_1	M_1A_2
M_2	M_2A_1	M_2A_2
M_3	M_3A_1	M_3A_2

Keterangan :

M_0 : Kontrol (tanpa penambahan magnesium sulfat)

M_1 : Penambahan magnesium sulfat 0,75 g/L

M_2 : Penambahan magnesium sulfat 1,00 g/L

M_3 : Penambahan magnesium sulfat 1,25 g/L

A₁ : Perlakuan kecepatan agitasi 200 rpm

A₂ : Perlakuan kecepatan agitasi 250 rpm