

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai bulan Oktober 2004 di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro.

3.2. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dari Universitas Indonesia Culture Collection, PDA, air kelapa, aquadest, L-Leusin, HCL 0,1 N; NaOH 0,5 N; sodium phosphat 0,1 N; DMSO (Dimethyl Sulfoxide), eter, metanol, kapas, kertas saring, spiritus, metilen biru dan alkohol 70%.

3.3. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah gelas ukur 50 mL, gelas beaker 500 mL, tabung reaksi, erlenmeyer 250 mL, tabung “ependorff”, “cuvet sentrifuge”, “cuvet spektrofotometer”, mikropipet, pipet tetes, pipet ukur, batang pengaduk, lampu spiritus, jarum ose, “magnetic stirer”, autoklaf, oven, termometer, sentrifuge, eksikator, spektrofotometer, hemositometer, “rotary shaker”, “vortex”, neraca analitis, lemari pendingin dan penangas air.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan medium PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Setelah itu diatur pH-nya menjadi 5,5 dengan menambahkan HCl 0,1 N. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama ± 20 menit pada temperatur 121°C dengan tekanan 2 atmosfer.

3.4.2. Penyediaan biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 diperoleh dari Universitas Indonesia Culture Collection, kemudian dibuat subkultur pada medium PDA miring dan diinkubasi pada temperatur 30°C selama ± 48 jam. Biakan ini selanjutnya akan digunakan sebagai “stock culture” dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.3. Pembuatan Medium Air Kelapa

Air kelapa yang akan digunakan disaring terlebih dahulu kemudian dilakukan pengaturan pH medium menjadi 5,5 dengan penambahan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N. Selanjutnya dibagi ke dalam 12 erlenmeyer, kemudian dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama ± 20 menit pada temperatur 121°C dengan tekanan 2 atm. Sebagai perlakuan ditambahkan asam amino L-Leusin dengan konsentrasi 0,05%; 0,1% dan 0,15% (b/v) sedangkan kontrol tanpa penambahan asam amino L-Leusin. Penambahan L-Leusin dilakukan setelah medium cukup dingin.

3.4.4. Pembuatan Starter

Biakan murni *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada media PDA miring umur dua hari yang diinkubasi pada temperatur 30°C, diinokulasikan pada medium starter sebanyak 2 ose. Kemudian diinkubasi pada “rotary shaker” dengan agitasi 180 rpm selama 20 – 24 jam pada temperatur kamar sampai didapatkan kepadatan 10^7 sel/mL (Trismilah, 1995).

3.4.5. Inokulasi dan Inkubasi

Ke dalam media perlakuan diinokulasikan starter sebanyak 10% (v/v) dengan kepadatan sel 10^7 sel/mL, selanjutnya diinkubasi pada “rotary shaker” dengan agitasi 180 rpm pada temperatur ruang (Frengova *et al.*, 1997). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap interval waktu 12 jam selama 5 hari. Bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan dilakukan pengukuran pigmen total dan konsentrasi gula reduksi.

3.4.6. Pengukuran Pertumbuhan

Pengukuran pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dilakukan dengan metode gravimetri (berat kering sel) dengan cara sebagai berikut: kultur diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung “ependorf” yang telah diketahui berat keringnya. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit (Vazques *et al.*, 1998). Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan aquades untuk kemudian disentrifugasi kembali. Pelet yang didapatkan dikeringkan dalam oven pada suhu 80 °C selama 36 jam, kemudian ditimbang berat keringnya

dengan menggunakan neraca analitik Sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering “ependorf” merupakan berat kering sel *R. mucilaginos*a UICC Y-18 (g/mL).

3.4.7. Isolasi Sel dan Ekstraksi Pigmen Total

3.4.7.1. Isolasi Sel

Kultur sebanyak 2 mL disentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 15 menit, pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan 2 mL aquadest dan disentrifugasi kembali (Vazques *et al.*, 1998). Pelet yang dihasilkan selanjutnya diekstraksi pigmennya.

3.4.7.2. Ekstraksi Pigmen Total

Pelet yang diperoleh dari isolasi sel diatas kemudian ditambah dengan 0.1 mL sodium fosfat pH 7 dan 1 mL DMSO (Dimethyl Sulfoxide) yang telah dipanaskan hingga temperatur 55°C serta “glass bead”. Larutan tersebut dihomogenasi menggunakan “vortex” selama 15 menit, kemudian ditambah 0,1 mL(0,01 M) sodium fosfat pH 7,0 dan 2 mL pelarut organik (ether petrole). Campuran tersebut kemudian dihomogenasi menggunakan “vortex” selama 10 menit, setelah itu dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi larutan akan terbagi dalam dua fasa, pigmen akan terdapat pada bagian atas larutan. Pigmen dipisahkan dari pelarut organik (ether petrole) dengan cara evaporasi. Setelah kering ditambahkan pelarut organik (metanol) pada volume yang diketahui.

3.4.8. Pengukuran Pigmen Total (PCT, 1988)

Pigmen total ditentukan dengan koefisien ekstinsi (extinction coefficient)

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

$$X' = \frac{(A - 480)(V_1)}{(E_{1cm}^{1\%})(V_2)} \times 10^4$$

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

dimana :

- X' = pigmen yang dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$).
- X'' = pigmen yang dihasilkan ($\mu\text{g/g}$).
- V_1 = volume pelarut (metanol) (mL)
- V_2 = volume sampel (mL)
- P = berat kering sel (g/L)
- $A-480$ = optikal densitas yang diukur pada $\lambda = 480 \text{ nm}$

3.4.9. Analisis Konsentrasi Gula Reduksi dengan Metode DNS (Rickwood and Martin, 1994)

Sampel sebanyak 0,1 mL ditambah 1 mL reagen DNS kemudian dicampur dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu sampel diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa yang dibuat dengan konsentrasi 0 – 1 g/L dengan interval 0,2 g/L.

3.5. Parameter

3.5.1. Parameter Utama

- Berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (metode gravimetri).
- Jumlah pigmen total (karotenoid).

3.5.2. Parameter Pendukung

- Konsumsi gula reduksi dengan standar glukosa (metode DNS).

3.6. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap Faktor Tunggal, yaitu penambahan asam amino L-Leusin dengan konsentrasi yang berbeda: L₀ (kontrol), L₁ (0,05% b/v), L₂ (0,1% b/v), dan L₃ (0,5% b/v). Pada masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

| Perlakuan | Ulangan | | |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| L ₀ | L ₀ U ₁ | L ₀ U ₂ | L ₀ U ₃ |
| L ₁ | L ₁ U ₁ | L ₁ U ₂ | L ₁ U ₃ |
| L ₂ | L ₂ U ₁ | L ₂ U ₂ | L ₂ U ₃ |
| L ₃ | L ₃ U ₁ | L ₃ U ₂ | L ₃ U ₃ |

Data yang diperoleh dianalisis dengan Anova pada taraf uji 5%, bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan Uji lanjut pada taraf uji yang sama