

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika FMIPA UNDIP pada bulan Januari - Maret 2005.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

##### **3.2.1. Alat**

Erlenmeyer, tabung reaksi, oven, gelas beaker, autoklaf, spektrofotometer Spectronik- 20, "rotary shaker", ose, gelas ukur, lampu spirtus, mikroskop, pipet ukur, sentrifuge, "vortex", "glass beads", timbangan, batang pengaduk, tabung "ependorf", neraca sartorius, desikator, "hemocytometer", termometer, pH stick, dan penangas air.

##### **3.2.2. Bahan**

Kultur murni *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18 yang diperoleh dari koleksi kultur Universitas Indonesia, "Potato Dextrose Agar" (PDA), akuades, alkohol 70%, kapas, reagen dinitro salisilat (DNS), metanol, biru metilen, buffer fosfat, eter, dimetil sulfoxide (DMSO), spirtus, NAOH 2 M, potasium tartrat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , "ekstrak yeast", sodium fosfat, dan glukosa murni.

### 3.3. Cara Kerja

#### 3.3.1. Penyediaan biakan murni

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC-Y18 dari koleksi kultur Universitas Indonesia, dibuat subkultur pada medium PDA miring dan diinkubasikan pada temperatur ruang selama 120 jam. Biakan ini selanjutnya digunakan sebagai kultur stok dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu penyimpanan 4 °C.

#### 3.3.2. Pembuatan Medium Starter dan Pertumbuhan (Costa *et al.*, 1987)

Medium starter dan pertumbuhan mengandung komposisi sebagai berikut : glukosa (10.0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5.5 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.7 g/L) dan “ekstrak yeast” (1.0 g/L). Derajat keasaman (pH) medium diatur menjadi 6.5 dan seluruh medium selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121 °C pada tekanan 2 atm selama 20 menit. Pengukuran pH dilakukan kembali setelah sterilisasi.

#### 3.3.3. Pembuatan Kultur Starter

Dua ose biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium PDA miring umur 120 jam diinokulasikan pada erlenmeyer 250 mL yang berisi medium starter. Kultur kemudian diinkubasi pada “rotary shaker” dengan kecepatan agitasi 180 rpm selama 21 jam pada temperatur kamar sampai didapatkan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/mL (Trismilah, 1985).

### 3.3.4. Kondisi pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18

Penelitian dilaksanakan dengan mengamati profil pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang ditumbuhkan dalam kondisi fermentasi *batch* dan *fed batch*.

#### 3.3.4.1. Fermentasi *Batch*

Starter sebanyak 10% (v/v) dengan kepadatan sel  $10^7$  sel/mL diinokulasikan pada medium perlakuan dalam erlenmeyer 250 mL dengan volume medium 100 mL, diinkubasi pada “rotary shaker” dengan kecepatan agitasi 180 rpm pada suhu ruang.

#### 3.3.4.2. Fermentasi *Fed Batch*

Kondisi pertumbuhan ini sama dengan fermentasi *batch* dengan penambahan glukosa saat fermentasi berlangsung. Glukosa ditambahkan ke dalam kultur hingga mencapai konsentrasi glukosa medium  $\pm 10$  g/L pada inkubasi ke-48 jam, di saat persediaan glukosa dalam medium menipis.

Pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap interval waktu inkubasi 12 jam selama 10 hari. Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan pengukuran pigmen total, konsentrasi gula reduksi, dan pengukuran pH.

### 3.3.5. Pengukuran Biomassa *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Pertumbuhan ditentukan berdasarkan pengukuran biomassa sel, yaitu dengan metode gravimetri. Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung eppendorff kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Setelah supernatan dipisahkan, pelet dicuci dengan akuades 1 mL dan disentrifugasi kembali. Pelet selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 36 jam kemudian ditimbang berat keringnya dengan neraca Sartorius hingga mencapai berat konstan. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering tabung "eppendorff", hasilnya merupakan berat kering (biomassa) sel *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18 (g/mL) (Kusdiyantini *et al.*, 2001).

### 3.3.6. Pengukuran produksi pigmen karotenoid

Sampel sebanyak 2 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 0,1 mL sodium fosfat pH 7 dan 1 mL dimetil sulfoxide (DMSO 0,1 M) yang telah dipanaskan hingga temperatur 55°C bersama "glass beads". Campuran dihomogenisasi selama 15 menit dengan menggunakan vortex kemudian ditambah dengan 2,0 mL eter. Campuran dihomogenisasi kembali selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Dua fasa yang diperoleh dipisahkan, pigmen akan terdapat di fasa atas tercampur eter, diambil dengan mikropipet untuk dipindahkan ke tabung reaksi dan dievaporasi sampai kering. Setelah eter menguap/kering, pigmen

ditambah dengan metanol 5 mL dan dipindahkan ke cuvet spektrofotometer untuk mendapatkan nilai absorbansinya (Sedmak *et al.*, 1990).

Pengukuran pigmen total (An *et al.*, 1989) ditentukan dengan koefisien ekstinsi (extinction coefficient) 1% ( $E_{1cm}^{1\%} = 2680$ ) dengan formulasi sebagai berikut :

$$X = \frac{X'}{BK} \times 10^3$$

Keterangan :

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

X ' diperoleh melalui perhitungan:

$$X' = \frac{(A - 480)(v_1)}{(E_{1cm}^{1\%})(v_2)} \times 10^4$$

$v_1$  = volume larutan pigmen (methanol) (mL)

$v_2$  = volume sampel (mL)

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

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

BK = berat kering sel (biomassa) (g/L)

### 3.3.7. Analisis Gula Pereduksi dengan Metode DNS

Glukosa dianalisis dengan menggunakan metode DNS (Rickwood & Martin, 1994) menggunakan kontrol reagen DNS tanpa sampel. Sampel sebanyak 0,1 mL ditambah 1 mL reagen DNS selanjutnya digojok dan dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Sampel didinginkan dalam suhu ruang kemudian diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula

reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa yang dibuat dengan konsentrasi 0-1 mg/mL dengan interval 0,2 (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1) kemudian dibuat persamaan regresi hubungan antara absorbansi (OD) dan konsentrasi glukosa.

### 3.4. Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

#### a. Parameter utama

- Berat kering sel (g/L) *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18
- Jumlah pigmen total ( $\mu\text{g/g}$ ) *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

#### b. Parameter pendukung

- Konsentrasi gula pereduksi (g/L)
- pH medium selama fermentasi

### 3.5. Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan mengamati profil pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18 yang ditumbuhkan pada sistem fermentasi yang berbeda, yaitu *batch* dan *fed batch*, dengan sampel masing-masing sebanyak 10. Variabel bebasnya adalah sistem fermentasi *batch* dan *fed batch*. Variabel tergantungnya adalah berat kering sel dan pigmen total. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji t sampel bebas dengan taraf uji 5%.