



UNIVERSITAS INDONESIA

JUDUL
PENINGKATAN PRODUKSI RIBOFLAVIN BAKTERI
***Acetobacter xylinum* PADA STARTER NATA DE COCO**
DENGAN PENAMBAHAN MINYAK KELAPA SAWIT

SKRIPSI

ANNISA SHAIRA DEWI
0706269640

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

HALAMAN JUDUL
PENINGKATAN PRODUKSI RIBOFLAVIN BAKTERI
***Acetobacter xylinum* PADA STARTER NATA DE COCO**
DENGAN PENAMBAHAN MINYAK KELAPA SAWIT

SKRIPSI
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Teknik

ANNISA SHAIRA DEWI
0706269640

FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Annisa Shaira Dewi

NPM : 0706269640

Tanda Tangan : 

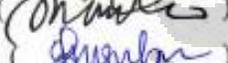
Tanggal : 28 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Annisa Shaira Dewi
NPM : 0706269640
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Peningkatan Produksi Riboflavin Bakteri
Acetobacter xylinum pada Starter *Nata de Coco* dengan Penambahan Minyak
Kelapa Sawit

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Ir. Rita Arbianti, M.Si ()
Penguji : Dianursanti, ST, MT ()
Penguji : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng ()
Penguji : Ir. Praswasti PDK Wulan, MT ()

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ir. Rita Arbianti, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Para dosen dan karyawan Departemen Teknik Kimia FTUI yang telah banyak membantu;
3. Teh Rini Handayani, S.Si dan Teh Ninuk serta semua peneliti di LIPI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini;
4. Orangtua yang selalu memberi dukungan dan semangat selama mengerjakan skripsi ini di rumah;
5. Denov, Anthony, Mirza, dan teman-teman RG Bioproses yang selalu ada saat duka dan duka, serta semua teman-teman Teknik Kimia UI 2007 yang selalu berbagi informasi dan memberikan dorongan semangat.

Penulis menyadari bahwa dalam makalah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan skripsi ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca serta dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, 13 Juni 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annisa Shaira Dewi
NPM : 0706269640
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis Karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Peningkatan Produksi Riboflavin Bakteri *Acetobacter xylinum* pada Starter *Nata de Coco* dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 28 Juni 2011

Yang menyatakan



(Annisa Shaira Dewi)

ABSTRAK

Nama : Annisa Shaira Dewi
Departemen : Teknik Kimia
Judul : Peningkatan Produksi Riboflavin Bakteri *Acetobacter xylinum* pada Starter *Nata de Coco* dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit

Defisiensi riboflavin (vitamin B2) banyak terjadi pada negara berkembang, seperti Indonesia. Sebagai penghasil kelapa no.2 di dunia, peningkatan riboflavin dapat dilakukan pada produk dari kelapa, yaitu *nata de coco*. Pada starter *nata de coco* dilakukan variasi rasio penambahan minyak kelapa sawit, *optical density* (OD), dan pelarut inokulum yang digunakan. Pengukuran dilakukan dengan metode *optical density* menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 444 nm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan minyak kelapa sawit dapat meningkatkan produksi riboflavin bakteri *Acetobacter xylinum* pada starter *nata de coco*. Konsentrasi riboflavin tertinggi sebesar 5,77 mg/L diperoleh pada starter dengan penambahan 90 g/L minyak kelapa sawit dengan OD dua dan air kelapa sebagai pelarut inokulum.

Kata kunci:

Riboflavin, *Acetobacter xylinum*, starter *nata de coco*, minyak kelapa sawit

ABSTRACT

Name : Annisa Shaira Dewi
Department : Chemical Engineering
Title : Increasing *Acetobacter xylinum* Riboflavin Production in Nata de
Coco Starter by Palm Oil Addition

Deficiency of riboflavin (vitamin B₂) occurs in many developing countries, like Indonesia. As the world's No.2 coconut producer, increased riboflavin can be performed on the product of the coconut, such as nata de coco. On the nata de coco starter, the ratio of the addition of palm oil, optical density (OD), and the inoculum solvents are vary. Measurements were taken with an optical density method using a spectrophotometer at 444 nm. The results of this study show that adding palm oil can increase the riboflavin production of *Acetobacter xylinum* in nata de coco starter. The highest riboflavin concentration of 5.77 mg/L was obtained at the starter with the addition of 90 g/L palm oil with OD two and coconut water as an inoculum solvent.

Key words:

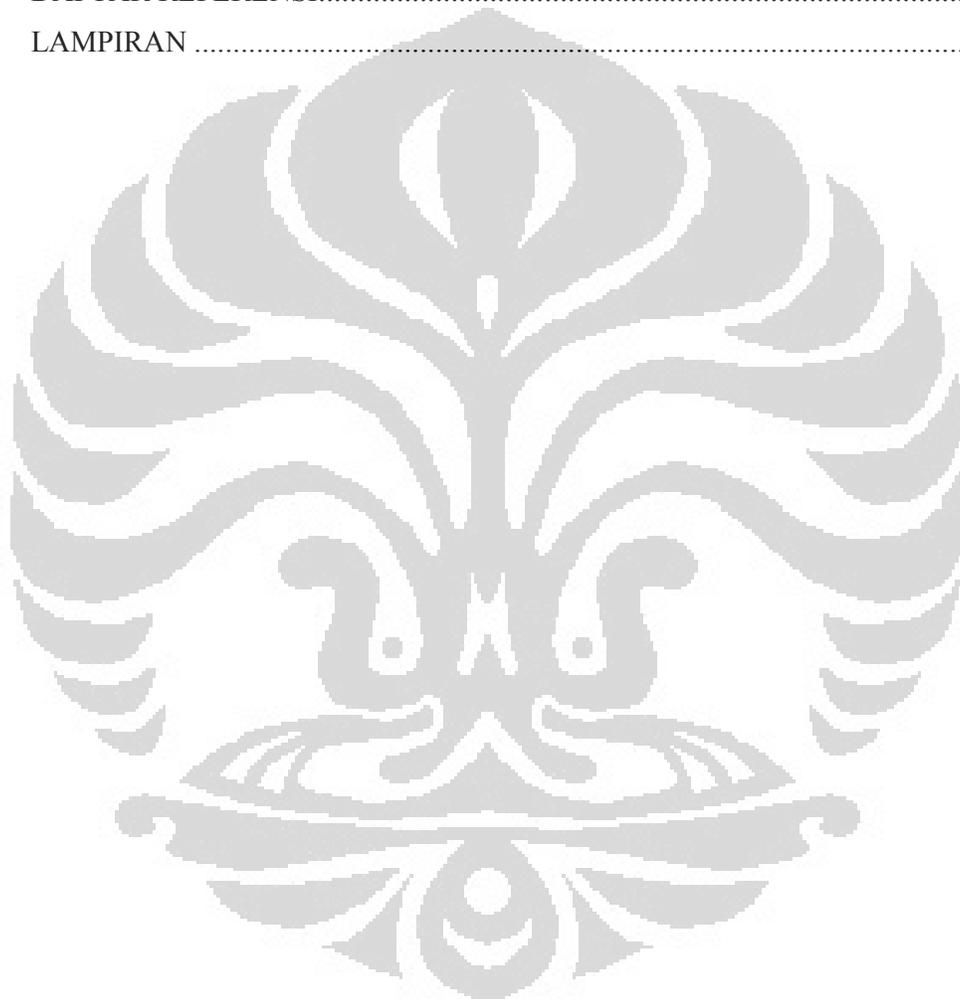
Riboflavin, *Acetobacter xylinum*, nata de coco starter, palm oil

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK.....	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Batasan Penelitian	3
1.5 Tempat dan Waktu	3
BAB 2.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	4
2.2 <i>Nata de coco</i>	5
2.3 Riboflavin	7
2.4 Minyak Kelapa Sawit	9
2.5 Analisis Spektrofotometri.....	11
2.6 <i>State of the Art</i>	12
BAB 3.....	16
METODE PENELITIAN	16
3.1 Diagram Alir Penelitian.....	16
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Peralatan	18

3.2.2 Bahan.....	19
3.3 Prosedur Penelitian.....	20
3.3.1 Pra Eksperimen Riboflavin.....	20
3.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	20
3.3.1.2 Pembuatan Larutan.....	21
3.3.2 Eksperimen Riboflavin.....	22
3.3.2.1 Pembuatan Starter Nata de Coco dari Starter Komersil.....	22
3.3.2.2 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA).....	23
3.3.2.3 Pemiakkan Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	24
3.3.2.4 Pembuatan Inokulum.....	24
3.3.2.5 Pembuatan Starter Nata de Coco Tahap I.....	26
3.3.2.6 Pembuatan Starter Nata de Coco Tahap II.....	28
3.3.2.7 Pembuatan Starter Nata de Coco Tahap III.....	30
3.3.2.8 Pembuatan Nata de Coco.....	32
3.3.2.9 Pengukuran Konsentrasi Riboflavin.....	34
BAB 4.....	36
PEMBAHASAN.....	36
4.1 Kalibrasi Standar Riboflavin.....	36
4.2 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter <i>Nata de Coco</i>	36
4.2.1 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter <i>Nata de Coco</i> Komersil.....	37
4.2.2 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter <i>Nata de Coco</i> dari Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	40
4.2.2.1 Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	41
4.2.2.2 Starter Nata de Coco dari Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	42
4.3 Variasi Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter <i>Nata de Coco</i> dari Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	44
4.3.1 Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter <i>Nata</i> <i>de Coco</i>	44
4.3.2 Variasi Inokulum pada Starter <i>Nata de Coco</i> dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 30 g/L.....	48

4.3.3	Variasi Inokulum pada Starter <i>Nata de Coco</i> dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 90 g/L	50
BAB 5.....		55
KESIMPULAN DAN SARAN		55
5.1	Kesimpulan	55
5.2	Saran	55
DAFTAR REFERENSI.....		56
LAMPIRAN		58

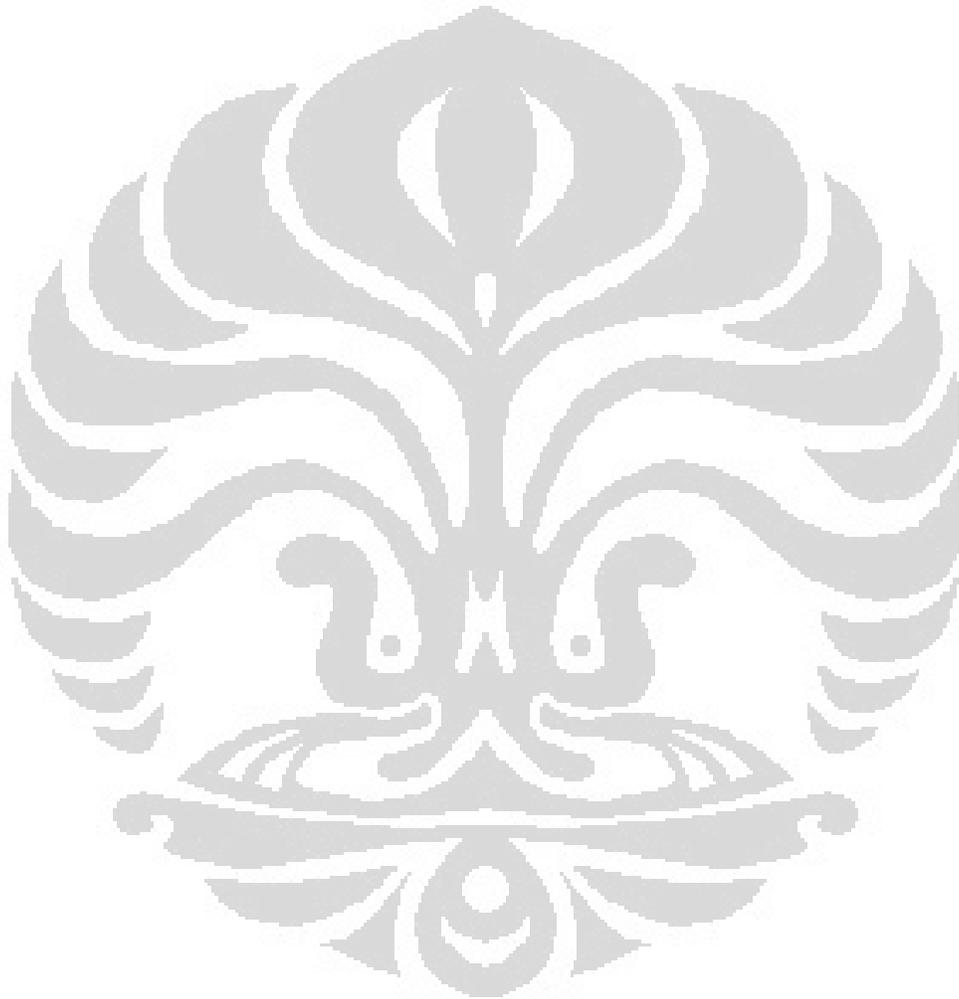


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	4
Gambar 2. 2 <i>Nata de coco</i>	6
Gambar 2. 3 Struktur Riboflavin	7
Gambar 2. 4 Struktur Kimia FAD dan FMN	8
Gambar 2. 5 Minyak Kelapa Sawit.....	9
Gambar 2. 6 Reaksi Pembentukan Triglicerida	10
Gambar 2. 7 Skema Kerja Alat Spektrofotometer	12
Gambar 2. 8 Spektrofotometer UV-Visible	12
Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian Riboflavin	16
Gambar 3. 2 Pembuatan Starter Nata de Coco dari Starter Komersil.....	22
Gambar 3. 3 Diagram Alir Pembuatan Starter Tahap I.....	26
Gambar 3. 4 Diagram alir pembuatan starter dengan variasi penambahan volume minyak.....	28
Gambar 3. 5 Diagram alir pembuatan starter dengan variasi OD dan pelarut inokulum.....	30
Gambar 3. 6 Diagram alir pembuatan <i>nata de coco</i>	32
Gambar 3. 7 Diagram alir pengukuran konsentrasi riboflavin	34
Gambar 4. 1 Konsentrasi Riboflavin pada Starter <i>Nata de Coco</i> Komersil.....	38
Gambar 4. 2 Konsentrasi Riboflavin pada Kultur <i>Ashbiya gossypii</i>	39
Gambar 4. 3 Fase Pertumbuhan Mikroorganisme	39
Gambar 4. 4 Media <i>nutrient agar</i> (NA) miring	41
Gambar 4. 5 Hasil Pemiakkan Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	42
Gambar 4. 6 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter <i>Nata de coco</i> dengan dan Tanpa Penambahan Minyak Kelapa Sawit	43
Gambar 4. 7 Kurva Pengukuran Konsentrasi Riboflavin pada Kultur <i>Ashbiya gossypii</i>	45
Gambar 4. 8 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter <i>Nata de Coco</i> dengan Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit	46
Gambar 4. 9 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter <i>Nata de coco</i> dengan Variasi Inokulum dan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 30 g/L	49

Gambar 4. 10 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de coco* dengan
Variasi Inokulum dan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 90 g/L ..51

Gambar 4. 11 *Nata de Coco* Terkontaminasi 53



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Komposisi Asam Lemak dalam Minyak Kelapa Sawit.....	10
Tabel 2. 2 Standar Mutu Minyak Sawit <i>Special Prime Bleach</i> (SPB).....	11
Tabel 2. 3 <i>State of the Art</i>	13
Tabel 4. 1 Peningkatan Konsentrasi Riboflavin pada Berbagai Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit	47
Tabel 4. 2 Perbandingan Konsentrasi Riboflavin Optimum dari Berbagai Penelitian	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Data Pengukuran Absorbansi Riboflavin Standar.....	58
Lampiran 2.	Kurva Kalibrasi Standar Riboflavin.....	58
Lampiran 3.	Data Pengukuran Absorbansi pada Starter <i>Nata de Coco</i> Komersil.....	59
Lampiran 4.	Data Pengukuran Absorbansi pada Starter <i>Nata de Coco</i> Buatan dengan Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit.....	59
Lampiran 5.	Data Pengukuran Absorbansi Starter <i>Nata de Coco</i> dari Isolat Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i> dengan Variasi Inokulum.....	61
Lampiran 6.	Foto Alat-Alat yang Digunakan.....	62
Lampiran 7.	Foto Hasil Percobaan.....	63

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia sebagai negara tropis yang sangat kaya akan keanekaragaman hayati tentunya memiliki potensi sumber daya pangan yang perlu terus dikembangkan, salah satunya adalah tanaman kelapa. Saat ini Indonesia menjadi produsen kelapa terbesar kedua di dunia setelah Filipina (Deptan RI, 2008). Sayangnya, industri pengolahan buah kelapa umumnya masih terfokus kepada pengolahan hasil daging buah sebagai hasil utama, sehingga potensi produk samping seperti air kelapa masih belum dimanfaatkan secara optimal.

Pembuatan *nata de coco* yang terbuat dari limbah air kelapa dapat menjadi salah satu solusi untuk mengoptimasi pemanfaatan buah kelapa. Pengolahan limbah air kelapa menjadi suatu produk yang bernilai ekonomi tentunya diharapkan dapat meningkatkan nilai jual buah kelapa dan dapat meningkatkan kesejahteraan petani kelapa.

Nata de coco diperoleh dari air kelapa yang difermentasi dengan bantuan bakteri *Acetobacter xylinum*. *Nata de coco* memiliki konsentrasi serat yang tinggi sehingga baik untuk pencernaan. Namun, jika dilihat dari nilai gizinya, *nata de coco* memiliki nilai gizi yang rendah. Konsentrasi gizi nata yang dihidangkan dengan sirup adalah sebagai berikut: 67,7 persen air, 0,2 persen lemak, 12 mg kalsium, 5 mg zat besi, 2 mg fosfor, sedikit vitamin B1, sedikit protein, serta hanya 0,01 mikrogram riboflavin per 100 gramnya (Inacofood, 2008).

Riboflavin atau lebih sering dikenal dengan vitamin B2 merupakan unsur penting dalam tubuh karena memainkan peranan penting dalam metabolisme energi dan diperlukan dalam metabolisme lemak, zat keton, karbohidrat dan protein (Park dan Ming, 2003). Vitamin B2 ini tidak dapat diproduksi secara alami oleh tubuh sehingga perlu selalu diberi asupan dari luar (Park dan Ming, 2003). Mikroorganisme, seperti bakteri, yang berperan dalam proses fermentasi dipercaya mampu menghasilkan riboflavin dari proses sintesisnya (Tajima, dkk. 2009). Namun, jumlah riboflavin yang dihasilkan dari proses alami ini masih

sangat kecil sehingga untuk meningkatkannya perlu dilakukan rekayasa pada kondisi hidup bakteri seperti suhu, pH, dan nutrisi bakteri.

Penambahan minyak nabati ke dalam media hidup mikroorganisme disinyalir mampu meningkatkan jumlah riboflavin yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut. Penambahan minyak nabati akan meningkatkan sumber karbon yang menjadi nutrisi bagi bakteri dan dapat merangsang terbentuknya riboflavin (Tajima, dkk. 2009). Minyak kelapa sawit sebagai salah satu minyak nabati yang banyak diproduksi di Indonesia diharapkan mampu meningkatkan jumlah riboflavin yang dihasilkan oleh bakteri *Acetobacter xylinum* sehingga dapat meningkatkan nilai gizi dari *nata de coco*.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan sebelumnya, dapat dibuat beberapa rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana pengaruh penambahan minyak kelapa sawit terhadap produksi riboflavin bakteri *Acetobacter xylinum* pada starter *nata de coco*?
2. Bagaimana pengaruh nilai OD dalam pembuatan inokulum terhadap produksi riboflavin bakteri *Acetobacter xylinum* pada starter *nata de coco*?
3. Bagaimana pengaruh pelarut yang digunakan dalam pembuatan inokulum terhadap produksi riboflavin bakteri *Acetobacter xylinum* pada starter *nata de coco*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Meningkatkan produksi riboflavin bakteri *Acetobacter xylinum* pada starter *nata de coco* dengan penambahan minyak kelapa sawit.
2. Mengetahui rasio penambahan minyak kelapa sawit yang optimum untuk meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco*.
3. Mengetahui nilai OD dan pelarut inokulum yang optimum untuk meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco*.

1.4 Batasan Penelitian

Pembatasan masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah:

1. Kultur mikroba yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Acetobacter xylinum*.
2. Minyak kelapa sawit yang digunakan merupakan minyak kelapa sawit yang dijual di pasaran.
3. Analisis konsentrasi riboflavin dilakukan dengan metode *optical density* menggunakan spektrofotometer.

1.5 Tempat dan Waktu

Tempat : Laboratorium Bioproses Departemen Teknik Kimia
Universitas Indonesia, Depok, dan Laboratorium Biokimia
Mikrobiologi LIPI, Cibinong.

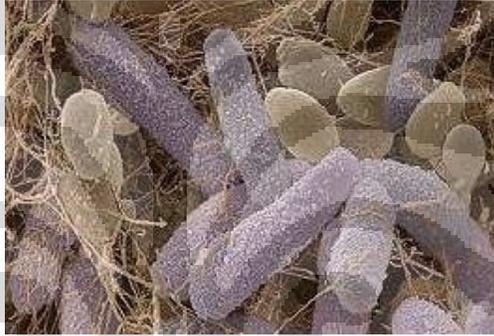
Waktu : Februari – Mei 2011

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Acetobacter xylinum*

Bakteri *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*) adalah bakteri yang termasuk ke dalam genus *Acetobacter*. Bakteri ini bersifat Gram negatif, tidak membentuk endospora, dan bersifat aerob obligat. Selain itu, *A. xylinum* juga dapat mengoksidasi etanol dan menghasilkan asam asetat (Nainggolan, 2009). *A. xylinum* berbentuk batang pendek dengan panjang mencapai 2 mikron dengan permukaan dinding yang berlendir. Bakteri ini dapat membentuk rantai pendek dengan satuan 6-8 sel (Edria, dkk. 2010).



Gambar 2. 1 Bakteri *Acetobacter xylinum*
(Sumber: muhtaufiqmunawar.blogspot.com)

Bakteri *A. xylinum* mampu mengoksidasi glukosa menjadi rantai atau polimer panjang yang disebut dengan polisakarida atau selulosa berupa serat putih yang terbentuk secara bertahap selama proses fermentasi. Serat-serat putih ini biasa disebut dengan nata yang merupakan hasil metabolit sekunder bakteri *A. xylinum*. Pada proses metabolit primer, bakteri ini menghasilkan asam asetat, air, dan energi yang digunakan kembali dalam siklus metabolismenya (Nainggolan, 2009).

Bakteri *Acetobacter* sp. bersifat overoksidizer karena kemampuannya yang dapat mengubah asam asetat dalam medium fermentasi menjadi CO_2 dan H_2O ketika gula di dalam medium fermentasi telah habis dimetabolisir. Banyaknya mikroba yang tumbuh pada suatu media sangat dipengaruhi oleh nutrisi yang terkandung di dalam medium (Nainggolan. 2009). Nutrisi yang dibutuhkan oleh

bakteri *A. xylinum* untuk membentuk nata adalah C, H, N, dan mineral (Edria, dkk. 2010).

Faktor-faktor yang mempengaruhi *Acetobacter xylinum* mengalami pertumbuhan adalah nutrisi, sumber karbon, sumber nitrogen, serta tingkat keasaman media, temperatur, dan udara (oksigen). Senyawa karbon yang dibutuhkan dalam fermentasi nata berasal dari monosakarida dan disakarida. Sumber dari karbon ini yang paling banyak digunakan adalah gula. Sumber nitrogen bisa berasal dari bahan organik seperti ZA atau urea. Meskipun bakteri *Acetobacter xylinum* dapat tumbuh pada pH 3,5 – 7,5 tetapi akan tumbuh optimal bila pH-nya 4. Sedangkan suhu ideal bagi pertumbuhan bakteri *Acetobacter xylinum* pada suhu 28 – 30 °C. Bakteri ini sangat memerlukan oksigen, sehingga dalam fermentasi tidak perlu ditutup rapat namun hanya ditutup dengan menggunakan kertas berpori (koran) untuk mencegah kotoran masuk ke dalam media yang dapat mengakibatkan kontaminasi (Darmansyah, 2010).

Pembiakkan isolat bakteri *Acetobacter xylinum* dapat dilakukan dengan menggunakan media *nutrient agar*. *Nutrient agar* (NA) merupakan media pertumbuhan bakteri yang paling umum digunakan. Media ini dapat digunakan pada bakteri yang tidak memerlukan nutrisi spesifik untuk pertumbuhannya. Media NA tersusun dari *beef extract* 3 g/L, *bacto peptone* 5 g/L, *bacto agar* 15 g/L. Semua bahan dilarutkan dengan aquades dan dipanaskan hingga mendidih dan semua bahan terlarut. Setelah itu, media ini disterilisasi di dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit (Difco™ *Nutrient Agar*).

2.2 *Nata de coco*

Nata de coco merupakan senyawa selulosa (*dietary fiber*) yang dihasilkan dari air kelapa melalui proses fermentasi yang melibatkan jasad renik (mikroba). *Nata de coco* biasa dijadikan sebagai hidangan penutup yang terlihat seperti jeli, berwarna putih hingga bening, dan bertekstur kenyal.



Gambar 2. 2 *Nata de coco*
(Sumber: duniatehnikku.wordpress.com)

Pembuatan *nata de coco* pertama-tama dilakukan dengan pembuatan starter *Acetobacter xylinum* yang dilakukan dengan cara biakan kultur murni pada media air kelapa. Setelah pembuatan starter kemudian dimasukkan ke dalam nampan steril. Kemudian ditambahkan gula pasir 15 g/L dan urea 5 g/L. Kemudian pH media diatur menjadi 4 dengan menambahkan asam asetat. Selanjutnya air kelapa disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu media didinginkan pada suhu kamar. Kemudian dilakukan inokulasi dengan menambahkan starter cair *Acetobacter xylinum* sebanyak 10 % (v/v) pada kondisi yang aseptis.

Wadah fermentasi ditutup dengan plastik dan diletakan di atas rak yang datar pada ruang yang gelap. Proses inkubasi berlangsung selama 7 hari dan selama inkubasi media *nata de coco* tidak boleh terguncang. Selama 7 hari nata dapat dipanen dengan cara mengeluarkan nata yang telah berbentuk wadah fermentasi dan dipotong-potong. Keberhasilan pembuatan serat *nata de coco* ditandai dengan:

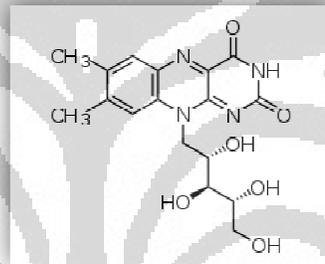
1. Lempeng tebal berwarna putih.
2. Tidak terdapat cairan/loyang pertumbuhan kering.
3. Lempeng nata tidak berjamur, tidak bolong, dan tidak terdapat noda hitam (Darmansyah. 2010).

Prospek industri *nata de coco* di Indonesia masih terbuka lebar mengingat Indonesia merupakan negara penghasil kelapa terbesar di dunia dengan produksi air kelapa sebesar 3,75 juta ton per tahun. Selain itu, peluang ekspor *nata de coco*

ke negara-negara lain seperti Jepang juga masih terbuka lebar (Agustian, dkk. 2003).

2.3 Riboflavin

Riboflavin, dikenal juga sebagai vitamin B₂, adalah mikronutrisi yang mudah dicerna, bersifat larut dalam air, dan memiliki peranan kunci dalam menjaga kesehatan pada manusia dan hewan (Zahara, 2011). Vitamin B₂ diperlukan untuk berbagai ragam proses seluler. Seperti vitamin B lainnya, riboflavin memainkan peranan penting dalam metabolisme energi dan diperlukan dalam metabolisme lemak, zat keton, karbohidrat dan protein (Park dan Ming, 2003). Struktur kimia riboflavin dapat dilihat pada Gambar 2.3 di bawah ini:



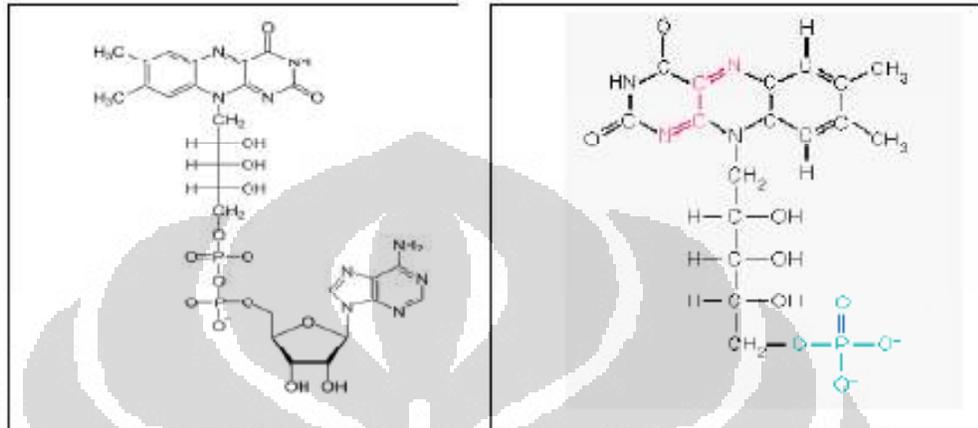
Gambar 2.3 Struktur Riboflavin

(Sumber: Zahara, 2011)

Riboflavin berfungsi sebagai bagian dari berbagai susunan enzim di dalam tubuh. Enzim tersebut adalah flavoprotein dan biasanya disebut pula sebagai enzim kuning, karena warna kuning yang disebabkan oleh gugusan flavin. Satu atau lebih enzim kuning dibutuhkan bersama-sama dengan koenzim I atau koenzim II di dalam katabolisme (pemecahan) glukosa untuk memperoleh energi yang berguna untuk proses-proses tubuh (Zahara, 2011).

Riboflavin juga merupakan bagian dari enzim-enzim oksidase yang berfungsi pada tingkatan terakhir metabolisme protein dan merupakan bagian dari xantin oksidase yang menyangkut metabolisme purin. Riboflavin juga merupakan bagian dari molekul FAD (*Flavin Adenin Dinukleotida*) dan FMN (*Flavin Mononukleotida*), yang keduanya merupakan koenzim (bagian enzim yang sangat membantu kerja enzim), berperan pada reaksi pembentukan asam fumarat dari

asam suksinat dengan enzim suksinat dehidrogenase. Selain itu, riboflavin juga merupakan bagian penting enzim monoamin oksidase dan glukonolaktonoksidase (Zahara, 2011). Gambar struktur kimia FAD dan FMN dapat dilihat pada Gambar 2.4 berikut ini.



Gambar 2. 4 Struktur Kimia FAD dan FMN

(Sumber: Zahara, 2011)

Sumber vitamin B₂ terbanyak ditemukan pada makanan hewani, seperti daging, hati, ginjal, dan jantung, serta susu. Beberapa tanaman juga mengandung vitamin ini dalam kadar yang cukup tinggi, antara lain kacang almond, jamur, gandum, dan kacang kedelai (Le Blanc, dkk. 2006). Makanan yang mengandung riboflavin sebaiknya tidak disimpan dalam wadah transparan karena vitamin ini mudah terurai oleh paparan cahaya (Zahara, 2010). Riboflavin juga dapat dihasilkan dari metabolisme mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi (Tajima, dkk. 2009).

Konsumsi riboflavin sangat bergantung pada berat tubuh, laju metabolisme, dan asupan kalori di dalam tubuh. Berdasarkan RDA, konsumsi perhari bagi pria adalah 1,7 mg dan bagi wanita adalah 1,3 mg, sedangkan bagi wanita hamil perlu tambahan 0,3 mg. Defisiensi vitamin ini akan berpengaruh pada produksi energi tubuh. Hal ini terjadi karena metabolisme pemecahan karbohidrat, lemak, dan protein tidak berjalan dengan efisien. Secara fisik, defisiensi ini dapat terlihat dari warna mata yang cenderung merah, peningkatan sensitifitas terhadap cahaya matahari, peradangan di mulut, dan bibir pecah-pecah. Efek lainnya juga terlihat pada kerusakan jaringan kulit, keriput, dan kuku pecah.

Gejala awal defisiensi adalah sakit tenggorokan dan bibir pecah-pecah. Bila telah parah, penderita akan mengalami anemia, gangguan saraf, pembengkakan lidah. Defisiensi vitamin B₂ ini sering dialami oleh para pecandu alkohol (Wikipedia, 2010).

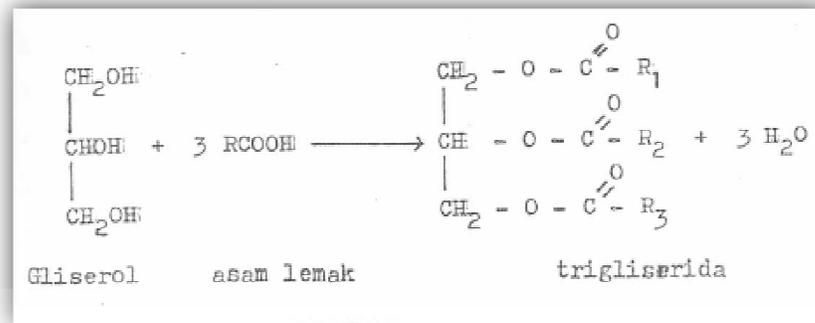
2.4 Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit diperoleh dari pengolahan buah kelapa sawit (*Elaeis guinensis*). Secara garis besar buah kelapa sawit terdiri dari serabut buah (*pericarp*) dan inti (kernel). Serabut buah kelapa sawit terdiri dari tiga lapis yaitu lapisan luar atau kulit buah yang disebut *pericarp*, lapisan sebelah dalam disebut *mesocarp* atau *pulp* dan lapisan paling dalam disebut *endocarp*. Inti kelapa sawit terdiri dari lapisan kulit biji (*testa*), *endosperm* dan embrio. *Mesocarp* mengandung kadar minyak rata-rata sebanyak 56%, inti (kernel) mengandung minyak sebesar 44%, dan *endocarp* tidak mengandung minyak (Pasaribu, Nurhida. 2004).



Gambar 2. 5 Minyak Kelapa Sawit
(Sumber: mauidamulyarahmawati.wordpress.com)

Minyak kelapa sawit merupakan senyawa yang tidak larut dalam air dengan komponen penyusun utama berupa trigliserida dan nontrigliserida. Seperti halnya lemak dan minyak lainnya, minyak kelapa sawit terdiri atas trigliserida yang merupakan ester dari gliserol dengan tiga molekul asam lemak menurut reaksi sebagai berikut:



Gambar 2. 6 Reaksi Pembentukan Trigliserida

(Sumber: Pasaribu, Nurhida. 2004)

Minyak kelapa sawit terdiri dari gliserida campuran yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak rantai panjang. Dua jenis asam lemak yang paling dominan dalam minyak kelapa sawit yaitu asam palmitat, C16:0 (jenuh), dan asam oleat, C18:1 (tidak jenuh) (Zahara, 2011). Makin jenuh molekul asam lemak pada molekul trigliserida, makin tinggi titik beku atau titik cair minyak tersebut. Sehingga pada suhu kamar biasanya berada pada fase padat. Sebaliknya semakin tidak jenuh asam lemak dalam molekul trigliserida maka makin rendah titik cair minyak tersebut sehingga pada suhu kamar berada pada fasa cair (Pasaribu, Nurhida. 2004). Komposisi asam lemak pada minyak kelapa sawit dapat dilihat pada Tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2. 1 Komposisi Asam Lemak dalam Minyak Kelapa Sawit

Nama Asam Lemak	Rumus Asam Lemak	Komposisi
Laurat	C 12:0	0,2 %
Myristat	C 14:0	1,1 %
Palmitat	C 16:0	44,0 %
Stearat	C 18:0	4,5 %
Oleat	C 18:1	39,2 %
Linoleat	C 18:2	10,1 %
Lainnya	-	0,9 %

Sumber: Zahara, 2011

Untuk menentukan kualitas atau mutu minyak, diperlukan standard mutu. Ada beberapa faktor yang menentukan standard mutu, yaitu: konsentrasi air dan kotoran dalam minyak, konsentrasi Asam lemak bebas (ALB), warna, dan bilangan peroksida. Standar mutu *Special Prime Bleach* (SPB) dibandingkan

dengan mutu ordinari dapat dilihat dalam Tabel di bawah ini (Pasaribu, Nurhida. 2004).

Tabel 2. 2 Standar Mutu Minyak Sawit *Special Prime Bleach* (SPB)

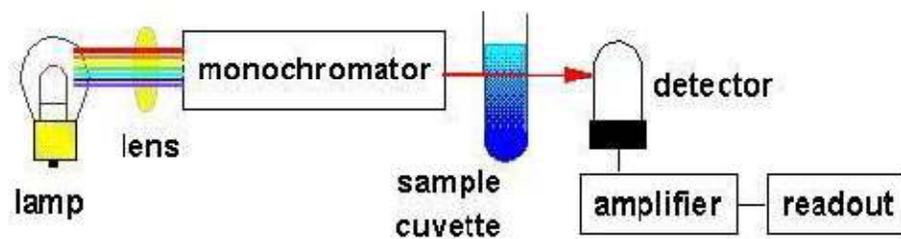
Kandungan	SPB	Ordinary
Asam lemak bebas (%)	1-2	3-5
Kadar air (5)	<0,1	<0,1
Pengotoran (%)	<0,02	<0,01
Besi (ppm)	<10	<10
Tembaga (ppm)	0,5	0,2
Bilangan iodium	53±1,5	45-56
Karotena (ppm)	±500	500-700
Tokoperol (ppm)	±800	400-600
Pemucatan: merah (R)	<2,0	<3,5
kuning (Y)	20	35

Sumber: Pasaribu, Nurhida. 2004

2.5 Analisis Spektrofotometri

Pada penelitian ini, digunakan metode analisis spektrofotometri untuk membuat kurva kalibrasi standar riboflavin, mengetahui jumlah mikroba yang terdapat dalam inokulum, dan menganalisis konsentrasi riboflavin pada sampel. Pada pengukuran konsentrasi riboflavin, data yang akan terbaca adalah nilai absorbansi sampel. Data ini kemudian dikonversi menggunakan kurva kalibrasi standar riboflavin agar diperoleh nilai konsentrasi riboflavin dalam sampel.

Spektrofotometri merupakan suatu metoda analisis yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor *fototube* (Zahara, 2011). Pada spektrofotometri, pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer, yaitu alat untuk mengukur transmitan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Absorpsi radiasi oleh suatu sampel diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh suatu perekam untuk menghasilkan spektrum tertentu yang khas untuk komponen yang berbeda (Zahara, 2011). Skema cara kerja spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 2.7 berikut ini.



Gambar 2. 7 Skema Kerja Alat Spektrofotometer
(Sumber: Zahara, 2011)

Spektrofotometri dibedakan menjadi beberapa jenis berdasarkan sumber cahaya yang digunakan, salah satunya adalah spektrofotometri sinar tampak (*visible*) yang digunakan pada penelitian ini. Cahaya *visible* termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm. Sampel yang dapat dianalisis dengan metode ini hanya sampel yang memiliki warna. Untuk sampel yang tidak memiliki warna harus terlebih dulu dibuat berwarna dengan menggunakan reagen spesifik yang akan menghasilkan senyawa berwarna (Zahara, 2011).



Gambar 2. 8 Spektrofotometer UV-Visible

2.6 *State of the Art*

Penggunaan minyak nabati untuk meningkatkan produksi riboflavin berbagai mikroorganisme sudah banyak dilakukan oleh peneliti. Namun, pada bagian *state of the art* ini akan ditunjukkan bahwa penelitian yang kami

lakukan ini belum pernah dilakukan oleh orang lain. Berikut ini merupakan Tabel *state of the art* yang berhubungan dengan penelitian ini:

Tabel 2. 3 *State of the Art*

Mikroorganisme	Nutrisi				Aplikasi	
	<i>Rapeseed Oil</i>	<i>Molasses</i>	<i>Olive Oil</i> dan <i>Sun Flower Oil</i>	<i>Palm Oil</i>	Starter Yogurt	Starter <i>Nata de Coco</i>
<i>Ashbya gossypii</i>	(Park dan Ming, 2003); (Tajima, dkk. 2009)			(Park, Kato, dan Ming, 2004)		
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>					(Le Blanc, dkk. 2006)	
<i>Eremothecium ashbyii</i>		(Pujari dan Chandra, 2000);	(Vijayalakshmi, dkk. 2010)			
<i>Acetobacter xylinum</i>				(Dewi, 2011)		(Dewi, 2011)

Dari Tabel 2.3 terlihat bahwa sampai saat ini belum ada peneliti yang melakukan penelitian untuk meningkatkan produksi riboflavin dari *Acetobacter xylinum* menggunakan minyak kelapa sawit dan diaplikasikan pada starter *nata de coco*. Berdasarkan data tersebut maka kami tertarik untuk melakukan penelitian ini yang diharapkan dapat meningkatkan konsentrasi nutrisi riboflavin pada *nata de coco*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Park dan Ming, produksi riboflavin jamur *Ashbya gossypii* ditingkatkan dengan memberikan tambahan nutrisi pada media hidup jamur dengan *rapeseed oil* yang terkandung pada *Activated Bleaching Earth (ABE)*. Park dan Ming melihat efek penambahan *rapeseed oil* terhadap produksi riboflavin. Dari hasil yang diperoleh oleh Park dan Ming, terbukti bahwa penambahan minyak nabati ini mampu meningkatkan produksi riboflavin jamur. Hal ini terjadi karena minyak nabati memberikan tambahan sumber karbon sebagai nutrisi penting yang dibutuhkan oleh jamur untuk berkembangbiak. Pada percobaan ini, sampel dengan penambahan 50 g/L *rapeseed oil* memberikan hasil konsentrasi riboflavin yang paling optimum.

Pada penelitian Tajima dkk digunakan mutan *Ashbya gossypii* yang telah diberi tambahan nutrisi *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)*.

Mikroorganismenya ini diharapkan dapat menghasilkan riboflavin yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri aslinya. Pada media hidup bakteri ini kemudian ditambahkan 50 g/L *rapeseed oil* langsung dan 75 g/L ABE yang mengandung 50 g/L *rapeseed oil*. Dari hasil yang diperoleh oleh Tajima dkk, konsentrasi riboflavin pada media dengan penambahan 75 g/L ABE yang mengandung 50 g/L *rapeseed oil* lebih tinggi dibandingkan dengan media dengan penambahan 50 g/L *rapeseed oil* secara langsung.

Park, Kato, dan Ming meneliti produksi riboflavin *Ashbya gossypii* dengan penambahan ABE yang mengandung *palm oil* pada media pertumbuhannya. Pada penelitian ini dilakukan variasi rasio penambahan *palm oil* sebesar 25, 50, 75, dan 100 g/L. Selain itu, cara penambahan *palm oil* ini pun divariasikan, dengan penambahan *palm oil* secara langsung dan dengan *palm oil* yang teradsorpsi di dalam ABE. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ABE yang mengandung 75 g/L *palm oil* menghasilkan konsentrasi riboflavin yang paling optimum. Hal ini disebabkan penambahan *palm oil* secara langsung sulit dicerna oleh mikroorganismenya karena terbentuk gumpalan pada permukaan medium sedangkan penambahan 100 g/L *palm oil* menyebabkan medium sulit untuk dihomogenisasi sehingga *palm oil* tidak dapat dicerna secara maksimal.

Pada penelitian Vijayalakshmi dkk, digunakan glukosa, *olive oil*, dan *sunflower oil* sebagai sumber karbon pada medium pertumbuhan *Eremothecium ashbyii*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi riboflavin optimum dicapai pada medium yang ditambahkan *olive oil*. Hal ini disebabkan *olive oil* memiliki kandungan trigliserida yang tinggi dan dapat mengakumulasi lipid dalam jumlah yang paling besar.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Pujari dan Chandra, produksi riboflavin dari mikroorganismenya *Eremothecium ashbyii* ditingkatkan dengan memberikan empat nutrisi tambahan pada media hidup *Eremothecium ashbyii*, yaitu *molasses*, SSC, KH_2PO_4 , dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. *Molasses* atau air gula digunakan sebagai sumber karbon tambahan bagi *Eremothecium ashbyii*. Dari hasil penelitian ini didapatkan jumlah nutrisi tambahan optimum untuk meningkatkan produksi riboflavin dari *Eremothecium ashbyii*, yaitu: 30,85

(g/L) *molasses*, 39,80 (g/L) SSC; 1,484 (g/L) KH_2PO_4 , dan 0.072 (g/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Berbeda dengan penelitian yang dilakukan pada lima sumber sebelumnya, Le Blanc dkk melakukan penelitian tentang peningkatan riboflavin pada *Propionibacterium freudenreichii* untuk kemudian diaplikasikan pada pembuatan yoghurt. Le Blanc dkk meneliti efek penambahan mutan bakteri *Propionibacterium freudenreichii* untuk meningkatkan konsentrasi riboflavin pada yoghurt. Dari hasil penelitian ini, didapatkan bahwa penggunaan bakteri mutan *Propionibacterium freudenreichii* pada produk hasil fermentasi mampu meningkatkan konsentrasi riboflavin. Penambahan mikroorganisme ini memberikan hasil yang sama jika dibandingkan dengan penambahan suplemen riboflavin sintesis.

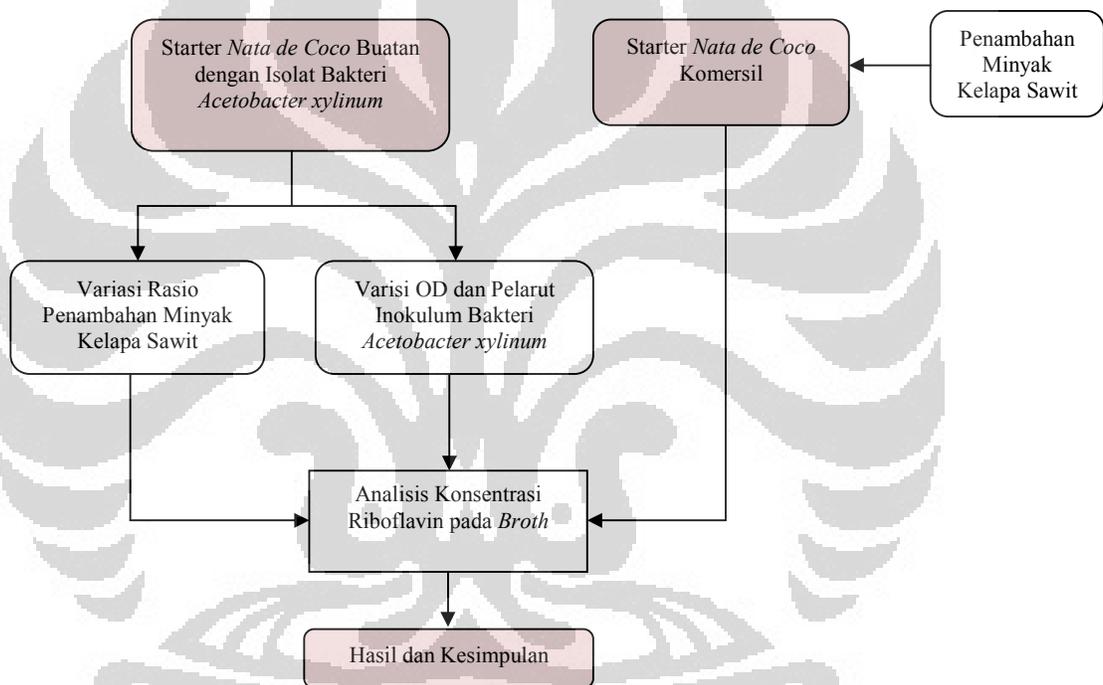
Melihat hasil yang diperoleh dari beberapa penelitian sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa produksi riboflavin dari suatu mikroorganisme dapat ditingkatkan dengan memberikan nutrisi tambahan pada media hidup mikroorganisme. Salah satu nutrisi penting yang dibutuhkan adalah karbon dan hal ini dapat diperoleh dari minyak nabati. Oleh karena itu, penggunaan minyak kelapa sawit dalam penelitian yang akan dilakukan terhadap *Acetobacter xylinum* diharapkan dapat meningkatkan produksi riboflavin dari mikroorganisme ini sehingga nantinya dapat meningkatkan nilai gizi dari starter *nata de coco*.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioproses Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, Depok, dan Laboratorium Biokimia Mikrobiologi LIPI, Cibinong. Diagram alir penelitian peningkatan konsentrasi riboflavin pada *nata de coco* adalah sebagai berikut:



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian Riboflavin

Tahap awal penelitian adalah dengan melakukan studi literatur dari berbagai jurnal baik lokal maupun internasional yang berhubungan dengan riboflavin, bakteri *Acetobacter xylinum*, dan *nata de coco*. Studi literatur ini penting untuk memberikan gambaran terhadap alur penelitian yang akan dilakukan.

Tahap selanjutnya adalah melakukan persiapan dan pengecekan kelengkapan alat dan bahan. Ketersediaan alat dan bahan dalam kondisi yang baik

sangat penting untuk memudahkan penelitian. Selain itu, instrumen elektronik yang akan digunakan seperti pH meter dan spektrofotometer juga harus dalam keadaan baik karena alat-alat ini dapat mempengaruhi akurasi pembacaan data.

Pembuatan starter *nata de coco* dilakukan dengan dua cara yaitu menggunakan starter komersil dan dengan pembiakkan isolat bakteri *Acetobacter xylinum*. Pembuatan starter baru dari starter komersil dilakukan di Laboratorium Bioproses DTK UI. Pada tahap ini hanya dibuat dua variasi yakni kontrol negatif dan satu variasi lagi dengan penambahan minyak 15 g/L.

Eksperimen yang dilakukan selanjutnya adalah pembiakkan isolat bakteri *Acetobacter xylinum*. pembiakkan ini bertujuan untuk memperbanyak isolat bakteri karena bakteri murni ini akan digunakan untuk membuat inokulum pada pembuatan starter *nata de coco*. pembiakan bakteri dilakukan pada media *nutrient agar* (NA) miring di dalam tabung reaksi.

Setelah isolat bakteri tumbuh dengan baik, maka isolat ini dibuat menjadi inokulum dengan melarutkannya pada aquades dan diukur *optical density*-nya dengan instrumen spektrofotometer. Inokulum yang telah siap ini kemudian dimasukkan ke dalam media pembuatan starter *nata de coco* sebanyak 10% volume.

Variasi yang dilakukan dalam pembuatan starter diawali dengan membuat dua variasi starter, yaitu starter tanpa dan dengan penambahan minyak kelapa sawit sebanyak 50 g/L media starter. Starter ini diukur nilai absorbansinya pada hari ke 2, 4, dan 6. Nilai absorbansi ini kemudian dikonversi ke dalam nilai konsentrasi riboflavin dengan satuan mg/L. Starter dengan konsentrasi riboflavin optimum kemudian divariasikan ke tahap selanjutnya.

Variasi starter tahap kedua adalah dengan memvariasikan rasio penambahan minyak kelapa sawit. Pengukuran nilai absorbansi pada starter dilakukan dengan cara yang sama dengan variasi sebelumnya. Kemudian starter dengan konsentrasi riboflavin tertinggi akan divariasikan kembali nilai *optical density* dan pelarut yang digunakan dalam pembuatan inokulumnya.

Pada tahap ini, nilai konsentrasi riboflavin pada sampel diukur dengan cara yang sama dan starter dibuat menjadi *nata de coco* pada hari saat nilai konsentrasi riboflavinnya optimum. *Nata de coco* kemudian dipanen pada hari ke-7 dan di-

press untuk diambil cairannya dan dilakukan pengukuran konsentrasi riboflavin pada cairan tersebut..

Setelah semua tahapan eksperimen dilakukan dan data telah diperoleh, tahap selanjutnya adalah melakukan analisis data. Analisis dilakukan terhadap data konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco* dan konsentrasi pada air perasan *nata de coco*. Konsentrasi riboflavin diketahui dengan memasukkan data absorbansi sampel ke dalam kurva kalibrasi standar riboflavin.

Setelah melakukan analisis terhadap data eksperimen dapat diperoleh kondisi optimum untuk meningkatkan konsentrasi riboflavin pada *nata de coco* dengan penambahan minyak kelapa sawit.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Alat Gelas

- Gelas ukur
- Botol sampel
- Labu ukur
- *Erlenmeyer*
- Kaca arloji
- Kuvet
- Tabung reaksi
- Bunsen

2. Alat Plastik

- Nampan (wadah pembuatan *nata de coco*)
- *Eppendorf tube*
- *Micro pipette* (Merk: SIBATA NICHIRYO)
- *Micro pipette tip*

3. Alat Besi

- Kawat oose
- Gunting

4. Alat Listrik

- Timbangan analitik dengan ketelitian 10^{-4} gram
- *Micro centrifuge* (Merk: Mini Spin Eppendorf)
- *Autoclave* (Merk: HICLAVE Hirayama)
- *Microwave* (Merk: ELECTROFAST)

5. Alat Instrumen

- UV-VISIBLE Spektrofotometer (Merk: SHIMADZU Tipe UV-Pharmaspes 1700)
- pH meter (Merk: TOA DKK Tipe HM-25 G)

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Isolat bakteri *Acetobacter xylinum*
- Air kelapa
- Gula pasir (Merk: GULAKU)
- Urea
- Minyak kelapa sawit (Merk: FILMA)
- NaOH 1N
- KH_2PO_4 0,1 M
- Asam asetat glasial
- Aquades
- Spiritus
- Alkohol 70%
- Kapas
- Kain kasa
- Koran
- Karet gelang

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian merupakan langkah kerja yang dilakukan dalam penelitian. Prosedur penelitian penting dalam membantu melakukan pekerjaan di laboratorium agar tidak terjadi kesalahan dalam melakukan percobaan. Prosedur yang dilakukan dalam penelitian peningkatan konsentrasi riboflavin pada *nata de coco* ini dapat dilihat pada bab ini.

3.3.1 Pra Eksperimen Riboflavin

Sebelum melakukan eksperimen, ada beberapa prosedur yang harus dilakukan, yaitu sterilisasi alat dan pembuatan beberapa larutan yang akan digunakan dalam penelitian ini.

3.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada eksperimen yang menggunakan bakteri dibutuhkan kondisi, peralatan, dan bahan yang steril. Hal ini dimaksudkan agar tidak ada bakteri lain yang tumbuh atau mengkontaminasi sampel yang diinginkan. Prosedur yang dilakukan untuk membuat kondisi dan peralatan menjadi steril adalah:

1. Sterilisasi Alat dan Bahan
 - Masukkan alat dan bahan yang mau disterilisasi ke dalam wadah *pyrex* atau plastik tahan panas (untuk tabung reaksi, sumbat terlebih dahulu dengan kapas hingga kedap udara)
 - Masukkan ke dalam wadah autoclave
 - Isi autoclave dengan air hingga batas saringan
 - Tutup autoclave hingga rapat
 - Autoclave selama 1,5-2 jam
2. Sterilisasi *Laminar flow box*
 - Nyalakan lampu UV selama setengah jam
 - Semprotkan alkohol 70% ke seluruh bagian dalam *laminar flow box*
 - Keringkan dengan kertas *tissue*
 - Nyalakan *blower* selama 5 menit

3.3.1.2 Pembuatan Larutan

Pada pengukuran konsentrasi riboflavin dibutuhkan pelarut yang merupakan campuran dari larutan NaOH 1N dan KH_2PO_4 0,1M. Prosedur pembuatan larutan tersebut, yaitu:

1. Pembuatan Larutan NaOH 1N

- Timbang padatan NaOH sebanyak 2 gram
- Masukkan ke dalam labu ukur 50 mL
- Larutkan dengan aquades hingga mencapai garis batas 50 mL
- Kocok hingga padatan NaOH larut sempurna

2. Pembuatan Larutan KH_2PO_4 0,1M

- Timbang serbuk KH_2PO_4 sebanyak 1,3608 gram
- Masukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- Larutkan dengan aquades hingga mencapai garis batas 100 mL
- Kocok hingga serbuk KH_2PO_4 larut sempurna

3. Pembuatan Pelarut Riboflavin

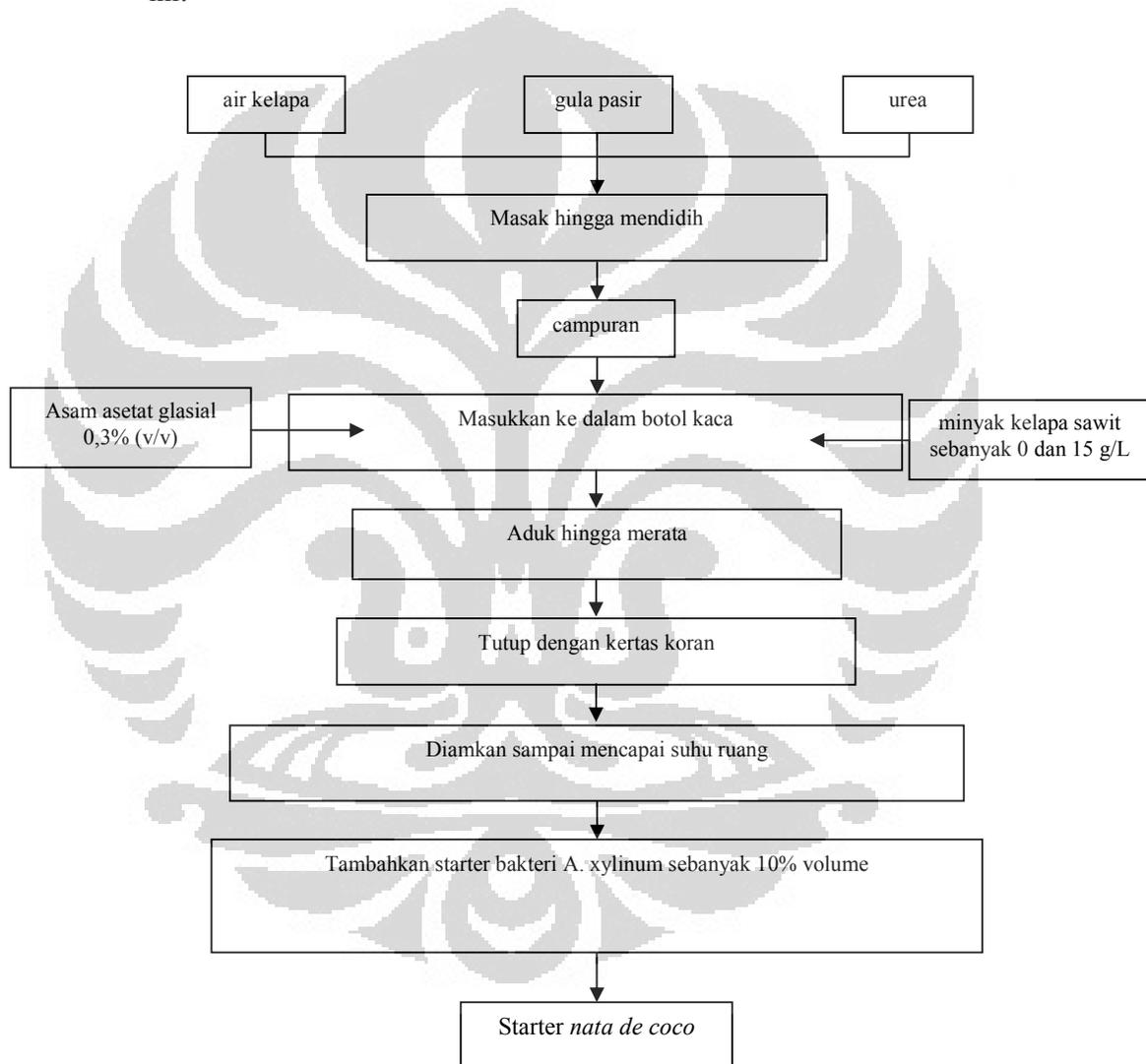
- Ambil 7,4 mL NaOH 1N menggunakan pipet volume
- Masukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- Tambahkan larutan KH_2PO_4 hingga mencapai garis batas 100 mL
- Kocok hingga kedua larutan tercampur sempurna

3.3.2 Eksperimen Riboflavin

Eksperimen riboflavin dilakukan beberapa tahap hingga diperoleh kondisi optimum yang diinginkan. Tahapan eksperimen yang dilakukan adalah:

3.3.2.1 Pembuatan Starter *Nata de Coco* dari Starter Komersil

Diagram alir percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 3.2 di bawah ini:



Gambar 3. 2 Pembuatan Starter Nata de Coco dari Starter Komersil

Prosedur yang dilakukan dalam pembuatan starter nata de coco dari starter komersil adalah:

- Air kelapa sebanyak 100 mL disaring agar benar-benar bersih
- Masak campuran 100 mL air kelapa, 1,5 g gula pasir, dan 0,5 g urea hingga mendidih.
- Tuangkan bahan campuran yang sudah direbus tersebut ke dalam botol kaca steril sebanyak 50 mL tiap botol
- Tambahkan asam asetat glasial sebanyak 0,3% (v/v)
- Tambahkan minyak kelapa sawit dengan rasio 15 g/L (0,94 mL) ke dalam salah satu botol (untuk variasi substrat)
- Diamkan hingga mencapai suhu ruang
- Masukkan starter *nata de coco* 10% (v/v) ke dalam tiap botol
- Tutup dengan kertas koran dan ikat dengan karet
- Diamkan pada suhu ruang

Starter ini kemudian diukur konsentrasi riboflavinnya setiap hari dengan metode *Optical Density* menggunakan spektrofotometer ($\lambda=444\text{nm}$).

3.3.2.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Nutrient agar (NA) merupakan media pertumbuhan isolat bakteri *Acetobacter xylinum*. Prosedur yang dilakukan untuk membuat media ini adalah:

- Timbang *beef extract* sebanyak 0,3 gr
- Timbang *bacto pepton* sebanyak 0,5 gr
- Timbang *bacto agar* sebanyak 2 gr
- Masukkan semua bahan ke dalam 100 mL aquades steril
- Panaskan dengan *microwave* hingga semua bahan terlarut sempurna dan larutan berubah warna menjadi bening
- Masukkan NA cair ke dalam tabung reaksi hingga 1/3 volume tabung
- Tutup dengan sumbat
- Masukkan ke dalam plastik tahan panas

- Lakukan sterilisasi dengan *autoclave*
- Setelah steril, letakkan tabung reaksi dengan posisi miring +/- 15°
- Diamkan hingga beku dan tidak ada uap air di dalamnya

3.3.2.3 Pembiakkan Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

Pembiakkan atau peremajaan isolat bakteri *Acetobacter xylinum* membutuhkan kondisi yang steril dan pengerjaan yang hati-hati. Prosedur yang dilakukan dalam tahap ini adalah:

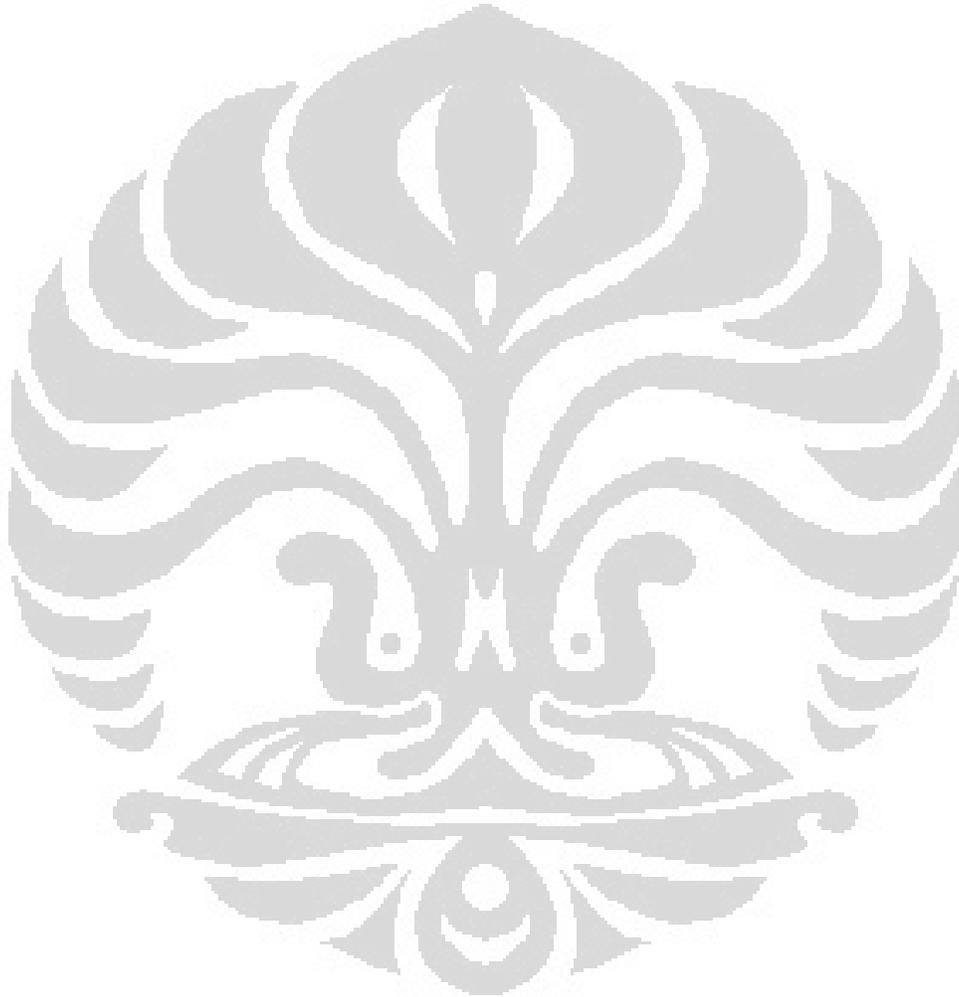
- Sterilisasi laminar box selama ½ jam dengan lampu UV
- Semprotkan 70% alkohol ke seluruh laminar box
- Keringkan dengan tissue
- Basahi tangan dengan alkohol 70%
- Panaskan oose dengan bunsen
- Celupkan ke dalam alkohol 70%
- Panaskan oose dengan bunsen
- Tunggu beberapa saat agar tidak terlalu panas
- Ambil sedikit bakteri dari tabung isolat
- Goreskan ke dalam tabung reaksi berisi media NA
- Tutup dengan sumbat
- Masukkan ke dalam inkubator 37°C selama 2 hari

3.3.2.4 Pembuatan Inokulum

Prosedur yang dilakukan untuk membuat inokulum dari isolat bakteri yang telah dibuat adalah:

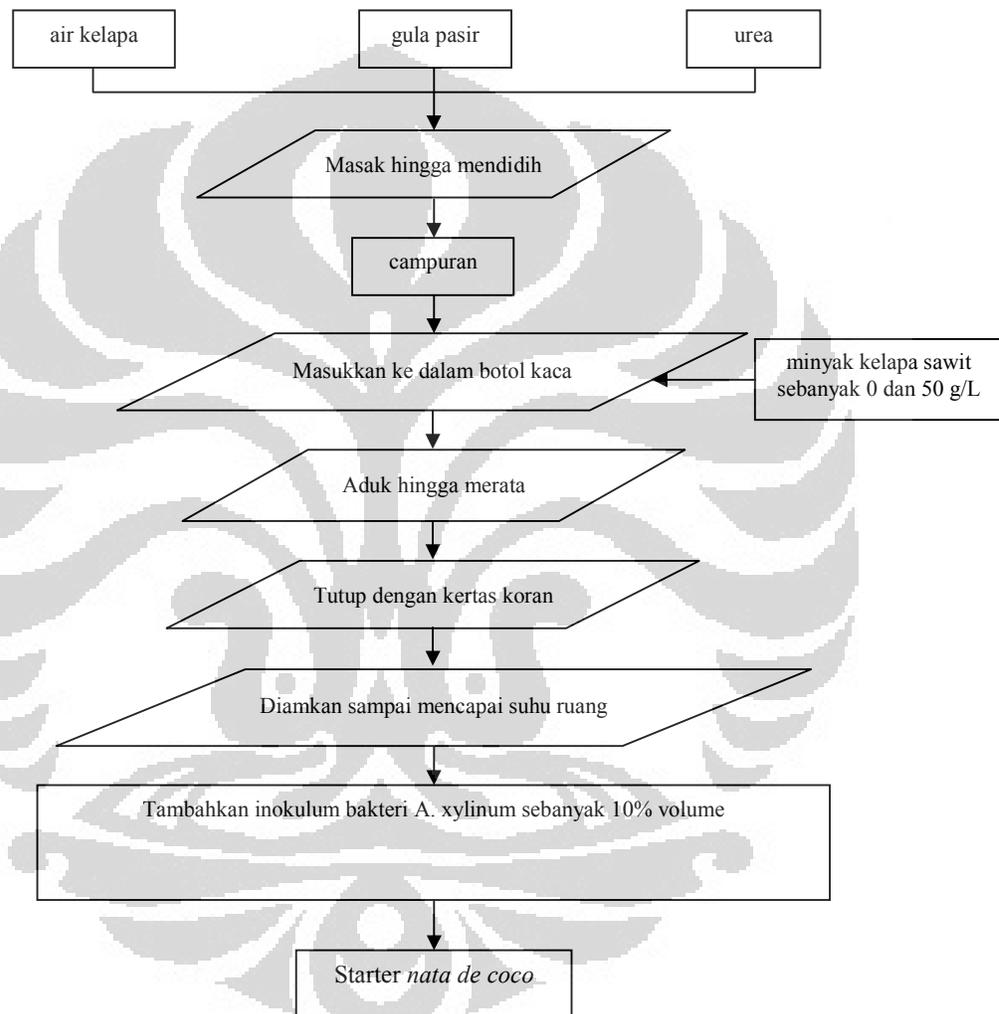
- Tambahkan 2 mL aquades atau air kelapa steril ke dalam tabung reaksi berisi bakteri
- Kerik lapisan bakteri hingga bersih, jangan sampai media NA terikut
- Kocok hingga bakteri terlarut dalam aquades atau air kelapa
- Tuang ke dalam tabung reaksi steril yg kosong
- Vortex hingga homogen
- Ambil 0,5 mL inokulum bakteri
- Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm

- Jika absorbansinya $> 0,5$ maka tambahkan dengan aquades atau air kelapa sedikit demi sedikit
- Ukur kembali absorbansinya
- Lakukan hingga absorbansinya mendekati 0,5
- Catat volume aquades total yang ditambahkan



3.3.2.5 Pembuatan Starter *Nata de Coco* Tahap I

Pada pembuatan starter tahap I, hanya dilakukan dua variasi media, yaitu starter tanpa penambahan minyak sebagai kontrol negatif dan starter dengan penambahan minyak sebanyak 50 g/L. Diagram alir percobaannya dapat dilihat di bawah ini:



Gambar 3.3 Diagram Alir Pembuatan Starter Tahap I

Prosedur yang dilakukan dalam pembuatan starter tahap I adalah:

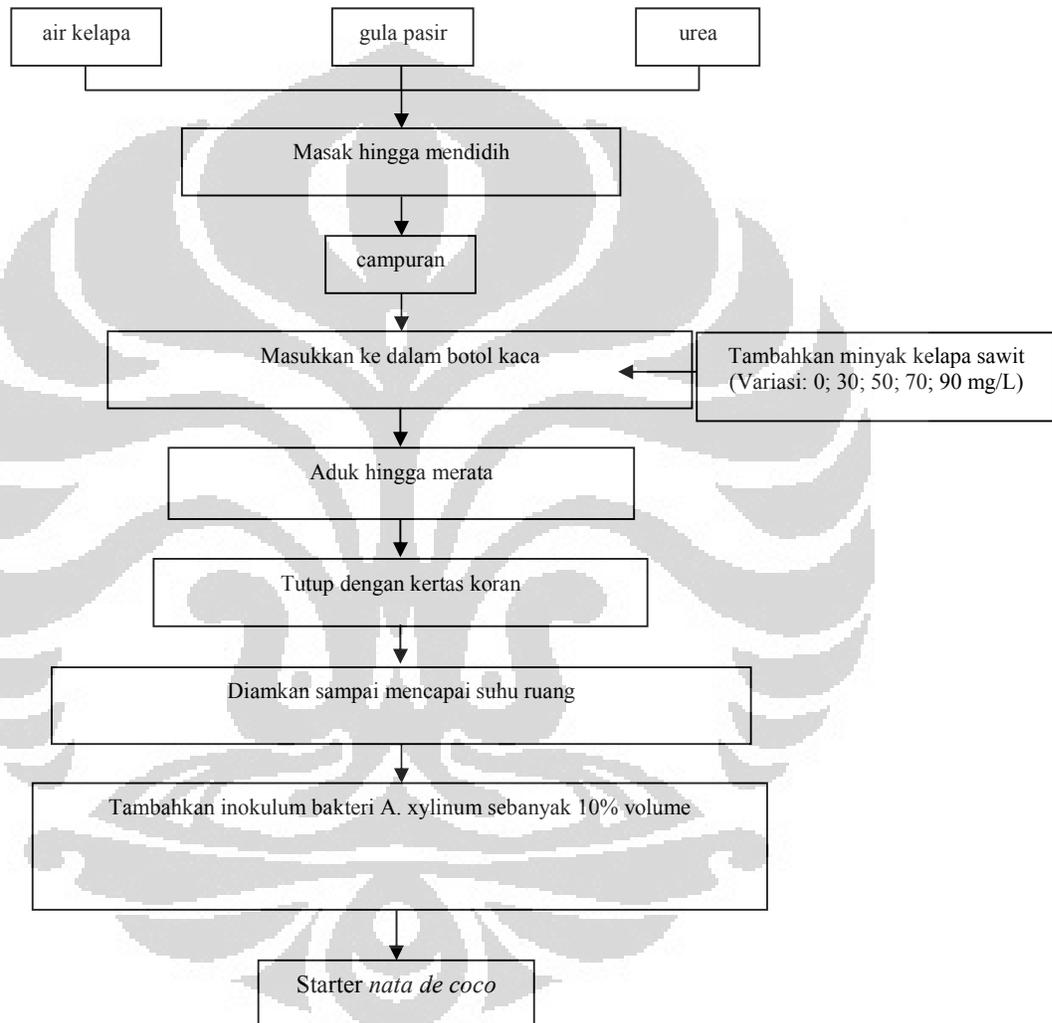
- Saring 250 mL air kelapa yang telah didiamkan selama satu malam
- Ukur tingkat keasamannya menggunakan pH meter

- Jika pH lebih dari 4 maka atur tingkat keasamannya hingga mencapai pH 4 dengan melakukan penambahan asam asetat
- Masak campuran 250 mL air kelapa, 3,75 g gula pasir, dan 1,25 g urea hingga mendidih.
- Masukkan ke dalam botol kaca yang telah disterilisasi @8mL (setiap variasi ada 9 botol, 3 botol untuk sampel tiap harinya)
- Tambahkan minyak kelapa sawit dengan rasio 50 g/L (428 μ L) ke dalam tiap botol, vortex hingga merata (untuk variasi substrat)
- Diamkan hingga mencapai suhu ruang
- Tambahkan 10% (v/v) inokulum dengan OD 0,5 dan pelarut aquades
- Tutup dengan koran dan ikat dengan karet
- Diamkan pada suhu ruang

Medium ini kemudian diukur konsentrasi riboflavinnya pada hari ke 2, 4, dan 6 dengan metode *Optical Density* menggunakan spektrofotometer ($\lambda=444\text{nm}$). Medium yang menghasilkan konsentrasi riboflavin paling optimum kemudian akan divariasikan ke pembuatan starter tahap II.

3.3.2.6 Pembuatan Starter *Nata de Coco* Tahap II

Pada pembuatan starter tahap II ini dilakukan variasi rasio penambahan minyak kelapa sawit. Variasi rasio yang digunakan adalah 30, 50, 70, dan 90 mg/L. Diagram alir percobaan tahap ini adalah:



Gambar 3. 4 Diagram alir pembuatan starter dengan variasi penambahan volume minyak

Prosedur yang dilakukan dalam pembuatan starter tahap II adalah:

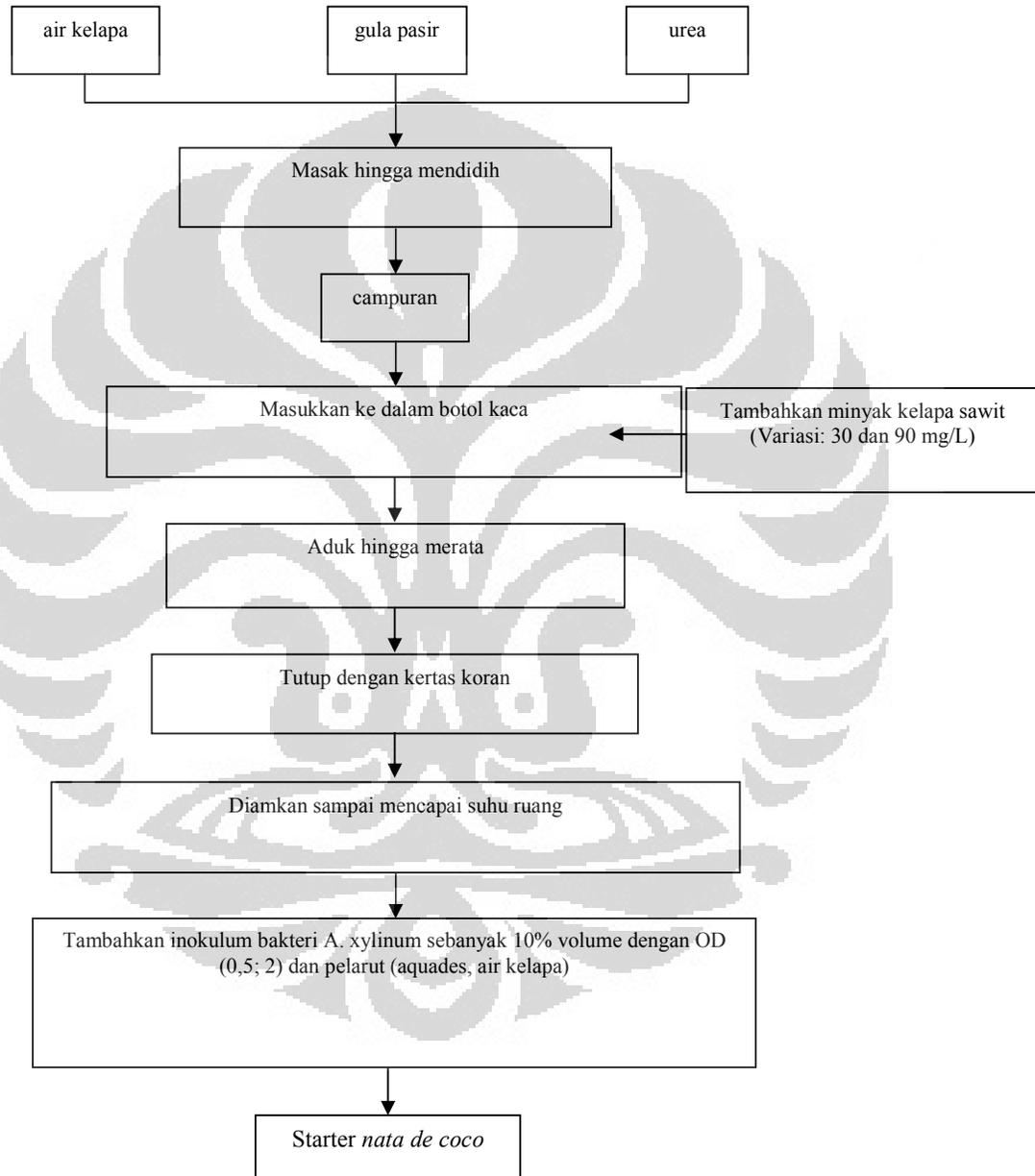
- Saring 500 mL air kelapa yang telah didiamkan selama satu malam
- Ukur tingkat keasamannya menggunakan pH meter

- Jika pH lebih dari 4 maka atur tingkat keasamannya hingga mencapai pH 4 dengan melakukan penambahan asam asetat
- Masak campuran 500 mL air kelapa, 7,5 g gula pasir, dan 1,25 g urea hingga mendidih.
- Masukkan ke dalam botol kaca yang telah disterilisasi @8mL (setiap variasi ada 9 botol, 3 botol untuk sampel tiap harinya)
- Tambahkan minyak kelapa sawit dengan rasio 30 g/L (257 μ L), 50 g/L (428 μ L), 70 g/L (599 μ L), dan 90 g/L (770 μ L) ke dalam tiap botol, vortex hingga merata (untuk variasi substrat)
- Diamkan hingga mencapai suhu ruang
- Tambahkan 10% (v/v) inokulum dengan OD 0,5 dan pelarut aquades
- Tutup dengan koran dan ikat dengan karet
- Diamkan pada suhu ruang

Medium ini kemudian diukur konsentrasi riboflavinnya pada hari ke 2, 4, dan 6 dengan metode *Optical Density* menggunakan spektrofotometer ($\lambda=444\text{nm}$). Medium yang menghasilkan konsentrasi riboflavin paling optimum kemudian akan divariasikan ke pembuatan starter tahap III.

3.3.2.7 Pembuatan Starter *Nata de Coco* Tahap III

Pada pembuatan starter tahap III ini, starter yang memiliki konsentrasi riboflavin optimum dari tahap II divariasikan rasio OD bakteri dan pelarutnya pada inokulum. Diagram alir percobaan tahap ini adalah:



Gambar 3. 5 Diagram alir pembuatan starter dengan variasi OD dan pelarut inokulum

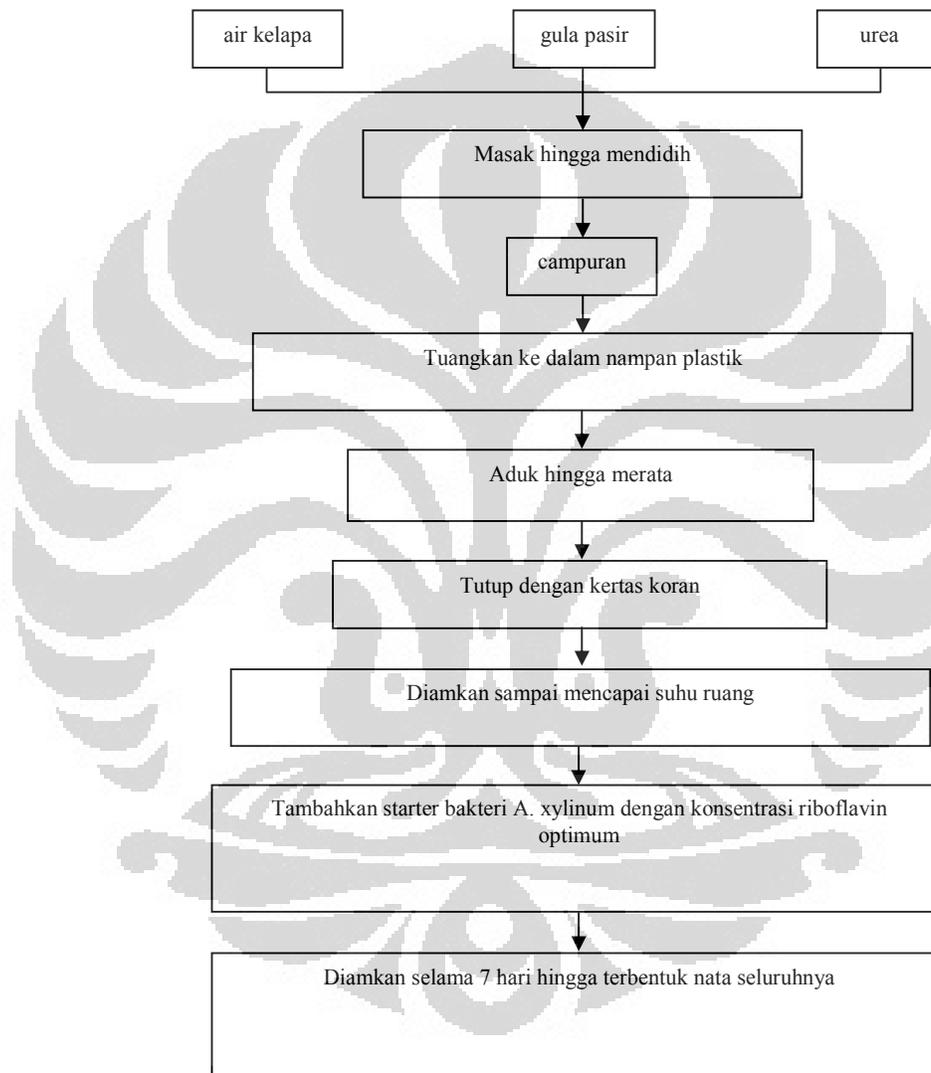
Prosedur yang dilakukan dalam pembuatan starter tahap II adalah:

- Saring 500 mL air kelapa yang telah didiamkan selama satu malam
- Ukur tingkat keasamannya menggunakan pH meter
- Jika pH lebih dari 4 maka atur tingkat keasamannya hingga mencapai pH 4 dengan melakukan penambahan asam asetat
- Masak campuran 500 mL air kelapa, 7,5 g gula pasir, dan 1,25 g urea hingga mendidih.
- Masukkan ke dalam botol kaca yang telah disterilisasi @8mL (setiap variasi ada 9 botol, 3 botol untuk sampel tiap harinya)
- Tambahkan minyak kelapa sawit dengan rasio 30 g/L (257 μ L), 50 dan 90 g/L (770 μ L) ke dalam tiap botol, vortex hingga merata (untuk variasi substrat)
- Diamkan hingga mencapai suhu ruang
- Tambahkan 10% (v/v) inokulum dengan variasi OD 0,5 dan 2 serta variasi pelarut aquades dan air kelapa
- Tutup dengan koran dan ikat dengan karet
- Diamkan pada suhu ruang

Medium ini kemudian diukur konsentrasi riboflavinnya pada hari ke 2, 4, dan 6 dengan metode *Optical Density* menggunakan spektrofotometer ($\lambda=444\text{nm}$). Medium yang menghasilkan konsentrasi riboflavin paling optimum kemudian akan digunakan untuk membuat *nata de coco*.

3.3.2.8 Pembuatan *Nata de Coco*

Pembuatan *nata de coco* dilakukan menggunakan starter bakteri dengan kondisi yang paling optimum sehingga diharapkan *nata de coco* yang dihasilkan memiliki konsentrasi riboflavin yang tinggi. Diagram alir proses pembuatan *nata de coco* adalah:



Gambar 3. 6 Diagram alir pembuatan *nata de coco*

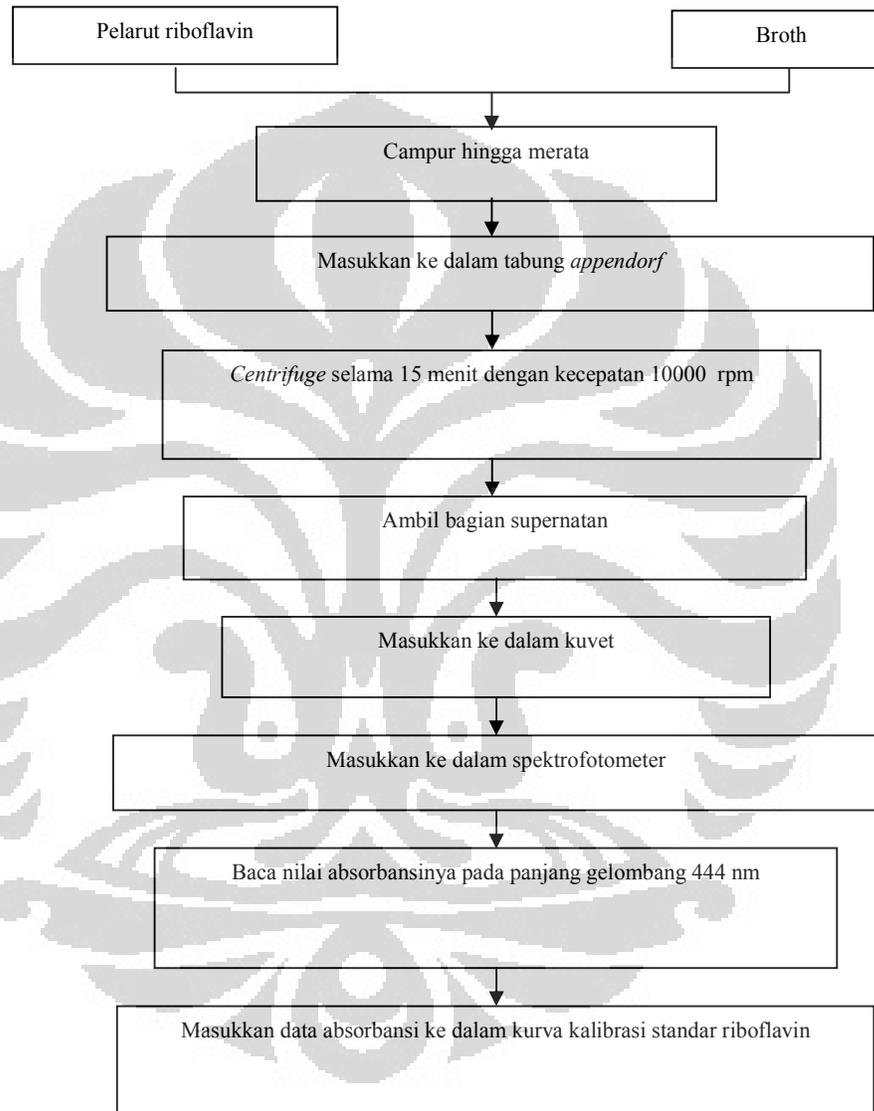
Prosedur pembuatan *nata de coco* ini adalah:

- 2,5 L air kelapa yang telah diinapkan semalam disaring agar benar-benar bersih dari kotoran
- Tambahkan gula pasir 37,5 gram dan urea sebanyak 12,5 gram ke dalam air kelapa
- Campurkan bahan-bahan tersebut ke dalam panci pemasak, lalu direbus hingga mendidih
- Tuangkan ke dalam nampan plastik ukuran 8 cm x 12 cm hingga ketinggian 1 cm.
- Tutup rapat dengan menggunakan kertas koran dan diamkan sampai benar-benar dingin
- Masukkan starter dengan kondisi optimum sebanyak 10% (v/v)
- Diamkan selama tujuh hari hingga terbentuk *nata de coco*

Setelah didiamkan selama tujuh hari dan terbentuk *nata de coco*, *nata de coco* di-press kemudian airnya diambil untuk diukur konsentrasi riboflavinnya. Pengukuran dilakukan dengan metode *Optical Density* menggunakan spektrofotometer ($\lambda=444\text{nm}$).

3.3.2.9 Pengukuran Konsentrasi Riboflavin

Konsentrasi riboflavin pada sampel diukur menggunakan metode *optical density* dengan alat spektrofotometer. Diagram alir proses pengukurannya adalah:



Gambar 3. 7 Diagram alir pengukuran konsentrasi riboflavin

Prosedur yang dilakukan untuk mengetahui konsentrasi riboflavin dalam sampel adalah:

- Campurkan 1,08 mL pelarut riboflavin (campuran NaOH 1N dengan KH_2PO_4 0,1 M) dengan 0,32 mL cairan *broth*.
 - Masukkan campuran *broth* dengan pelarut ke dalam alat *micro centrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 10000 rpm.
 - Masukkan supernatant ke dalam kuvet sampai garis batas pada kuvet.
 - Masukkan kuvet ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 444 nm.
 - Masukkan nilai absorbansi sampel yang terbaca pada spektrofotometer ke dalam kurva kalibrasi standar riboflavin
- Konsentrasi riboflavin dalam sampel dapat diketahui dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam kurva kalibrasi standar riboflavin.

BAB 4

PEMBAHASAN

4.1 Kalibrasi Standar Riboflavin

Kurva kalibrasi standar riboflavin merupakan kurva yang menunjukkan nilai absorbansi sampel larutan riboflavin dengan berbagai konsentrasi pada panjang gelombang tertentu yang digunakan dalam pengukuran sampel. Pada penelitian ini, konsentrasi riboflavin pada sampel akan diukur pada panjang gelombang 444 nm (Park dan Ming, 2003). Oleh karena itu, dalam pembuatan kurva kalibrasi standar riboflavin diukur pada panjang gelombang 444 nm.

Pada pembuatan kurva kalibrasi standar ini, bubuk riboflavin murni dilarutkan dengan campuran larutan NaOH 1N sebanyak 7,4% (v/v) dan larutan KH_2PO_4 0,1M sebanyak 92,6% (v/v) dalam konsentrasi yang bervariasi. Larutan riboflavin dalam berbagai konsentrasi ini kemudian diukur absorbansinya menggunakan UV-VISIBLE spektrofotometer Merk Shimadzu tipe UV-PharmaSpec 1700 pada panjang gelombang 444 nm. Data-data yang diperoleh kemudian dibuat dalam bentuk kurva. Kurva kalibrasi standar riboflavin yang diperoleh dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pengambilan data absorbansi untuk pembuatan kurva kalibrasi standar riboflavin dilakukan sebelum pengambilan data pada *starter nata de coco* karena kurva ini diperlukan untuk mengetahui konsentrasi riboflavin yang terkandung dalam sampel. Absorbansi sampel yang terbaca dari spektrofotometer dikonversi ke dalam nilai konsentrasi riboflavin (mg/L) menggunakan persamaan garis yang didapat dari kurva kalibrasi ini.

4.2 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter *Nata de Coco*

Pada penelitian ini dilakukan penambahan minyak kelapa sawit ke dalam starter *nata de coco* komersil dan starter *nata de coco* dari isolat bakteri *Acetobacter xylinum*. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek penambahan minyak kelapa sawit terhadap konsentrasi riboflavin yang terdapat di dalam tiap jenis starter tersebut.

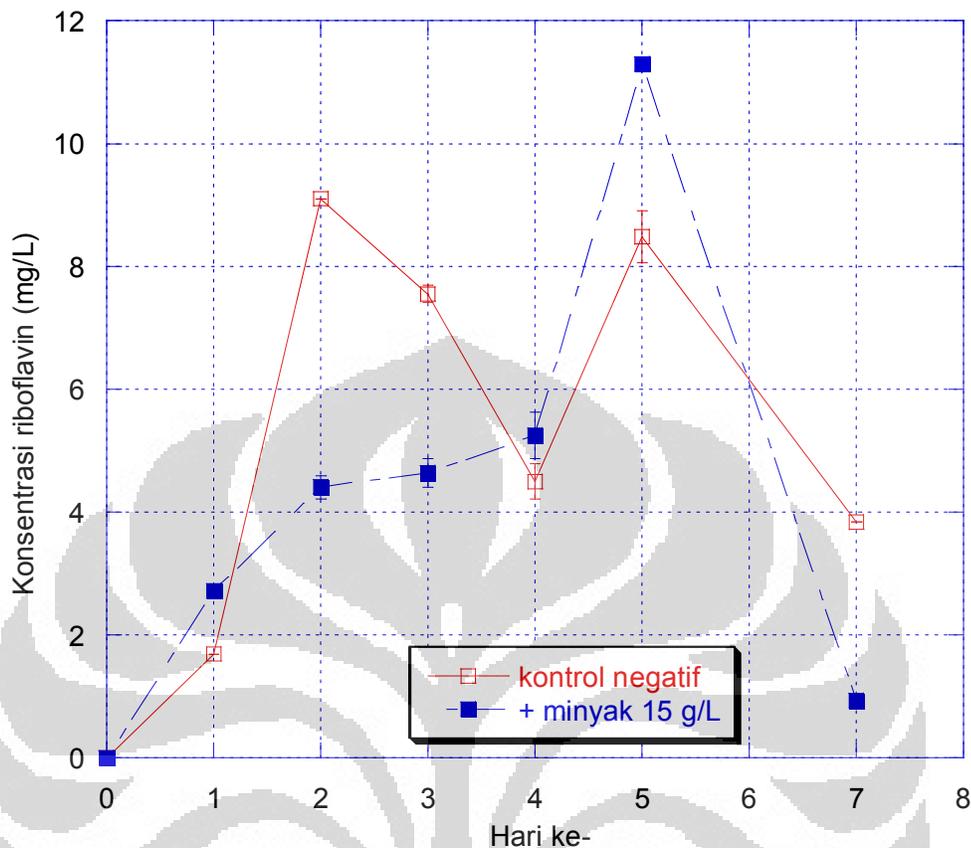
4.2.1 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter *Nata de Coco*

Komersil

Pada percobaan ini dilakukan peremajaan terhadap starter *nata de coco* komersil yang dijual di pasaran. Peremajaan dilakukan dalam dua variasi, yaitu: starter *nata de coco* tanpa penambahan minyak (kontrol negatif) dan starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit sebanyak 15 g/L volume starter. Rasio ini mengikuti rasio gula pasir yang digunakan sebagai sumber karbon dalam pembuatan starter *nata de coco* (Darmansyah, 2010).

Sampel yang akan diukur terlebih dahulu di-*sentrifuge* agar riboflavin yang ada pada sampel terlarut di dalam pelarut riboflavin dan tidak ada gelembung udara saat spektrofotometri dilakukan. Gelembung udara ini terjadi karena bakteri *Acetobacter xylinum* menghasilkan gas CO₂ (Nainggolan, 2009). Jika tidak di-*sentrifuge* terlebih dahulu maka bakteri akan terikut dan terbentuklah gelembung udara pada kuvet. Hal ini tentunya dapat mempengaruhi keakuratan hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada spektrofotometri karena gelembung udara dapat membiaskan cahaya yang dihasilkan oleh lampu pada spektrofotometer.

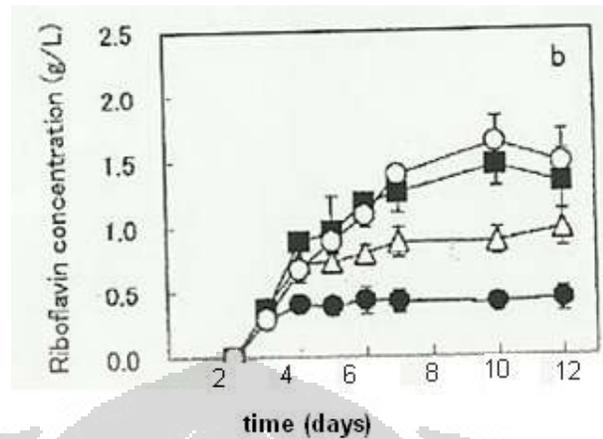
Hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1 Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de Coco* Komersil

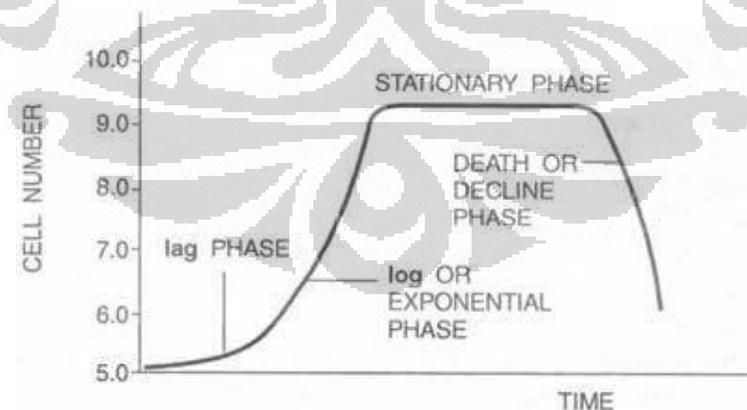
Kurva di atas menunjukkan konsentrasi riboflavin yang terdapat pada starter *nata de coco* hasil peremajaan dari starter komersil. Pada kurva berwarna merah yang menunjukkan kontrol negatif, pergerakan konsentrasi riboflavin pada starter terlihat tidak teratur. Pada starter kontrol negatif, konsentrasi riboflavin mengalami kenaikan dari hari ke-0 sampai hari ke-2 kemudian mengalami penurunan hingga hari ke-4. Namun, pada hari ke-5, konsentrasi riboflavin pada starter ini kembali mengalami kenaikan. Konsentrasi riboflavin optimum pada sampel dicapai pada hari ke-2 dengan konsentrasi 9,09 mg/L media starter.

Hal ini sangat berbeda dengan *trend* kurva konsentrasi riboflavin yang tertera pada jurnal Park, Kaito, dan Ming berikut ini:



Gambar 4.2 Konsentrasi Riboflavin pada Kultur *Ashbiya gosypii*
(Sumber: Park, Kaito, dan Ming, 2004)

Gambar 4.2 menunjukkan konsentrasi riboflavin yang terdapat pada kultur *Ashbiya gosypii*. Pada kurva ini jelas terlihat bahwa konsentrasi riboflavin memiliki *trend* meningkat dari hari ke-2 sampai ke-7 kemudian mengalami fase statis dan mengalami penurunan pada hari ke-10. Jika diperhatikan, Gambar 4.2 menunjukkan *trend* yang sama dengan kurva fase pertumbuhan mikroorganisme (Gambar 4.3). Pada fase pertumbuhan mikroorganisme, jumlah sel akan meningkat secara signifikan pada fase log dan mengalami fase stasioner setelah mencapai jumlah sel optimum dan kemudian mengalami penurunan jumlah sel pada fase kematian (*death phase*).



Gambar 4.3 Fase Pertumbuhan Mikroorganisme
(Sumber: Zahara, 2011)

Dari Gambar 4.2 dan Gambar 4.3 dapat disimpulkan bahwa konsentrasi riboflavin yang dihasilkan berhubungan dengan jumlah sel mikroorganisme pada media kultur. Hal ini telah dinyatakan oleh Tajima, bahwa mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi dapat memproduksi riboflavin dari hasil metabolismenya. Artinya, semakin banyak jumlah mikroorganisme di dalam media maka semakin tinggi nilai riboflavin yang dapat dihasilkan.

Pada Gambar 4.1, dengan penambahan minyak kelapa sawit 15 g/L, terlihat bahwa terjadi peningkatan konsentrasi riboflavin dari hari ke-0 sampai hari ke-5. Penurunan konsentrasi riboflavin terjadi setelah hari ke-5 dan nilainya terus turun hingga hari terakhir pengukuran yakni pada hari ke-7. Nilai konsentrasi riboflavin tertinggi dicapai pada hari ke-5 dengan nilai 11,3 mg/L. *Trend* kurva ini hampir sama dengan *trend* kurva konsentrasi riboflavin pada Gambar 4.2.

Dari Gambar 4.1 juga dapat diketahui nilai konsentrasi riboflavin optimum dicapai pada hari kedua starter. Jika hasil ini dibandingkan, penambahan minyak kelapa sawit ke dalam starter komersil dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin dari 9,09 menjadi 11,3 mg/L. Peningkatan yang diperoleh mencapai angka 24,31%. Artinya, penambahan minyak kelapa sawit memberikan efek yang positif terhadap konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco* komersil.

Peningkatan konsentrasi riboflavin pada starter disebabkan adanya penambahan minyak kelapa sawit akan menambah sumber karbon (C) pada media pertumbuhan mikroorganisme (Tajima, dkk. 2009). Karbon merupakan salah satu nutrisi tambahan bagi bakteri (Edria, dkk. 2010). Semakin banyak nutrisi yang ada pada media pertumbuhan maka pertumbuhan sel mikroorganisme akan semakin baik. Pertambahan jumlah sel mikroorganisme inilah yang dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter karena, seperti telah dijelaskan sebelumnya, riboflavin dihasilkan dari proses metabolisme mikroorganisme.

4.2.2 Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter *Nata de Coco* dari Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

Pada penambahan minyak kelapa sawit ke dalam starter *nata de coco* dari isolat bakteri *Acetobacter xylinum*, dilakukan dua tahap percobaan, yaitu:

peremajaan isolat bakteri *Acetobacter xylinum* dan pembuatan starter *nata de coco* dari isolat bakteri.

4.2.2.1 Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

Peremajaan isolat bakteri *Acetobacter xylinum* dilakukan untuk memenuhi kebutuhan bakteri dalam pembuatan starter *nata de coco*. Indukan bakteri ini diremajakan di dalam media *nutrient agar* (NA) miring seperti pada Gambar 4.4. Tujuan NA dimiringkan adalah untuk memperluas permukaan bidang medium dan agar ada sedikit udara yang terperangkap di dalam tabung reaksi. Semakin luas permukaan bidang medium maka semakin banyak bakteri yang dapat tumbuh. Pada proses pembiakan ini, udara dibutuhkan karena bakteri *A. xylinum* merupakan bakteri aerob.



Gambar 4. 4 Media *nutrient agar* (NA) miring

Penanaman bakteri dilakukan dengan cara mengambil secuplik indukan bakteri menggunakan kawat ose dan menggoreskannya secara perlahan ke media NA miring yang telah disiapkan. Penggoresan dilakukan secara zig-zag agar bentuknya teratur dan memperluas bidang pertumbuhan bakteri karena pada bagian yang digores inilah bakteri akan tumbuh. Setelah dilakukan penanaman induk bakteri, tabung reaksi dimasukkan ke dalam inkubator dengan tujuan agar bakteri tidak terkontaminasi. Bakteri ini akan tumbuh baik setelah diinkubasi selama 48 jam. Hasil pembiakan isolat bakteri *Acetobacter xylinum* yang dilakukan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4. 5 Hasil Pemiakkan Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

Isolat bakteri *Acetobacter xylinum* dapat dikatakan tumbuh dengan baik jika seluruh permukaan NA telah ditumbuhi oleh bakteri yang ditandai dengan munculnya warna putih disekitar goresan. Selain itu, isolat juga tidak boleh terkontaminasi oleh jamur atau bakteri lain. Isolat yang tumbuh dengan baik ini kemudian digunakan untuk membuat inokulum bakteri pada pembuatan starter *nata de coco*.

4.2.2.2 Starter *Nata de Coco* dari Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

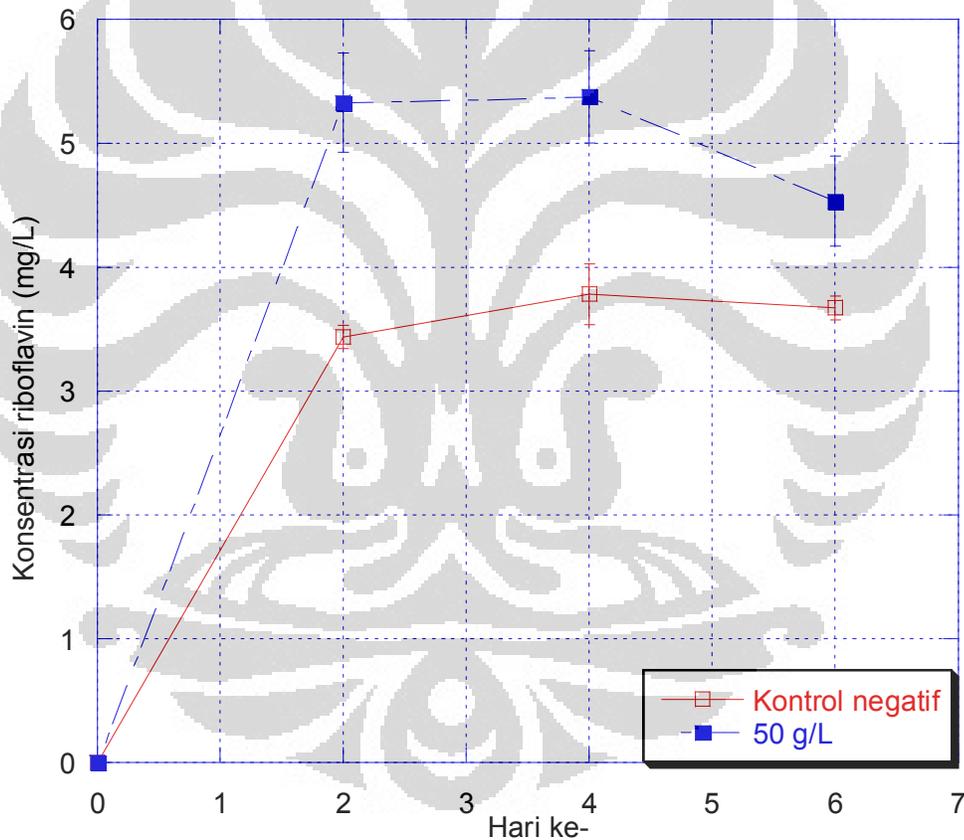
Percobaan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pembuatan starter *nata de coco* dengan dan tanpa penambahan minyak kelapa sawit. Untuk tahap awal ini, rasio penambahan minyak yang digunakan adalah 50 g/L. Nilai ini didasari pada rasio *rapeseed oil* yang ditambahkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Park dan Ming (Park dan Ming, 2003).

Pada tahap ini, isolat bakteri *Acetobacter xylinum* diinkubasi selama dua hari di dalam inkubator dengan temperatur 37 °C. Isolat ini kemudian dibuat menjadi inokulum dengan pelarut aquades steril. Kemudian kerapatan bakteri pada inokulum diukur dengan metode *optical density* menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga absorbansinya menunjukkan nilai 0,5. Inokulum ini kemudian dimasukkan ke dalam media starter *nata de coco* sebanyak 10% (v/v) (Darmansyah, 2010).

Starter *nata de coco* ini kemudian diukur absorbansinya pada hari ke 2, 4, dan 6. Pada hari tersebut 3 botol diukur absorbansinya untuk tiap variasi dan pengukuran dilakukan dua kali atau disebut dengan metode duplo. Jadi, setiap harinya ada 6 sampel untuk satu variasi. Pengambilan data sebanyak ini dimaksudkan untuk mendapatkan data yang lebih akurat karena pada percobaan yang menggunakan makhluk hidup, seperti bakteri,

seringkali terjadi perbedaan hasil karena pada dasarnya makhluk hidup tidak dapat dikontrol sepenuhnya walaupun kondisinya sudah dibuat se-ideal mungkin.

Prosedur pengukuran konsentrasi riboflavin pada sampel ini sama dengan pengukuran riboflavin yang dilakukan pada percobaan dengan starter *nata de coco* komersil. Nilai absorbansi sampel yang diperoleh dari analisis spektrofotometri ini kemudian diolah untuk dicari rata-rata dan standard kesalahannya menggunakan software KaleidaGraph™ versi 3,5. Dari nilai rata-rata dan standard kesalahan inilah dapat dibuat kurva seperti Gambar 4.6 di bawah ini.



Gambar 4. 6 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de coco* dengan dan Tanpa Penambahan Minyak Kelapa Sawit

Kurva pada Gambar 4.7 di atas menunjukkan hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco* tanpa dan dengan

penambahan minyak sebanyak 50 g/L. Pada starter kontrol negatif, konsentrasi riboflavin optimum dicapai pada hari ke-4 dengan nilai 3,78 mg/L sedangkan, pada starter dengan penambahan minyak kelapa sawit, konsentrasi riboflavin optimum dapat mencapai nilai 5,375 mg/L. Dari kedua kondisi optimum ini dapat dilihat adanya peningkatan konsentrasi riboflavin pada starter sebesar 42,2%.

Peningkatan jumlah riboflavin yang dihasilkan oleh bakteri *Acetobacter xylinum* disebabkan adanya kandungan trigliserida pada minyak kelapa sawit. Semakin tinggi kandungan trigliserida pada substrat maka produksi riboflavin akan semakin tinggi (Vijayalakshmi, dkk. 2010). Penambahan jumlah trigliserida merupakan sumber nutrisi karbon bagi mikroorganisme, seperti telah dijelaskan sebelumnya, karbon ini dibutuhkan sebagai salah satu sumber nutrisi penting pada pertumbuhan bakteri *Acetobacter xylinum* (Edria, dkk. 2010).

Hasil riboflavin yang dihasilkan pada penelitian Park dan Ming jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil optimum pada penelitian ini. Hal ini disebabkan perbedaan mikroorganisme yang digunakan. *Ashbya gossypii* merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan untuk menghasilkan riboflavin karena kemampuannya dalam memproduksi riboflavin dalam jumlah besar. Namun demikian, pada penelitian Park dan Ming, kenaikan konsentrasi riboflavin dengan penambahan minyak nabati tidak dapat diketahui karena pada penelitian tersebut tidak dilakukan pengukuran terhadap kontrol negatif.

4.3 Variasi Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter *Nata de Coco* dari Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum*

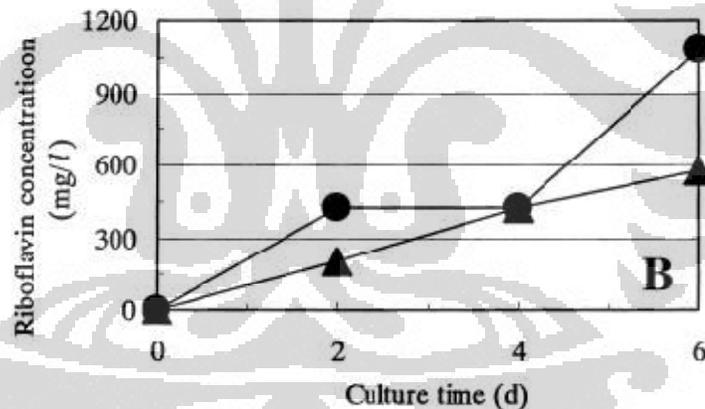
4.3.1 Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit pada Starter *Nata de Coco*

Prosedur percobaan pada tahap ini sama dengan prosedur pada pembuatan starter *nata de coco* tahap pertama. Rasio penambahan minyak kelapa sawit divariasikan menjadi 30 g/L (257 µL/botol), 50 g/L (428 µL/botol), 70 g/L (599 µL/botol), dan 90 g/L (770 µL/botol). Metode dan

tahapan pengukuran sampel juga sama dengan metode yang dilakukan pada tahap pertama.

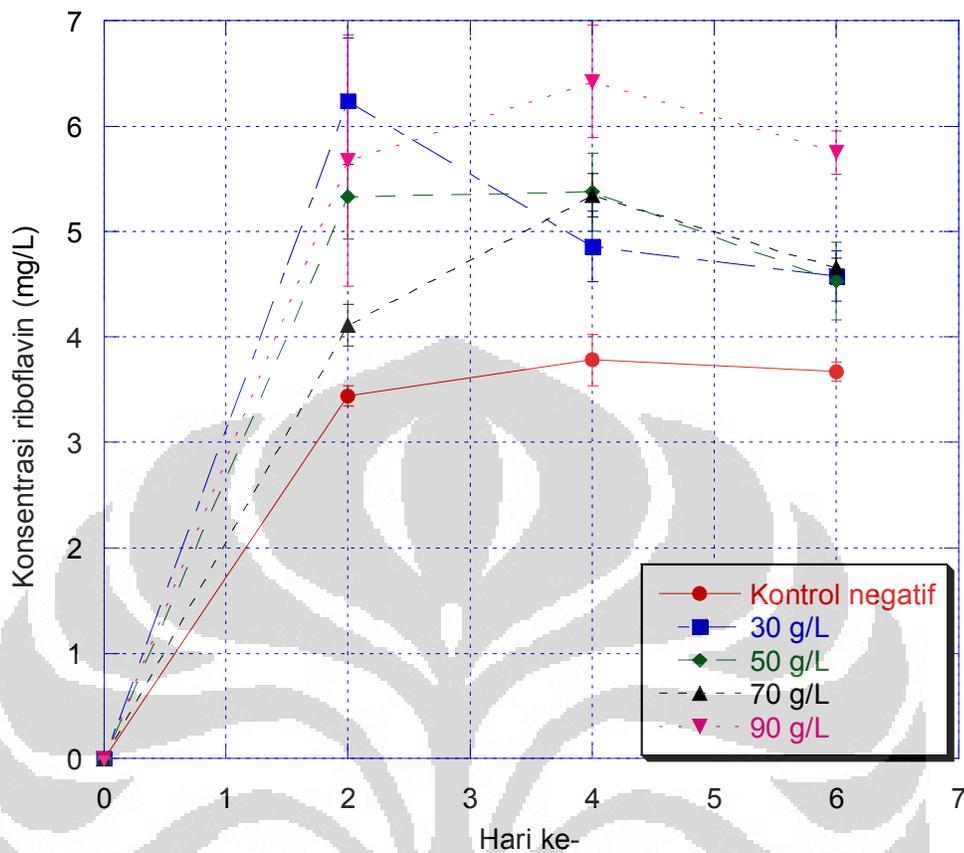
Pemilihan variasi rasio ini didasari pada penelitian yang telah dilakukan oleh Park dan Ming. Pada penelitian yang dilakukan Park dan Ming, dilakukan penambahan *rapeseed oil* sebesar 50 dan 150 g/L ke dalam medium *modified seed medium*. Hasil yang diperoleh oleh Park dan Ming, penambahan minyak nabati sebanyak 50 g/L memberikan nilai konsentrasi riboflavin yang lebih tinggi (Gambar 4.7). Hal ini disebabkan penambahan minyak yang terlalu banyak akan sulit untuk dicerna oleh mikroorganisme itu sendiri. Oleh karena itu, pada percobaan ini, variasi jumlah rasio minyak kelapa sawit yang ditambahkan berada pada rentang variasi di bawah 150 g/L.

Pengukuran sampel pada percobaan ini dilakukan pada hari ke 2, 4, dan 6 merujuk pada waktu pengambilan sampel dalam jurnal Park dan Ming yang dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4. 7 Kurva Pengukuran Konsentrasi Riboflavin pada Kultur *Ashbiya gossypii* (Park dan Ming, 2003)

Hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco* dengan variasi rasio penambahan minyak kelapa sawit dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Gambar 4. 8 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de Coco* dengan Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit

Kurva pada Gambar 4.8 di atas menunjukkan konsentrasi riboflavin yang terkandung di dalam starter *nata de coco* dengan berbagai variasi rasio penambahan minyak kelapa sawit pada pengambilan sampel di hari ke 2, 4, dan 6. Pada hari ke-0, konsentrasi riboflavin pada sampel dianggap masih nol karena ketika inokulum dimasukkan belum terjadi aktivitas sekresi eksternal bakteri yang memproduksi riboflavin.

Dari kurva pada Gambar 4.8 terlihat bahwa starter *nata de coco* yang memiliki konsentrasi riboflavin tertinggi adalah starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 30 dan 90 g/L. Kondisi optimum pada starter dengan rasio penambahan minyak 30 g/L terjadi pada hari kedua inkubasi sedangkan pada rasio 90 g/L terjadi pada hari keempat. Peningkatan

konsentrasi riboflavin pada tiap variasi penambahan minyak dapat dilihat pada Tabel di bawah ini.

Tabel 4. 1 Peningkatan Konsentrasi Riboflavin pada Berbagai Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit

Variasi	Konsentrasi Riboflavin Optimum	Peningkatan Konsentrasi Riboflavin (% terhadap kontrol negatif)	Efektivitas per gram Penambahan Minyak (%/g)
Kontrol negatif	3,78	0	0
30 g/L	6,23	64,8	2,16
50 g/L	5,38	42,32	0,846
70 g/L	5,34	41,27	0,59
90 g/L	6,42	69,84	0,776

Dari Tabel 4.1 dapat dilihat bahwa penambahan 30 g/L minyak kelapa sawit memberikan efektivitas penambahan minyak tertinggi sebesar 2,16 %/g, artinya, setiap penambahan 1 gram minyak ke dalam 1 liter media starter akan memberikan kenaikan konsentrasi riboflavin sebesar 2,16%. Namun, jika melihat *trend* kurva dari kelima variasi ini, konsentrasri riboflavin tertinggi dicapai pada hari ke-4, kecuali pada variasi rasio 30 g/L dimana nilai tertinggi justru dicapai pada hari ke-2. Hal ini menunjukkan adanya kejanggalan pada starter dengan rasio 30 g/L. Selain itu, nilai *error bar* starter ini pada hari ke-2 juga cukup besar (0,18) jika dibandingkan dengan kontrol negatif (0,03) dan starter dengan rasio 50 g/L (0,12) dan 70 g/L (0,06). Namun demikian, nilai *error bar* yang besar juga terlihat pada sampel dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit tertinggi. Pada variasi ini, nilai error bar mencapai angka 0,35 pada hari ke-2 dan 0,16 pada hari ke-4.

Pada percobaan kali ini, nilai error bar tertinggi dimiliki oleh starter yang menunjukkan nilai konsentras riboflavin optimum. Hasil ini menyebabkan belum dapat ditentukannya rasio penambahan minyak kelapa sawit mana yang memberikan hasil paling optimum. Oleh karena itu, untuk tahap selanjutnya, dilakukan lagi variasi pembuatan starter *nata de coco* dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 30 dan 90 g/L.

4.3.2 Variasi Inokulum pada Starter *Nata de Coco* dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 30 g/L

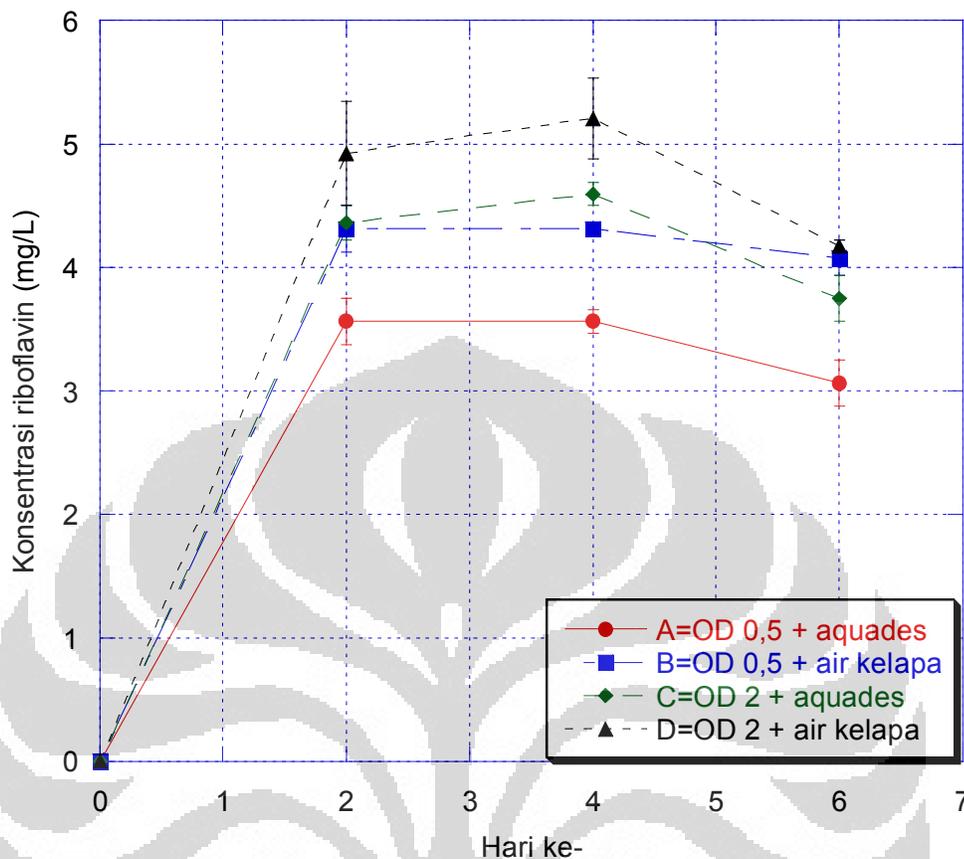
Pada percobaan pembuatan starter *nata de coco* dengan berbagai variasi rasio penambahan minyak kelapa sawit, starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit sebanyak 30 g/L memberikan hasil konsentrasi riboflavin yang optimum pada hari kedua. Pada tahap selanjutnya, dilakukan variasi nilai OD dan pelarut yang digunakan pada inokulum. Nilai OD divariasikan mejadi OD 0,5 dan OD 2 sedangkan pelarut yang digunakan pada pembuatan inokulum divariasikan menggunakan aquades steril dan air kelapa steril.

Nilai OD dinaikkan menjadi dua karena dengan nilai OD yang semakin tinggi maka jumlah bakteri di dalam inokulum juga semakin banyak dan diharapkan semakin banyak pula riboflavin yang dapat diproduksi. Penggunaan air kelapa sebagai pelarut didasari pada pemikiran bahwa penambahan aquades dapat mempengaruhi tingkat keasam media pertumbuhan starter sehingga media yang pada awalnya sudah diatur berada pada pH 4 dapat berubah dan tidak berada pada kondisi optimum pertumbuhan bakteri.

Prosedur percobaan yang dilakukan pada dasarnya sama dengan tahapan pembuatan starter sebelumnya, yang membedakan hanyalah pelarut yang digunakan dan nilai OD dalam pembuaan inokulum. Variasi starter *nata de coco* yang dibuat adalah OD 0,5 dengan pelarut aquades steril, OD 0,5 dengan pelarut air kelapa steril, OD 2 dengan pelarut aquades steril, dan OD 2 dengan pelarut air kelapa steril.

Pengukuran konsentrasi riboflavin pada sampel ini dilakukan pada hari ke-2, 4, dan 6 dengan metode yang sama. Namun, pada percobaan ini, pengambilan sampel hanya dilakukan dua kali untuk tiap variasi. Pengambilan dua data ini dirasa sudah cukup mewakili karena pada tahap-tahap sebelumnya, secara umum, nilai *error bar* dari enam data tidak terlalu besar.

Hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4. 9 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de coco* dengan Variasi Inokulum dan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 30 g/L

Pada kurva di atas, dapat dilihat bahwa nilai konsentrasi riboflavin tertinggi (secara berurutan) terjadi pada variasi D, C, B, dan A. Nilai ini diperoleh pada hari ke-empat inkubasi starter. Dari hasil ini dapat dilihat bahwa penggunaan air kelapa sebagai pelarut dalam inokulum memberikan dampak positif terhadap peningkatan konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco*. Hal ini disebabkan penggunaan air kelapa tidak akan menurunkan tingkat keasaman media pertumbuhan starter sehingga bakteri dapat tumbuh pada kondisi optimum seperti yang telah dikondisikan sebelumnya.

Dari Gambar 4.9 juga dapat dilihat bahwa peningkatan nilai OD pada inokulum dapat meningkatkan produksi riboflavin pada starter *nata de coco*. Semakin tinggi nilai OD maka semakin banyak pula jumlah bakteri yang ada di

dalamnya. Namun demikian, peningkatan nilai OD untuk menaikkan konsentrasi riboflavin yang dihasilkan harus ditinjau juga efektifitasnya.

Penilaian efektifitas penaikkan nilai OD ini dapat dilihat dari peningkatan konsentrasi riboflavin pada pelarut yang sama. Pada starter dengan aquades sebagai pelarut inokulum, kenaikan OD dari 0,5 ke 2 dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin sebesar 28,9%, sedangkan pada starter dengan air kelapa sebagai pelarut inokulum, kenaikan yang terjadi sebesar 20,6%. Dari kedua nilai ini dapat dilihat bahwa efektifitas penaikkan nilai OD inokulum cukup rendah karena dengan penaikkan sebesar empat kali, ki riboflavin kenaikan konsentrasi riboflavin yang dihasilkan kurang dari 30%.

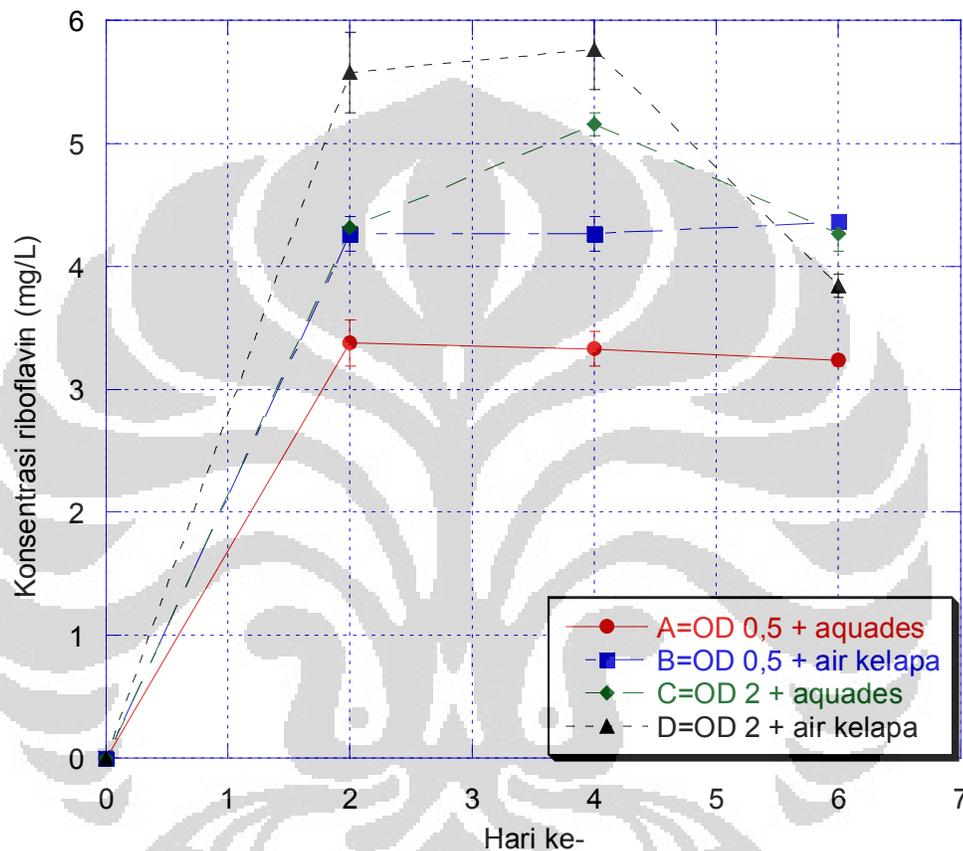
Efektifitas penggunaan air kelapa dapat dilihat dari kenaikan konsentrasi riboflavin pada starter dengan nilai OD yang sama. Pada starter dengan nilai OD 0,5 kenaikan konsentrasi riboflavin mencapai nilai 21,05% sedangkan kenaikan pada starter dengan OD 2 hanya 13,27%. Dari hasil ini, dapat dilihat bahwa hanya dengan mengganti pelarut inokulum, konsentrasi riboflavin pada sampel dapat meningkat hingga 20%.

Dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa penaikkan nilai OD dan penggunaan air kelapa sebagai pelarut dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter. Namun, jika efektifitas keduanya dibandingkan, penggunaan air kelapa sebagai pelarut inokulum lebih efektif daripada menaikkan nilai OD. Dengan penggunaan air kelapa, konsentrasi riboflavin dapat naik hingga 20%, sedangkan dengan penaikkan nilai OD sebesar empat kali, kenaikan konsentrasi riboflavin tidak lebih besar dari 30%.

4.3.3 Variasi Inokulum pada Starter *Nata de Coco* dengan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 90 g/L

Percobaan ini dilakukan untuk mencari kondisi optimum pada starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit sebanyak 90 g/L. Variasi yang dilakukan untuk mendapatkan kondisi optimum adalah nilai OD dan pelarut yang digunakan pada inokulum. Nilai OD dan pelarut yang digunakan pada percobaan ini sama dengan yang digunakan pada tahapan sebelumnya.

Tahapan pengerjaan dan metode yang dilakukan pada pembuatan starter kali ini sama dengan saat pembuatan starter-starter sebelumnya. Pengukuran absorbansi tetap dilakukan pada hari ke-2, 4, dan 6 dengan pengambilan data sebanyak dua kali untuk tiap variasi. Hasil pengukuran konsentrasi riboflavin pada variasi ini dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4. 10 Kurva Konsentrasi Riboflavin pada Starter *Nata de coco* dengan Variasi Inokulum dan Penambahan Minyak Kelapa Sawit 90 g/L

Pada Gambar 4.10 dapat dilihat bahwa nilai konsentrasi riboflavin tertinggi (secara berurutan) terjadi pada variasi D, C, B, dan A. Nilai ini diperoleh pada hari ke-empat inkubasi starter. Data ini menunjukkan *trend* yang sama dengan variasi yang dilakukan pada starter dengan penambahan minyak kelapa sawit sebanyak 30 g/L. Hasil ini semakin jelas memperlihatkan

bahwa penambahan nilai OD dan penggunaan air kelapa sebagai pelarut pada inokulum dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter *nata de coco*.

Pada percobaan ini, nilai konsentrasi riboflavin tertinggi adalah 5,77 mg/L. Angka ini dicapai oleh starter dengan nilai OD dua dan menggunakan air kelapa sebagai pelarut inokulum. Semakin tinggi nilai OD inokulum maka kerapatan bakteri di dalamnya pun semakin tinggi. Penambahan jumlah bakteri inilah yang akan mempengaruhi jumlah riboflavin yang diproduksi karena riboflavin yang ada pada starter merupakan hasil biosintesis bakteri fermentor (Tajima, dkk. 2009). Penggunaan air kelapa memberikan efek positif karena dapat menjaga tingkat keasaman media starter sesuai dengan yang diinginkan.

Pada starter dengan pelarut aquades, menaikkan nilai OD sebesar empat kali OD awal dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin sebesar 52,78%. Pada starter dengan pelarut air kelapa diperoleh kenaikan konsentrasi riboflavin sebesar 32,26%. Dua data ini menunjukkan bahwa walaupun konsentrasi tertinggi dicapai oleh starter D tetapi efektifitas menaikkan nilai OD lebih bagus jika dilakukan pada starter dengan aquades sebagai pelarut.

Efektifitas penggunaan air kelapa dapat dilihat dari kenaikan konsentrasi riboflavin pada starter dengan nilai OD yang sama. Pada starter dengan nilai OD 0,5 kenaikan konsentrasi riboflavin mencapai nilai 29,17% sedangkan kenaikan pada starter dengan OD 2 hanya 11,82%. Dari hasil ini, dapat dilihat bahwa hanya dengan mengganti pelarut inokulum, konsentrasi riboflavin pada sampel dapat meningkat hingga mendekati 30%.

Jika nilai konsentrasi riboflavannya dibandingkan dengan starter dengan penambahan minyak kelapa sawit 30 g/L, konsentrasi riboflavin tertinggi sama-sama dicapai variasi D pada hari ke-4. Namun, konsentrasi riboflavin pada starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 90 g/L menunjukkan angka yang lebih tinggi, yakni 1,71 mg/L. Nilai ini lebih tinggi 11% jika dibandingkan dengan nilai optimum variasi D pada starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 30 g/L.

Hal ini dapat menunjukkan bahwa penambahan jumlah minyak kelapa sawit yang ditambahkan juga mempengaruhi konsentrasi riboflavin yang terdapat pada starter. Semakin tinggi rasio nilai kelapa sawit yang ditambahkan

maka semakin banyak pula sumber karbon yang terdapat pada starter. Unsur karbon ini merupakan salah satu nutrisi penting dalam pertumbuhan bakteri *A. xylinum* (Edria, dkk. 2010). Selain itu, minyak kelapa sawit ini merupakan lipid yang dapat meningkatkan produksi riboflavin dari bakteri (Vijayalakshmi, dkk. 2010).

Semua starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 30 g/L dan 90 g/L kemudian dibuat menjadi *nata de coco*. Namun demikian, pembuatan *nata de coco* ini masih belum berhasil sehingga belum dapat diketahui apakah starter yang memiliki konsentrasi riboflavin tertinggi dapat menghasilkan *nata de coco* dengan konsentrasi riboflavin yang tinggi pula. Kegagalan ini dapat dilihat dari tidak adanya lapisan selulosa putih yang terbentuk di permukaan media embuatan *nata de coco*. Hal ini kemungkinan disebabkan akibat adanya kontaminasi pada media karena pada beberapa media terlihat adanya jamur yang tumbuh di permukaan (Gambar 4.11). Bentuk lempeng nata yang baik dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 4. 11 *Nata de Coco* Terkontaminasi

Perbandingan nilai konsentrasi optimum dari beberapa penelitian riboflavin dapat dilihat pada Tabel 4.2:

Tabel 4. 2 Perbandingan Konsentrasi Riboflavin Optimum dari Berbagai Penelitian

No.	Mikroorganisme	Media	Nutrisi tambahan/ Perlakuan	Konsentrasi optimum	Sumber
1	<i>Ashbya gossypii</i>	<i>modified seed medium</i>	<i>rapeseed oil</i>	1100 (mg/L)	Park dan Ming. 2003
2	<i>Ashbya gossypii</i>	<i>modified seed medium</i>	<i>rapeseed oil</i>	9000 (mg/L)	Tajima, dkk. 2009
3	<i>Ashbya gossypii</i>	<i>modified seed medium</i>	<i>palm oil</i>	2000 (mg/L)	Pak, Kato, dan Ming. 2004
4	<i>Eremothecium ashbyii</i>	<i>modified seed medium</i>	<i>molasses</i>	1,16 (mg/L)	Pujari dan Chandra. 2000
5	<i>Eremothecium ashbyii</i>	<i>modified seed medium</i>	<i>olive oil</i> dan <i>sun flower oil</i>	500 (mg/L)	Vijayalakshmi, dkk. 2010
6	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	starter yogurt	bakteri mutan	19,7 (µg/g)	Le Blanc, dkk. 2006
7	<i>Acetobacter xylinum</i>	starter nata de coco	<i>palm oil</i>	5,77 (mg/L)	Dewi. 2011

Berdasarkan data-data yang terangkum pada Tabel 4.2 di atas, dapat terlihat bahwa konsentrasi riboflavin optimum pada penelitian ini masih jauh di bawah hasil nomor 1, 2, 3, dan 5. Perbedaan ini terjadi karena perbedaan mikroorganisme yang digunakan. Pada penelitian tersebut digunakan mikroorganisme yang sudah dikenal sebagai riboflavin *overproducer microorganism* sedangkan penggunaan bakteri sebagai produser riboflavin masih jarang digunakan karena produksinya tidak terlalu besar. Namun demikian, peningkatan produksi riboflavin pada bakteri terus dilakukan dalam aplikasinya terhadap makanan dan minuman seperti yogurt dan *nata de coco* karena dengan mengkonsumsi secara teratur makanan dan minuman yang memiliki kandungan riboflavin tinggi dapat membantu mencegah kekurangan vitamin penting ini.

Pada penelitian Pujari dan Chandra, konsentrasi riboflavin optimum yang diperoleh, lebih rendah dari hasil penelitian ini. Hal ini disebabkan nutrisi tambahan yang digunakan adalah *molasses* yang memiliki rantai karbon lebih rendah dari minyak nabati. Selain itu, *molasses* tidak memiliki kandungan lipid yang juga dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam memproduksi riboflavin (Vijayalakshmi, dkk. 2010).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat diperoleh beberapa kesimpulan, yaitu:

- Penambahan minyak kelapa sawit di dalam starter *nata de coco* dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter.
- Rasio penambahan minyak kelapa sawit yang optimum adalah 90 g/L dengan kenaikan konsentrasi riboflavin sebesar 69,84%.
- Peningkatan nilai OD dari 0,5-2 pada inokulum dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter.
- Penggunaan air kelapa sebagai pelarut pada pembuatan inokulum dapat meningkatkan konsentrasi riboflavin pada starter.
- Konsentrasi riboflavin tertinggi sebesar 5,77 mg/L didapat pada starter dengan rasio penambahan minyak kelapa sawit 90 g/L dengan OD dua dan air kelapa sebagai pelarut inokulum.

5.2 Saran

Ada beberapa saran yang dapat diberikan oleh penulis untuk meningkatkan hasil penelitian ini, yaitu:

- Pembuatan *nata de coco* pada penelitian ini masih belum berhasil sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan kondisi optimum dalam pembuatan *nata de coco* menggunakan starter dari isolat bakteri *A. xylinum*.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan nilai OD optimum yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi riboflavin bakteri *A. xylinum*.

DAFTAR REFERENSI

- Agustian, dkk. Analisis Pengembangan Agro-Industri Komoditas Perkebunan Rakyat (Kopi dan Kelapa) dalam Mendukung Peningkatan Daya Saing Sektor Pertanian. Makalah Seminar Hasil Penelitian Pusat Penelitian dan Pengembangan Sosial Ekonomi Pertanian Bogor. T.A. 2003.
- Bacher, dkk. Biosynthesis of Vitamin B₂ (Riboflavin). Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie. 2000.
- Babyak, dkk. Riboflavin Production. United States Patent. 2002.
- Darmansyah. Evaluasi Sifat Fisik dan Sifat Mekanik Material Komposit Serat/Resin Berbahan Dasar Serat Nata de Coco dengan Penambahan Nanofiller. Tesis Universitas Indonesia. 2010.
- Edria, dkk. Pengaruh Penambahan Kadar Gula dan Kadar Nitrogen terhadap Ketebalan, Tekstur, dan Warna Nata de Coco. Makalah PKMAI Institut Pertanian Bogor, 2010.
- Goodwin dan Pendlington. Studies on the Biosynthesis of Riboflavin: Nitrogen Metabolism and Flavinogenesis in *Etmothecium ashbyii*. Department of Biochemistry, The University of Liverpool. 1954.
- Hird dan Lambert. Solubilized Riboflavin. United States Patent Application Publication. 2001.
- Kurth, Roland. Way of Increasing the Riboflavin Content in Spray-Dried Discharges from Riboflavin Fermentations. United States Patent. 1999.
- Le Blanc, dkk. A Novel Dairy Product Fermented with *Propionibacterium freudenreichii* Improves the Riboflavin Status of Deficient Rats. Journal of Nutrition. 2006.
- Nainggolan, Jusman. Kajian Pertumbuhan Bakteri *Acetobacter sp.* dalam Kombucha-Rosela Merah (*Hibiscus sabdariffa*) pada Kadar Gula dan Lama Fermentasi yang Berbeda. Tesis Universitas Sumatera Utara. 2009.
- Park dan Ming. Oxidation of Rapeseed Oil in Waste Activated Bleaching Earth and Its Effect on Riboflavin Production in Culture of *Ashbya gossypii*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2003.

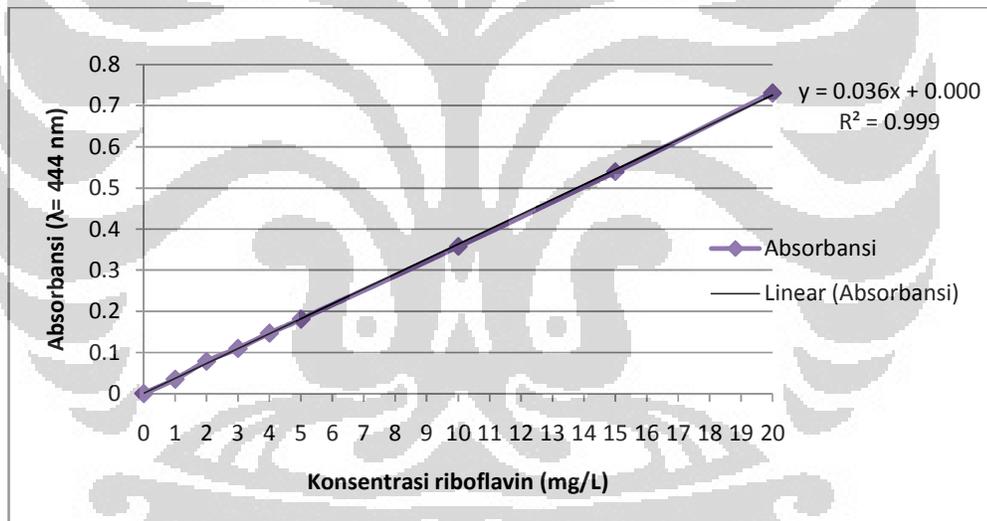
- Park, Kaito, dan Ming. Utilization of Waste Activated Bleaching Earth Containing Palm Oil in Riboflavin Production by *Ashbya gossypii*. JAOCS. 2004.
- Pasaribu, Nurhida. Minyak Buah Kelapa Sawit. Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara. 2004.
- Pujari dan Chandra. Statistical Optimization of Medium Components for Enhanced Riboflavin Production by a UV-mutant of *Eremothecium ashbyii*. Journal of Process Biochemistry. 2000.
- Tajima, dkk. Increased Riboflavin Production from Activated Bleaching Earth by a Mutant Strain of *Ashbya gossypii*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2009.
- Tampubolon, Lisbeth. Pembuatan Material Selulosa-Kitosan Bakteri dalam Medium Air Kelapa dengan Penambahan Pati dan Kitosan Menggunakan *Acetobacter xylinum*. Tesis Universitas Sumatera Utara. 2008.
- Vijayalakshmi, dkk. Lipid Accumulation and Membrane Fluidity Influence Mycelial Stability and Riboflavin Production by the Riboflavinogenic Fungus *Eremothecium ashbyii*. The Internet Journal of Microbiology™ ISSN: 1937-8289. 2010.
- Zahara, Chisilia. Pemanfaatan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Sistem *Microbial Fuel Cell* untuk Produksi Energi Listrik. Skripsi Universitas Indonesia. 2011.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pengukuran Absorbansi Riboflavin Standar

Konsentrasi Riboflavin (mg/L)	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
0	0
1	0.035
2	0.079
3	0.11
4	0.147
5	0.181
10	0.358
15	0.54
20	0.731

Lampiran 2. Kurva Kalibrasi Standar Riboflavin



Lampiran 3. Data Pengukuran Absorbansi pada Starter *Nata de Coco* Komersil

Kontrol Negatif		Minyak 15 g/L	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
b11	0.018	c11	0.028
b12	0.018	c12	0.03
b21	0.097	c21	0.045
b22	0.097	c22	0.049
b31	0.082	c31	0.047
b32	0.079	c32	0.052
b41	0.045	c41	0.052
b42	0.051	c42	0.06
b51	0.086	c51	0.12
b52	0.095	c52	0.121
b71	0.041	c71	0.011
b72	0.041	c72	0.009

Lampiran 4. Data Pengukuran Absorbansi pada Starter *Nata de Coco* Buatan dengan Variasi Rasio Penambahan Minyak Kelapa Sawit

Kontrol Negatif		Penambahan Minyak 30 g/L	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
121a	0.037	221a	0.049
121b	0.038	221b	0.05
122a	0.036	222a	0.08
122b	0.038	222b	0.078
123a	0.039	223a	0.083
123b	0.032	223b	0.059
141a	0.043	241a	0.037
141b	0.052	241b	0.056
142a	0.034	242a	0.048
142b	0.037	242b	0.063
143a	0.038	243a	0.054
143b	0.038	243b	0.053
161a	0.041	261a	0.043
161b	0.042	261b	0.048
162a	0.038	262a	0.048
162b	0.035	262b	0.048
163a	0.04	263a	0.061
163b	0.039	263b	0.045

Penambahan Minyak 50 g/L	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
321a	0.042
321b	0.072
322a	0.064
322b	0.055
323a	0.057
323b	0.051
341a	0.066
341b	0.051
342a	0.044
342b	0.054
343a	0.059
343b	0.07
361a	0.043
361b	0.054
362a	0.06
362b	0.056
363a	0.04
363b	0.037

Penambahan Minyak 70 g/L	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
421a	0.042
421b	0.038
422a	0.041
422b	0.045
423a	0.053
423b	0.044
441a	0.06
441b	0.054
442a	0.049
442b	0.064
443a	0.06
443b	0.055
461a	0.048
461b	0.051
462a	0.048
462b	0.047
463a	0.052
463b	0.052

Penambahan Minyak 90 g/L	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444 \text{ nm}$)
521a	0.117
521b	0.076
522a	0.042
522b	0.04
523a	0.036
523b	0.052
541a	0.069
541b	0.079
542a	0.086
542b	0.072
543a	0.057
543b	0.048
561a	0.063
561b	0.071
562a	0.058
562b	0.061
563a	0.056
563b	0.059

Lampiran 5. Data Pengukuran Absorbansi Starter *Nata de Coco* dari Isolat Bakteri *Acetobacter xylinum* dengan Variasi Inokulum

Penambahan Minyak 30 g/L		Penambahan Minyak 90 g/L	
A=OD 0,5; aquades		A=OD 0,5; aquades	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)
A321	0.036	A921	0.034
A322	0.04	A922	0.038
A341	0.037	A941	0.034
A342	0.039	A942	0.037
A361	0.034	A961	0.034
A362	0.033	A962	0.035
B=OD 2; aquades		B=OD 2; aquades	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)
B321	0.048	B921	0.047
B322	0.044	B922	0.044
B341	0.046	B941	0.044
B342	0.046	B942	0.047
B361	0.042	B961	0.046
B362	0.045	B962	0.047
C=OD 0,5; air kelapa		C=OD 0,5; air kelapa	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)
C321	0.045	C921	0.046
C322	0.048	C922	0.046
C341	0.048	C941	0.054
C342	0.05	C942	0.056
C361	0.038	C961	0.047
C362	0.042	C962	0.044
D=OD 2; air kelapa		D=OD 2; air kelapa	
Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)	Kode Sampel	Absorbansi ($\lambda = 444$ nm)
D321	0.048	D921	0.056
D322	0.057	D922	0.063
D341	0.052	D941	0.065
D342	0.059	D942	0.058
D361	0.045	D961	0.04
D362	0.044	D962	0.042

Lampiran 6. Foto Alat-Alat yang Digunakan

Nama Alat	Foto
Autoclave	
Inkubator	
Laminar flow box	
Microwave	
Micro-centrifuge	
pH meter	

Nama Alat	Foto
Spektrofotometer	
Vortex	

Lampiran 7. Foto Hasil Percobaan

Nama	Foto
NA cair	
Isolat <i>Acetobacter xylinum</i>	
Starter <i>nata de coco</i> kontrol negatif	
Starter <i>nata de coco</i> 30 g/L minyak kelapa sawit	

<p>Starter <i>nata de coco</i> 50 g/L minyak kelapa sawit</p>	
<p>Starter <i>nata de coco</i> 70 g/L minyak kelapa sawit</p>	
<p>Starter <i>nata de coco</i> 90 g/L minyak kelapa sawit</p>	
<p><i>Nata de coco</i> gagal</p>	