IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat/Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi F MIPA Universitas Diponegoro

Waktu : November 1997 - Mei 1998

B. Alat dan Bahan

Alat :

Tabung reaksi, kapas penyumbat, blender, petridish, pembakar spiritus, pipet, pengaduk, mikroskop, kertas saring, "colony counter", timbangan Sartorius, hemositometer, labu erlenmeyer, spektrofotometer spectronic 20, pH meter, inkubator, inkubator goyang, sentrifuga, oven, autoklaf, gelas ukur, jarum ose, laminar air flow, kaca obyek, rak tabung, alumonium foil, ayakan, ember.

Bahan :

Limbah brem padat dari Madiun, biakan murni *M. purpureus* hasil isolasi pada PDA, aquadest, NH_4NO_3, NaOH 2M, garam fisiologis (9 g/l NaCl), zat pewarna merah amaranth, medium yang terdiri dari: KH_2PO_4 0,24 gr; K_2HPO_4 0,24 gr; $MgSO_4$.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

$7H_2O$ 0,1 gr; KCl 0,05 gr; $FeSO_4$. 7H2O 0,001 gr; $ZnSO_4$. $7H_20$ 0,001 gr dan $MnSO_4$. H_2O 0,0003 gr yang dilarutkan dalam 100 ml aquadest.

C. Cara Kerja

1. Penyiapan Medium Pertumbuhan *M. purpureus*

- Penyiapan Pati dari Limbah Padat Brem (Mulyohardjo, 1988)

Limbah padat brem sebanyak 1 kg dihaluskan dengan blender sampai halus. Setelah menjadi bubur yang halus dilarutkan dengan aquadest sebanyak 3 liter dan diaduk selama 1 jam, kemudian disaring dengan ayakan dan diendapan selama 12 jam. Endapan selanjutnya dikeringkan kemudian dihaluskan dan diayak sehingga didapatkan pati dari limbah brem.

Lima gram pati limbah brem tersebut kemudian dilarutkan dalam medium dan disterilkan pada suhu 121^0C selama 15 menit (Lin dan Demain, 1995). Medium dibuat sebanyak 5 macam perlakuan dengan penambahan NH_4NO_3 0 gr/100 ml (0 ppm); 0,1gr/100 ml (1000 ppm); 0,2 gr/100 ml (2000 ppm); 0,3 gr/100 ml (3000 ppm) dan 0,4 gr/100 ml (4000 ppm).

2. Persiapan Inokulum

Dipersiapkan media PDA lalu diinokulasi dengan biakan kapang *M. purpureus* dan diinkubasi pada suhu 30^0C selama 10 hari. Ke dalam biakan ditambah garam fisiologis (9 gr/l NaCl) dan digojok hati-hati

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

untuk mendapatkan suspensi spora dan ditentukan jumlah sporanya dengan hemositometer. Suspensi spora dengan kepadatan $9,35.10^8$ /ml dipergunakan sebagai inokulum (Lin dan Demain, 1995)

3. Fermentasi

Kultur diinkubasi di atas inkubator goyang selama 7 dan 9 hari dengan kecepatan 200 rpm pada suhu kamar.

4. Analisa Pigmen

a. Pigmen Ekstraseluler

Pada akhir fermentasi, miselia disaring dan dicuci dengan aquadest sebanyak dua kali, masing - masing dengan volume 20 ml. Filtrat diencerkan hingga 100 ml, kemudian disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 ηm (Lin dan Demain, 1995).

b. Pigmen Intraseluler

Miselia yang sudah dicuci kemudian diekstraksi dengan 50 ml ethanol 95% selama 12 jam. Ekstrak diencerkan hingga 100 ml, kemudian disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 ηm. Dua nilai (Ekstraseluler dan intraseluler) ditambahkan untuk memberikan total

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

absorbansi, yang digunakan sebagai indeks volume produksi pigmen (Lin dan Demain, 1995).

5. Penentuan Konsentrasi Produksi Pigmen Merah

Untuk menentukan konsentrasi produksi pigmen merah ditentukan berdasarkan kurva standar zat pewarna merah amaranth. Kurva standar dibuat dengan cara melarutkan 100 mg amaranth kedalam 100 ml aquadest dan dilakukan pengenceran untuk mendapat konsentrasi 0,01; 0,02; ... , 0,1 mg/ml. Untuk menentukan konsentrasi pigmen merah yang diproduksi oleh *M. purpureus* pada medium pati limbah brem padat, data absorbansi produksi pigmen merah pada medium pati limbah brem padat diplotkan kedalam kurva standar.

D. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah produksi pigmen merah dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 ηm.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

E. Analisis Data

Data yang didapatkan dari pengukuran produksi pigmen merah dianalisis dengan menggunakan ANOVA. Rancangan yang digunakan adalah Percobaan Faktorial (2 x5), dengan 2 perlakuan waktu fermentasi dan 5 perlakuan konsentrasi amonium nitrat dengan didasari Rancangan Acak Lengkap untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antar perlakuan. Kemudian dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan menggunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Sebelum data dianalisis dengan ANOVA, dilakukan uji Normalitas dan Homogenitas.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)