

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2004 hingga Februari 2005 di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNDIP Semarang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain erlenmeyer, neraca analitik Sartorius, gelas ukur, *magnetic stirrer*, penangas air, pipet ukur, mikropipet, tabung reaksi, cawan petri, autoklaf, ose, lampu spiritus, termometer, *rotary shaker*, spektrofotometer, lampu sinar ultraviolet (UV), mikroskop, haemositometer, sentrifus, oven, tabung *ependorf*, *counter*, LAF (*Laminar Air Flow*), *cuvet*, dan *vortex*.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain akuades, glukosa, kentang, agar, HCl, KOH, kapas, spiritus, kertas, karet, *Phaffia rhodozyma*, sodium fosfat, DMSO (Dimetil Sulfoksida), dietil eter, metanol, *pH stick*, air kelapa dan alkohol.

3.3 Cara Kerja

1. Pembuatan Media dan Sterilisasi

Media agar yang digunakan yaitu media Potato Dextrose Agar (PDA). PDA dibuat dengan komposisi sebagai berikut, (g/L): glukosa 20, kentang 200 dan agar 15 (Atlas, 1993). Cara pembuatannya yaitu mula-mula potongan kentang dimasukkan dalam air mendidih selama 30 menit. Air hasil rebusan kentang tersebut diambil dan disaring dengan kapas, kemudian ditambah glukosa dan agar, dipanaskan di atas

penangas air sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga tercampur menjadi larutan yang homogen. Setelah itu pH media tersebut diukur dan diatur dalam pH 6 dengan menggunakan HCl 0.1 M atau KOH 0.1 M.

Media agar miring dibuat dengan memasukkan media agar ke dalam tabung reaksi dengan volume 5-10 mL. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 20 menit. Setelah sterilisasi selesai, media agar dibiarkan memadat dalam posisi miring. Media agar untuk penumbuhan koloni hasil radiasi dibuat dengan cara menuang 10-15 mL PDA steril ke dalam cawan petri. Penuangan tersebut dilakukan secara aseptik pada saat media masih dalam keadaan cair, kemudian dibiarkan memadat.

Media cair yang digunakan untuk fermentasi khamir ini berupa media air kelapa. Air kelapa disaring 2 kali atau lebih dengan menggunakan kapas atau kertas saring. Derajat keasaman media diatur dalam pH 6 dengan menggunakan HCl 0.1 M atau KOH 0.1 M. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 20 menit.

2. Pembuatan Kultur Induk dan Kultur Kerja

Khamir *Phaffia rhodozyma* diperoleh dari BCCM (Belgian Co-ordinated Collection of Microorganism). Kultur induk dan kultur kerja dibuat dengan menginokulasi *P. rhodozyma* ke media agar miring, dibiarkan 3 hari pada suhu ruang kemudian disimpan dalam kulkas pada suhu 4 °C.

3. Radiasi Sinar Ultraviolet

Mutagenesis pada *Phaffia rhodozyma* dilakukan dengan sinar ultraviolet. Radiasi sinar ultraviolet dilakukan pada sel-sel khamir yang telah ditumbuhkan pada

medium cair selama 24 jam di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm (Kusdiyantini *et al.*, 2001) hingga OD-660 nm sebesar 0.4 (An *et al.*, 1989). Sebanyak 10 ml inokulum dituangkan ke cawan petri secara aseptik, kemudian dilakukan penyinaran dengan lampu UV panjang gelombang 254 nm dengan variasi lama penyinaran 0, 15, 30, 45 dan 60 menit. Sel ditumbuhkan selama 18 jam dalam kondisi gelap (An *et al.*, 1989). Selanjutnya dilakukan pengenceran dan penyebaran pada media agar dalam cawan petri, dan diinkubasi 3-5 hari hingga terbentuk koloni- koloni.

4. Seleksi Galur

Seleksi tahap I dilakukan dengan memilih koloni yang paling pekat warna merahnya. Warna merah tersebut menunjukkan bahwa sel khamir tersebut tidak kehilangan kemampuan dalam membentuk astaksantin. Koloni-koloni ini selanjutnya dipisahkan dari koloni yang lain dengan menumbuhkannya pada media agar miring, dibiarkan pada suhu kamar selama 3 hari kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Seleksi tahap II dilakukan dengan menumbuhkan kultur murni yang didapat pada seleksi tahap I, ke dalam medium fermentasi. Pada 120 jam masa inkubasi dilakukan pengukuran berat kering sel dan produksi pigmen karotenoidnya (Girard *et al.*, 1994). Kultur murni dari masing-masing radiasi yang memiliki produksi pigmen tertinggi dipilih sebagai kultur unggul yang akan dibandingkan dengan kultur kontrol.

5. Pembuatan Starter dan Fermentasi

Starter dibuat dengan menumbuhkan khamir ke dalam medium cair di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm (Kusdiyantini *et al.*, 2001) selama 24 jam (hingga OD-660 nm sebesar 0.4) untuk membuat starter (An *et al.*, 1989).

Sebanyak 10 % (v/v) starter dimasukkan ke dalam 100 ml medium cair, dan ditumbuhkan di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm selama 120 jam (Girard *et al.* 1994). Setiap 12 jam, dilakukan pengukuran pertumbuhan dan produksi pigmen.

6. Pengukuran Pertumbuhan

Pertumbuhan khamir diukur secara gravimetri, yaitu berdasarkan berat kering sel. Mula-mula tabung *ependorf* ditimbang untuk mengetahui berat keringnya. Sebanyak 1 ml kultur dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang telah diketahui berat keringnya tersebut. Kultur disentrifus dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang, pelet yang didapat dicuci dengan 1 mL akuades dan disentrifus kembali (Vasques *et al.*, 1998). Sel yang diperoleh dikeringkan dengan oven pada suhu 80 °C selama 36 jam (sampai beratnya konstan). Berat kering ditimbang dengan neraca analitik Sartorius. Berat kering sel khamir sama dengan berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat tabung *ependorf*.

7. Ekstraksi Pigmen dan Pengukuran Pigmen Total

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan metode Sedmak *et al.* (1990). Mula-mula diambil 2 ml kultur dan disentrifus dengan kecepatan 4500 rpm selama 10 menit. Pelet yang diperoleh dari isolasi sel tersebut ditambah *glass beads*, dan dikocok dengan *vortex*. Selanjutnya ditambahkan 0.5-1.0 ml DMSO (Dimetil sulfoksida) yang telah dipanaskan pada suhu 55 °C dan dikocok kembali. Sebanyak 1 mL sodium fosfat 0.1 M pH 7 ditambahkan dan dikocok kembali dengan *vortex*. Masing-masing pengocokan dilakukan selama 5 menit. Selanjutnya ditambah 2 ml pelarut organik (diethyl eter), dikocok hingga homogen, dan disentrifus pada kecepatan

4500 rpm selama 10 menit. Pigmen akan berada pada bagian atas larutan tersebut. Pemisahan pigmen dari fasa dibawahnya dilakukan dengan memakai mikropipet. Kemudian dilakukan evaporasi agar pigmen terpisah dari pelarut organik (dietil eter). Setelah kering, ditambah 5 mL pelarut organik (metanol) dan dikocok hingga homogen, kemudian diukur OD pigmen tersebut pada panjang gelombang 480 nm.

Pengukuran pigmen karotenoid total mengikuti metode An *et al.*, (1989). Pigmen total ditentukan dengan koefisien ekstinsi (*extinction coefficient*) 1% ($E_{1cm}^{1\%} = 1600$), 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 = densitas optik pada λ 480 nm
- $E_{1cm}^{1\%}$ = koefisien ekstinsi 1% = 1600
- P = berat kering sel (g/ml)

3.4 Parameter

Parameter-parameter yang diamati:

- Parameter utama adalah produksi pigmen total dari kultur hasil radiasi dan kultur kontrol.
- Parameter pendukungnya berupa jumlah koloni hasil radiasi dan pertumbuhan khamir.

3.5 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal, yaitu kultur hasil radiasi sinar ultraviolet dengan variasi lama penyinaran 0', 15', 30', 45' dan 60'. Percobaan dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam pada taraf uji 1%, bila terdapat beda nyata dilakukan uji lanjut.

Bagan percobaan radiasi sinar ultraviolet dengan berbagai variasi lama penyinaran terdapat pada Tabel 02.

Tabel 02. Bagan Percobaan Hasil Radiasi Sinar Ultraviolet

Lama Radiasi (menit)	Jumlah Koloni
0 (P ₀)	P ₀
15 (P ₁)	P ₁
30 (P ₂)	P ₂
45 (P ₃)	P ₃
60 (P ₄)	P ₄

Bagan percobaan produksi pigmen karotenoid total dari mutan *Phaffia rhodozyma* hasil radiasi sinar ultraviolet terdapat pada Tabel 03.

Tabel 03. Bagan Percobaan Produksi Pigmen

Ulangan	Produksi pigmen ($\mu\text{g/g}$)				
	0' (M ₀)	15' (M ₁)	30' (M ₂)	45' (M ₃)	60' (M ₄)
U ₁	M ₀ U ₁	M ₁ U ₁	M ₂ U ₁	M ₃ U ₁	M ₄ U ₁
U ₂	M ₀ U ₂	M ₁ U ₂	M ₂ U ₂	M ₃ U ₂	M ₄ U ₂
U ₃	M ₀ U ₃	M ₁ U ₃	M ₂ U ₃	M ₃ U ₃	M ₄ U ₃
Rata-rata	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_3	\bar{Y}_4	\bar{Y}_5