

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi, Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Agustus 2001.

B. Alat dan Bahan

B.1. Alat :

Erlenmeyer, pipet ukur, "cuvet", ose, sentrifuga, spektrofotometer Spectronic 20, autoklaf, "beaker glass", oven, "rotary shaker", "horizontal shaker", tabung reaksi, "Laminar Air Flow", bunsen, "hemocytometer", saringan, mikroskop, "hot plate".

B.2. Bahan :

Kultur *P. rhodozyma* galur liar ("wild strain") dari BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganism), air kelapa, PDA (Potato Dekstrosa Agar) merk "DIFCO", DMSO (Dimetil Sulfoxide), sodium fosfat, eter, metanol, alkohol, air destilasi, DNS (Dinitro Salisilat), glukosa.

C. Cara Kerja

C.1. Pembuatan Kultur Kerja

Kultur kerja dibuat dengan menggunakan media PDA. Kultur ini diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar, kemudian disimpan di dalam kulkas dengan suhu penyimpanan 4⁰C.

C.2. Pembuatan Medium Air Kelapa

Air kelapa disaring kemudian ditampung dalam “beaker glass”, kemudian dilakukan pengaturan pH supaya mencapai pH 5,5. Air kelapa ini kemudian dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml dengan volume 100 ml, kemudian disterilisasi dengan autoklaf (suhu 110⁰ C, tekanan 2 atm, selama 20 menit).

C.3. Pembuatan Kultur Starter

Medium air kelapa sebanyak 100 ml yang telah disterilkan diinokulasi dengan kultur *P. rhodozyma*. Kultur starter ini diinkubasi di atas “rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm pada suhu kamar selama 24 jam (sampai densitas selnya mencapai 10⁷ sel/ml). Pengukuran densitas sel dilakukan dengan menggunakan “hemocytometer” dengan penambahan metilen biru.

C.4. Inokulasi dan Inkubasi

Medium air kelapa steril dalam erlenmeyer sebanyak 100 ml diinokulasi dengan kultur starter sebanyak 5% (v/v). Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari di atas “rotary shaker” dengan kecepatan 100 rpm (P1), 200 rpm (P2), 300 rpm (P3). Masing-masing perlakuan ini diulang sebanyak 9

kali. Pengambilan sampel untuk pengukuran biomassa sel, produksi pigmen total, dan konsentrasi gula reduksi dilakukan setiap interval waktu 12 jam.

C. 5. Penentuan Biomassa *P. rhodozyma* (Kusdiyantini dkk., 2001)

Biomassa diukur dengan metode gravimetri, dengan cara : kultur diambil sebanyak 1 ml, disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang didapatkan dicuci dengan air destilasi untuk kemudian disentrifugasi lagi. Terakhir pelet dikeringkan dalam oven 80⁰C selama 36 jam sampai mencapai berat konstan.

C.6. Pengukuran Pigmen Total (Kusdiyantini dkk., 2001)

Pigmen total (karotenoid) pada *P. rhodozyma* didapatkan dengan memecah selnya dengan cara sebagai berikut : kultur sebanyak 1 ml disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Pelet yang didapatkan selanjutnya dicuci dengan air destilasi dan disentrifugasi lagi. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 0,5 – 1 ml DMSO yang dipanaskan pada temperatur 55⁰C. Pelet yang merupakan sel *P. rhodozyma* ini kemudian dipecah dengan menggunakan “horizontal shaker” dengan penambahan “glass bead” selama 15 menit, kemudian ditambah 0,1 ml (0,01 M) sodium fosfat pH 7 dan 2 ml pelarut organik (eter petrol). Setelah itu di”shaker” lagi dengan “horizontal shaker” selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pigmen karotenoid dalam eter dipisahkan dengan cara evaporasi. Setelah kering ditambahkan pelarut organik (metanol) pada volum yang diketahui. Pigmen total diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm. Pigmen total

ditentukan dengan koefisien extinction 1% ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1600$) dengan formulasi sebagai berikut (An *et al*, 1989) :

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

V : volum larutan pigmen (ml)

A - 480 : optikal densitas yang diukur untuk absorpsi maksimum

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: Coefficient extinction %

P : Berat kering sel (gram)

C.7. Analisis Konsentrasi Gula Reduksi dengan Metode DNS (Rickwood dan Hames, 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 (Rickwood dan Hames, 1994). 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).

D. Parameter yang Diamati

a. Parameter utama :

- Biomassa (berat kering) *P. rhodozyma*.
- Jumlah pigmen total (karotenoid).

b. Parameter pendukung :

- Konsumsi gula reduksi dengan standar glukosa.

E. Analisis Data (Montgomery, 1984)

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri atas 3 perlakuan dengan 9 kali ulangan, dengan variabel bebas adalah kecepatan agitasi ($P1 = 100 \text{ rpm}$, $P2 = 200 \text{ rpm}$, dan $P3 = 300 \text{ rpm}$), sedangkan variabel tergantungnya adalah biomassa sel dan pigmen total (karotenoid). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA (“analysis of varian”) dengan taraf uji 1%. Jika berbeda nyata dilanjutkan uji Duncan dengan taraf uji 1%.

