



**HIDROLISIS KULIT BUAH KOPI OLEH KAPANG *Pestalotiopsis* sp. VM 9  
SERTA PEMANFAATAN HIDROLISATNYA SEBAGAI MEDIUM  
PRODUKSI PROTEIN SEL TUNGGAL *Saccharomyces cerevisiae***

**SKRIPSI**

Oleh

**ZUNAIROH NIDAAN KHOFIYA  
NIM 141810401031**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**HIDROLISIS KULIT BUAH KOPI OLEH KAPANG *Pestalotiopsis* sp. VM 9  
SERTA PEMANFAATAN HIDROLISATNYA SEBAGAI MEDIUM  
PRODUKSI PROTEIN SEL TUNGGAL *Saccharomyces cerevisiae***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**ZUNAIROH NIDAAN KHOFIYA  
NIM 141810401031**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa syukur dan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan karunianya sehingga skripsi ini dapat berjalan dengan lancar;
2. Ayah Drs. Misbaqusshobir, Ibu Yayuk Wahyuningwati, S.Pd, adik saya Alam Asrorul Haq serta seluruh keluarga;
3. guru-guru mulai dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu bermanfaat selama ini;
4. Almamater tercinta yaitu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

“Bahwasannya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya”

(QS. An- Najm: 39) \*)

“Bagaimanapun keadaan kita, mau sedih, bahagia, waktu tidak pernah berhenti menunggu. Waktu tetap berjalan.”

(Tere Liye)\*\*)

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemah Al- HAMID*. Jakarta: Beras.

\*\*\*) Tere Liye. 2014. *Rindu*. Jakarta: Republika Penerbit

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zunairoh Nidaan Khofiya

NIM : 141810401031

menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Hidrolisis Kulit Buah Kopi Oleh Kapang Pestalotiopsis sp. Vm 9 Serta Pemanfaatan Hidrolisatnya Sebagai Medium Produksi Protein Sel Tunggal Saccharomyces cerevisiae*” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institut manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus saya junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan kesadaran dan sebenarnya, tanpa adanya tekanan atau paksaan dari pihak manapun. Saya bersedia menerima sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan yang saya tulis ini terbukti tidak benar.

Jember, 23 Juli 2018

Yang menyatakan,



Zunairoh Nidaan Khofiya  
NIM 141810401031

**SKRIPSI**

**HIDROLISIS KULIT BUAH KOPI OLEH KAPANG *Pestalotiopsis* sp. VM 9  
SERTA PEMANFAATAN HIDROLISATNYA SEBAGAI MEDIUM  
PRODUKSI PROTEIN SEL TUNGGAL *Saccharomyces cerevisiae***

Oleh

**Zunairoh Nidaan Khofiya  
NIM. 141810401031**

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.**

**Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.**

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “*Hidrolisis Kulit Buah Kopi Oleh Kapang Pestalotiopsis sp. Vm 9 Serta Pemanfaatan Hidrolisatnya Sebagai Medium Produksi Protein Sel Tunggal Saccharomyces cerevisiae*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal : **JUM'AT 07 SEP 2018**

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim Penguji

Ketua,



Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP. 196805031994011001

Sekretaris,



Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.  
NIP. 196008161989021001

Anggota I,



Drs. Siwanto, M. Si.  
NIP. 196012161993021001

Anggota II,



Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc  
NIP. 195510221982121001

Mengesahkan

Dekan,



Dr. Sajito, Ph.D.  
NIP. 196102041987111001

## RINGKASAN

**Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9 Serta Pemanfaatan Hidrolisatnya Sebagai Medium Produksi Protein Sel Tunggal *Saccharomyces cerevisiae***; Zunairoh Nidaan Khofiya, 141810401031; 2018; 37 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kopi adalah salah satu tanaman yang dibudidayakan sebagai ladang penghasilan masyarakat. Produksi maupun ekspor kopi sangat tinggi sehingga semakin tingginya produksi semakin tinggi pula limbah yang dihasilkan. Limbah kopi pada umumnya mengandung senyawa yang dapat berdampak buruk pada lingkungan. Selain itu, kulit buah kopi mengandung 0,98% hemiselulosa, 18,65% selulosa, dan 12,25% lignin. Oleh karena itu dilihat dari sisi positifnya limbah ini dapat dimanfaatkan untuk menaikkan nilai gunanya. Salah satu pemanfaatannya adalah menghidrolisis limbah kulit buah kopi.

Golongan kapang dapat mendekomposisi kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin pada limbah organik. *Pestalotiopsis* sp. VM 9 adalah salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yaitu selulase. Hasil dari hidrolisis kulit buah kopi oleh *Pestalotiopsis* sp. VM 9 digunakan sebagai medium protein sel tunggal yaitu *Saccharomyces cerevisiae*. PST *S. cerevisiae* adalah salah satu sumber protein dan pakan. Selain itu *S. cerevisiae* juga mengandung karbohidrat, lemak dan vitamin B kompleks yang cukup tinggi.

Hidrolisis kulit buah kopi oleh *Pestalotiopsis* sp. VM 9 sesuai dengan waktu optimum spora yaitu inkubasi hari ke-5 dan telah dilakukan fermentasi padat hingga inkubasi hari ke-6 sesuai dengan waktu optimum produksi enzim menunjukkan bahwa hidrolisat kulit buah kopi mampu mencukupi kebutuhan nutrisi *S. cerevisiae* dalam pertumbuhannya. Pertumbuhan *S. cerevisiae* optimum pada jam ke- 54 dengan jumlah sel mencapai  $8,5 \times 10^6$  sel/ ml dan sisa gula reduksi pada jam terakhir inkubasi adalah 180,44  $\mu\text{g/ml}$ . Pertumbuhan *S.*



*cerevisiae* diikuti dengan penurunan gula reduksi yang terkandung dalam medium (hidrolisat). Gula reduksi yang dimanfaatkan *S. cerevisiae* untuk tumbuh kurang lebih 54% dari gula reduksi awal yaitu 392,3457  $\mu\text{g/ml}$ .



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9 Serta Pemanfaatan Hidrolisatnya Sebagai Medium Produksi Protein Sel Tunggal *Saccharomyces cerevisiae*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota sekaligus Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Drs. Siswanto, M. Si., selaku Dosen Penguji I dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., selaku Dosen Penguji II yang banyak memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi;
3. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang banyak membantu penulis selama penelitian;
4. Ayah, ibu, adik, dan seluruh keluarga yang telah memberikan banyak do’a, motivasi, materi, dan dukungan yang tiada henti;
5. seluruh rekan kerja di Mikrobiologi antara lain: Putri R., Syafiq U., Fianda D., S. Erlinkha, Khilia N., Dwi N.H., Eka Y.N., S. Nur H., Dela D. dan semua teman di Biologi khususnya teman-teman “*Bivalvia*” angkatan 2014. Terima kasih atas do’a, kerjasama, bantuan, dan dukungan selama ini;
6. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan penulisan. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 23 Juli 2018

Penulis



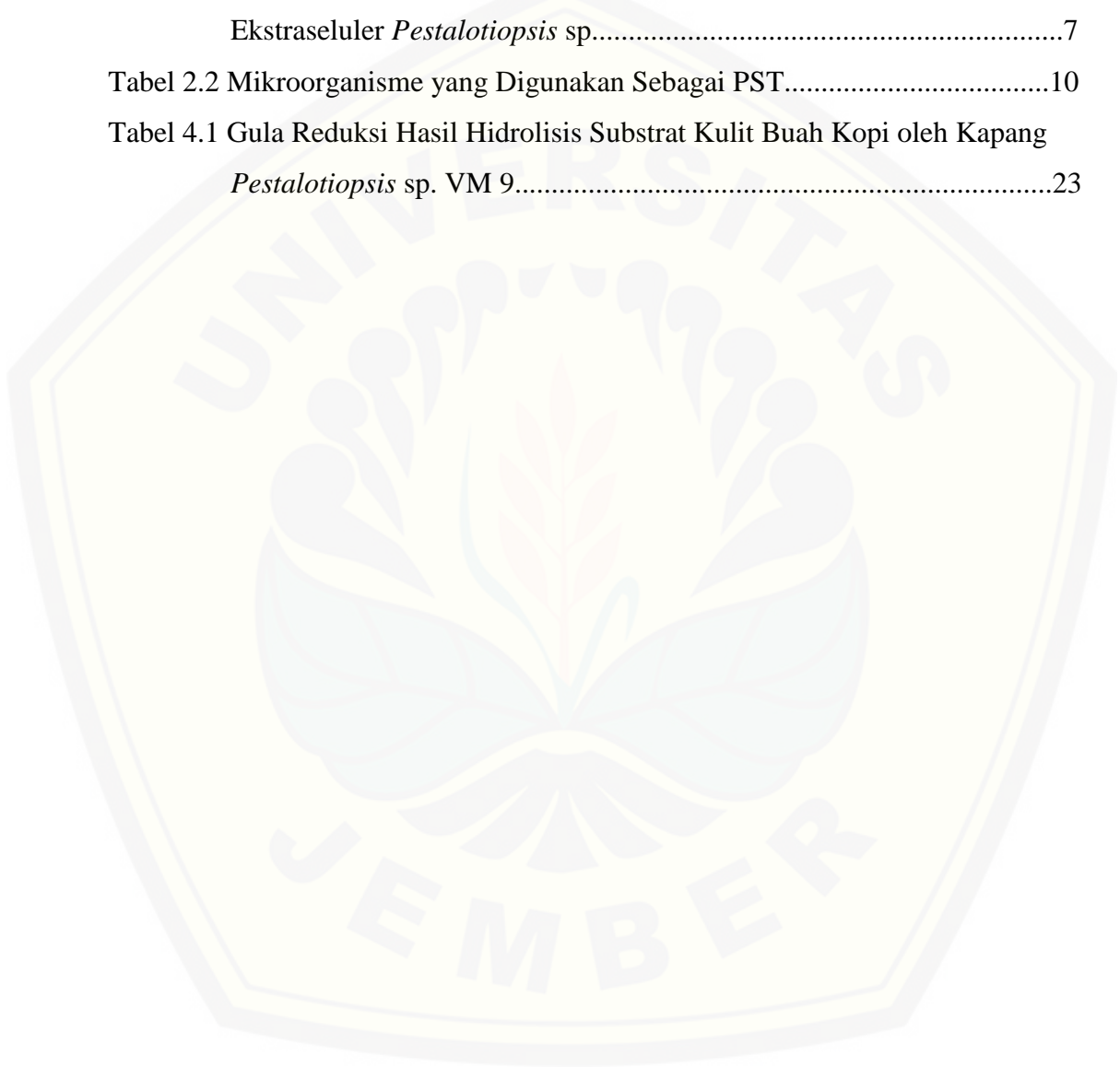
DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan.....	2
1.5 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Kulit Buah Kopi .....	4
2.2 Karakteristik <i>Pestalotiopsis</i> sp. ....	5
2.3 Hidrolisis Material Organik Oleh Kapang .....	7
2.4 Protein Sel Tunggal .....	10

<b>BAB 3. METODE</b> .....	<b>12</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	12
3.2 Alat dan Bahan .....	12
3.3 Prosedur Penelitian.....	12
3.3.1 Persiapan Bahan- Bahan Penelitian .....	13
3.3.2 Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9.....	17
3.3.3 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Pada Medium Hasil Hidrolisat Kulit Buah Kopi .....	18
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>20</b>
4.1 Analisis Kepadatan Spora <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9 .....	20
4.2 Optimasi Produksi Enzim.....	21
4.3 Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9 .....	22
4.4 Produksi <i>S. cerevisiae</i> Pada Hidrolisat Kulit Buah Kopi.....	23
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>27</b>
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>28</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>34</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Penelitian yang Telah dilakukan dengan Memanfaatkan Enzim Ekstraseluler <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	7
Tabel 2.2 Mikroorganisme yang Digunakan Sebagai PST.....	10
Tabel 4.1 Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Substrat Kulit Buah Kopi oleh Kapang <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9.....	23



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Fenotipe Koloni <i>Pestalotiopsis</i> spp. pada Media PDA 7-10 hari (Guava <i>et al.</i> , 2015).....	6
Gambar 2.2 Struktur Rantai Selulosa. Sumber: (Yokohama, 2008).....	8
Gambar 2.3 Struktur Rantai Hemiselulosa Yakni Xylan. Sumber: (Yokohama, 2008).....	9
Gambar 2.4 Struktur Penyusun Rantai Lignin; (a) Guaiacyl dan (b) Sryingyl. Sumber: (Yokohama, 2008).....	9
Gambar 4.1 Kurva Kepadatan Spora <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9 Pada Media Ekstrak Alkali Kulit Buah Kopi.....	21
Gambar 4.2 Kurva Optimasi Produksi Enzim oleh <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM 9 Pada Media Subtrat Kulit Buah Kopi.....	22
Gambar 4.3 Optimasi Waktu dan Konsentrasi Pertumbuhan PST <i>S. cerevisiae</i> Pada Hidrolisat Kulit Buah Kopi.....	24
Gambar 4.4 Kurva Hubungan Populasi <i>S. cerevisiae</i> dan Konsumsi Gula Reduksi.....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A. Komposisi Media dan Cara Pembuatannya.....	34
A.1 Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	34
A.2 Media <i>Yeast Ekstract Peptone Dextrose</i> (YEPD) <i>Broth</i> dan <i>Agar</i> .....	35
Lampiran B. Kurva Standart Glukosa.....	36
B.1 Tabel Standart Glukosa.....	36
B.2 Kurva Standart Glukosa.....	36
Lampiran C. Kurva Standart Populasi PST.....	37
C.1 Tabel Standart Populasi PST.....	37
C.2 Kurva Standart Populasi PST.....	37



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kopi adalah salah satu tanaman yang dibudidayakan sebagai ladang penghasilan masyarakat. Selain itu, kopi berperan sebagai sumber pendapatan devisa negara. Produksi kopi Indonesia dipasarkan dalam negeri maupun luar negeri. Menurut data statistik *International Coffee Organization (ICO)* 2017, Indonesia merupakan negara eksportir kopi ke-tiga di dunia. Kontribusi nilai komoditi kopi terhadap perekonomian Indonesia dapat dilihat dari volume (jumlah) ekspor dan nilai ekspor kopi tersebut. Produksi kopi yang tinggi menjadi penyebab meningkatnya limbah kulit kopi. Limbah kulit kopi memiliki kandungan serat sebesar 65,2% (Siswati *et al.*, 2010)

Limbah yang dibuang di perairan adalah salah satu polutan yang berdampak buruk bagi lingkungan (Bressani *et al.*, 1979). Pada banyak penelitian yang telah dilakukan bahwa limbah kulit kopi dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol (Ernawati & Raudah, 2012), bahan bakar pengganti dalam bentuk briket (Khusna, 2015), dimanfaatkan sebagai amelioran tanah alami (Pujiyanto, 2007). Limbah dari produksi kopi atau disebut *coffe pulp* mengandung senyawa toksik yaitu kafein, polifenol dan terminos (Bressani *et al.*, 1979). Senyawa tersebut dapat di degradasi menggunakan mikroorganisme salah satu diantaranya adalah fungi (Miranti *et al.*, 2009).

Senyawa yang terkandung dalam kulit buah kopi mengandung 0,98% hemiselulosa, 18,65% selulosa, dan 12,25% lignin (Penaloza *et al.*, 1985). Senyawa tersebut dapat didekomposisi mikroorganisme baik bakteri maupun kapang karena limbah kulit kopi merupakan bahan organik. Agen dekomposisi yang paling efektif adalah dari golongan kapang (Miranti *et al.*, 2009). Golongan kapang dapat mendekomposisi kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin pada limbah organik (Saraswati *et al.*, 2008). Lignoselulosa yang merupakan bahan utama penyusun dinding sel tumbuhan dapat dijadikan menjadi monomer gula sederhana melalui proses hidrolisis (Hermiati *et al.*, 2010).

Salah satu jenis kapang yang dapat merombak limbah organik yang mengandung lignoselulosa adalah *Pestalotiopsis* sp. karena dapat menghasilkan enzim seperti laccase dan selulase (Zhang *et al.*, 2006) dan telah dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Yuniar (2013). Hasil hidrolisis dari kulit buah kopi diharapkan dapat dijadikan medium pertumbuhan protein sel tunggal *S. cerevisiae*. Telah diketahui bahwa *S. cerevisiae* adalah salah satu sumber protein dan pakan, selain itu *S. cerevisiae* juga mengandung karbohidrat, lemak dan vitamin B kompleks yang cukup tinggi (Purwitasari *et al.*, 2004).

### 1.2 Rumusan Masalah

Apakah hasil hidrolisis kulit buah kopi Robusta dapat menghasilkan gula reduksi yang dapat digunakan sebagai medium PST *S. cerevisiae* dan bagaimana pengaruhnya ketika digunakan sebagai medium untuk pertumbuhan PST *S. cerevisiae*?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu pengukuran kemampuan hidrolisis *Pestalotiopsis* sp. VM 9 pada kulit buah kopi Robusta. Selanjutnya penentuan waktu dan konsentrasi pertumbuhan optimum protein sel tunggal yaitu *S. cerevisiae*.

### 1.4 Tujuan

Pada penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh hidrolisat kulit buah kopi yang dihidrolisis oleh kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9 sebagai medium pertumbuhan PST *S. cerevisiae*.

### **1.5 Manfaat**

Manfaat yang diperoleh dari dilakukannya penelitian ini adalah sebagai salah satu sumber informasi pemanfaatan kulit lunak buah kopi dari proses hidrolisis dan hasil hidrolisatnya dapat digunakan sebagai salah satu medium pertumbuhan PST yang mana telah diketahui bahwa PST dapat digunakan sebagai sumber protein pangan dan pakan.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kulit Buah Kopi

Perkebunan kopi adalah salah satu dari subsektor yang memiliki peran penting di Indonesia. Kopi berperan besar dalam pembangunan perekonomian Indonesia dan cukup baik di pasar dunia. Nilai ekspor kopi dari Indonesia semakin meningkat sehingga produksi kopi juga meningkat. Semakin tingginya jumlah produksi semakin tinggi pula limbah yang di buang (Nurfitriani *et al.*, 2017).

Pemanfaatan limbah kopi hingga saat ini belum maksimal, oleh karena itu, perlu sebuah terobosan baru guna mengolah limbah kopi agar dapat dimanfaatkan dan tidak terbuang sia-sia. Jumlah limbah kopi yang perlu ditangani sebesar 44,6% dari berat buah kopi kering (Bressani *et al.*, 1979). Pengolahan kopi secara basah (*fully wet process*) maupun kering (*dry process*) berpotensi menghasilkan limbah kulit kopi dalam jumlah yang besar (Nurfitriani *et al.*, 2017). Bubur kopi yang melimpah merupakan agen pencemar lingkungan terutama daerah sungai yang dekat dengan lokasi pengolahan kopi. Pencemaran ini disebabkan oleh kehadiran emisi  $CH_4$  dan  $N_2O$  yang tidak terkontrol dalam kandungan bubur kopi (Ernawati *et al.*, 2012).

Buah kopi terdiri dari epikarp yang disebut juga dengan kulit buah, merupakan bagian terluar dari buah kopi, mesokarp disebut juga dengan daging kulit merupakan bagian yang beragak manis dan mempunyai kandungan air yang cukup tinggi, endokarp atau kulit tanduk merupakan kulit kopi paling keras tersusun oleh selulosadan hemiselulosa. Spermoderm disebut dengan kulit ari merupakan kulit yang paling tipis dan menempel pada kulit kopi dan endosperm atau keping biji, merupakan bagian buah kopi yang diambil manfaat untuk diolah menjadi kopi bubuk (Bressani *et al.*, 1979).

Berikut adalah klasifikasi tanaman kopi menurut *United States Department of Agriculture* (USDA):

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Ordo : Rubiales  
Family : Rubiaceae  
Genus : *Coffea*  
Spesies : *Coffea* sp. L.

Pada kulit buah kopi mengandung 0,98% hemiselulosa, 18,65% selulosa, dan 12,25% lignin (Penaloza *et al.*, 1985). Beberapa penelitian yang telah dilakukan bahwa limbah kulit kopi dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol (Ernawati & Raudah, 2012), bahan bakar pengganti dalam bentuk bricket (Khusna, 2015), dimanfaatkan sebagai amelioran tanah alami (Pujiyanto, 2007). Selain itu kulit buah kopi juga dapat dimanfaatkan sebagai pakan untuk meningkatkan bobot ternak sebagaimana telah dilakukan dalam penelitian Khalil (2016) pada ayam boiler.

## 2.2 Karakteristik *Pestalotiopsis* sp.

*Pestalotiopsis* sp. adalah salah satu jenis fungi yang dapat menyebabkan penyakit pada berbagai jenis tanaman. Spesies ini dapat ditemukan di daerah beriklim tropis dan beriklim sedang (Jeewon *et al.*, 2006). Komoditi tanaman yang diserang seperti tanaman kemiri di Brazil (Lazarotto *et al.*, 2014), tangkai dan daun tanaman jambu biji di Mesir (Eman, 2015), menyerang daun tumbuhan palem (Elliott, 2009), dan daun teh di India (Barman *et al.*, 2015), dan berbagai jenis tanaman lainnya. Menurut (Elliott, 2009), daun yang terserang *Pestalotiopsis* sp. akan muncul bintik kecil berwarna kuning, coklat atau bintik hitam yang terlihat meluas di permukaan daun. Patogen jenis ini dapat menjadi masalah serius

bagi tanaman karena dapat merusak jaringan vaskular dan apabila infeksi mencapai tunas muda dikhawatirkan dapat menyerang meristem apikal pada daun tanaman.

Berikut adalah klasifikasi dari *Pestalotiopsis* sp. menurut *National Center for Biotechnology Information* (NCBI):

Kingdom : Fungi  
Division : Ascomycota  
Class : Sordariomycetes  
Ordo : Xylariales  
Family : Amphisphaeriaceae  
Genus : *Pestalotiopsis*  
Spesies : *Pestalotiopsis* sp. (NCBI, 2017)

Karakteristik morfologi dari *Pestalotiopsis* sp. yang diinokulasikan pada media PDA akan terlihat seperti kapas warna putih pada awalnya dan kemudian akan muncul bintik-bintik warna hitam pada permukaan dan akan semakin gelap. Karakteristik koloni isolat *P. psidii* sebagian besar berwarna krem dan terlihat warna putih pada koloni *P. neglecta* (Guava *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 Fenotipe koloni *Pestalotiopsis* spp pada media PDA 7- 10 hari (Guava *et al.*, 2015).

Pada penelitian Zhang (2006), menyatakan bahwa *Pestalotiopsis* sp. menghasilkan metabolit sekunder berupa enzim laccase dan selulase. Selain itu, *Pestalotiopsis* sp. terbukti menghasilkan bioaktif metabolit seperti terpenoid, turunan isocoumarin, coumarin, chromone, quinones, semiquinones, peptida, xanthone, turunan xanthone, fenol, asam fenolik, dan lakton dengan berbagai aktivitas anti jamur, antimikroba, dan antitumor (Xu *et al.*, 2010).

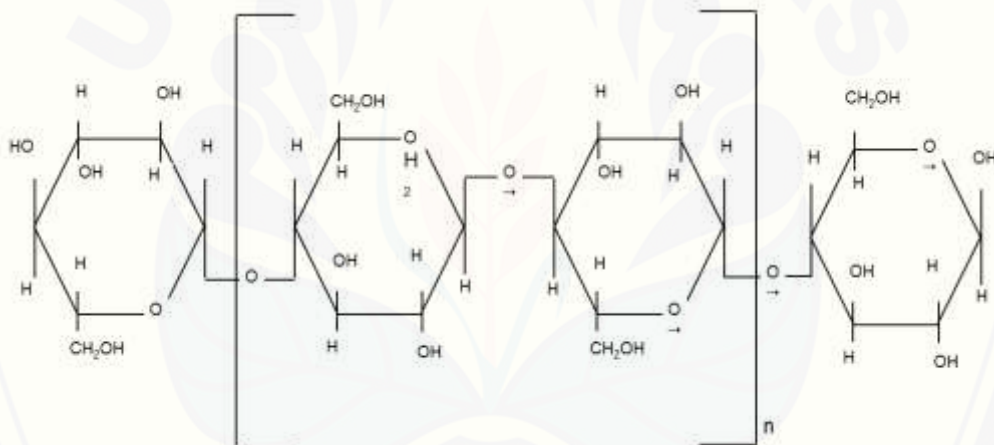
Tabel 2.1 Penelitian yang telah dilakukan dengan memanfaatkan enzim ekstraseluler *Pestalotiosis* sp.

Enzim	Judul	Hasil	Referensi
Tannase	<i>Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from Pestalotiopsis guepinii</i> URM 7114.	Metode Solid State Fermentation (SSF) digunakan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler dari <i>Pestalotiopsis guepinii</i> URM 7114	(Sena <i>et al.</i> , 2014)
Selulase	<i>Solid-state Fermentation for Cellulase Production by Pestalotiopsis versicolor</i>	Metode SSF lebih efektif dalam menghasilkan $\beta$ -glukosidase <i>Pestalotiopsis versicolor</i>	(Rao <i>et al.</i> , 1983)
Enzim lignolitik dan nonlignolitik	<i>Utilization of kapok fiber as a natural sorbent in petroleum hydrocarbon biodegradation by Pestalotiopsis sp.</i>	Hubungan antara pemanfaatan kapok dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. mempercepat laju biodegradasi PHC di tanah.	(Heri <i>et al.</i> , 2016)

### 2.3 Hidrolisis Material Organik Oleh Kapang

Hidrolisis adalah proses pemecahan biomassa yang mengandung lignoselulosa. Senyawa lignoselulosa terdiri atas tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang merupakan bahan utama penyusun dinding sel tumbuhan menjadi monomer gula sederhana yang dilakukan secara hidrolisis enzimatis maupun kimiawi (Hermiati *et al.*, 2010).

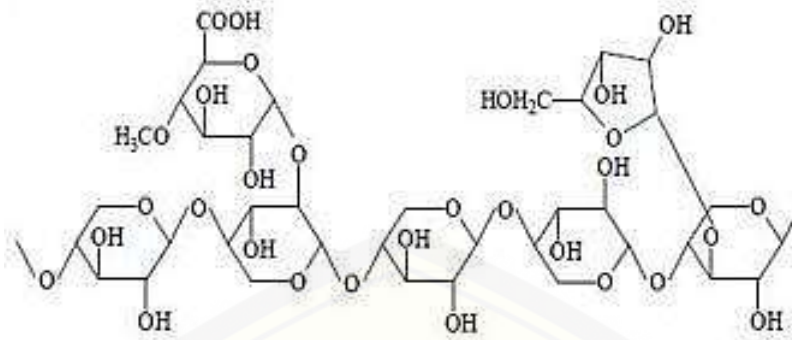
Selulosa adalah polisakarida yang tersusun dari D-glukosa yang terhubung secara seragam oleh ikatan  $\beta$ -glukosida. Rumus molekulnya adalah  $(C_6H_{12}O_6)_n$ . Derajat polimerasinya, ditunjukkan oleh  $n$ , dengan nilai kisaran yang lebar mulai dari beberapa ribu hingga puluhan ribu. Hidrolisis total selulosa menghasilkan D-glukosa (sebuah monosakarida), akan tetapi hidrolisis parsial menghasilkan disakarida (selobiosa) dan polisakarida yang memiliki  $n$  berurutan dari 3 ke 10. Selulosa memiliki struktur kristal dan memiliki resistensi yang tinggi terhadap asam dan basa (Yokoyama, 2008). Selulase merupakan enzim yang sangat penting perannya dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, makanan ternak dan etanol (Mandels *et al.*,1976).



Gambar 2.2 Struktur rantai selulosa. Sumber: (Yokoyama, 2008).

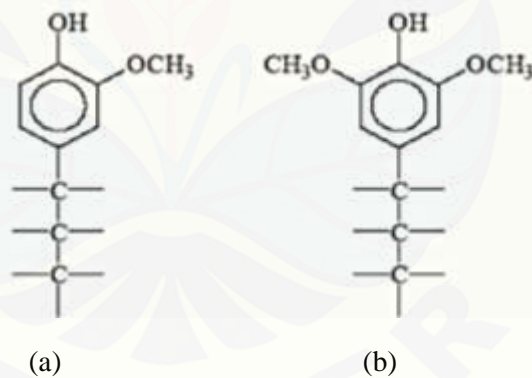
Hemiselulosa Polisakarida dimana unit-unitnya adalah terdiri atas monosakarida dengan 5 karbon seperti D-xilosa, D-arabinosa dan monosakarida karbon-6 seperti D-manosa, D-galaktosa dan D- glukosa. Jumlah monosakarida karbon-5 lebih banyak dibandingkan monosakarida karbon-6 dan rumus molekul rata-ratanya adalah  $(C_5H_8O_4)_n$ . Karena derajat polimerisasi ( $n$ ) hemiselulosa adalah antara 50 sampai 200, yaitu lebih kecil dari selulosa, maka ia lebih mudah terurai dibandingkan selulosa, dan kebanyakan hemiselulosa dapat larut dalam larutan alkali. Hemiselulosa yang umum adalah xylan (Yokoyama, 2008).





Gambar 2.3 Struktur rantai hemiselulosa yakni xylan. Sumber: (Yokoyama, 2008).

Lignin Merupakan senyawa dimana unit komponennya, fenilpropana dan turunannya, terikat secara 3 dimensi. Strukturnya kompleks dan sejauh ini belum sepenuhnya dipahami. Struktur 3 dimensi yang kompleks ini menyebabkan sulit untuk diuraikan oleh mikroorganisme dan bahan-bahan kimia. Lignin memberikan kekuatan mekanis dan juga perlindungan untuk tumbuhan itu sendiri (Yokohama, 2008).



Gambar 2.4 Struktur penyusun rantai lignin; (a) Guaiacyl dan (b) Stryngyl. Sumber: (Yokohama, 2008)

Mikroba selulolitik adalah mikroba yang mampu menghasilkan enzim untuk merombak atau menghidrolisis selulosa dan kristalin selulosa. Hidrolisis selulosa melibatkan 3 enzim selulase, yaitu (1) endo-1,4- $\beta$ -D-glukanase yang bekerja secara acak sepanjang rantai selulosa menghasilkan situs baru untuk selobiohidrolase, (2) ekso-1,4- $\beta$ -D-glukan yang bekerja sebagai eksoglukanase

melepas selobiosa sebagai produk utama, dan (3) 1,4- $\beta$ -D-glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Nur *et al.*, 2009)

Keuntungan dari hidrolisis secara enzimatik adalah konversi lebih tinggi, kebutuhan energi lebih rendah dan kondisi operasi yang relatif lebih rendah, menghasilkan produk samping yang minimal selain itu hidrolisis selulosa secara enzimatik adalah proses yang hemat energi dan ramah lingkungan (Devi *et al.*, 2008).

#### 2.4 Protein Sel Tunggal

Protein Sel Tunggal (PST) adalah sel kering yang mana proteinnya dimanfaatkan sebagai suplemen manusia dan makanan hewan. PST berasal dari mikroorganisme yaitu fungi, alga, bakteri dan yeast. Mikroorganisme tersebut dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan biomassa, protein konsentrat atau asam amino dan lemak. PST juga disebut sebagai protein konsentrat alami (Amini, 2011). *S. cerevisiae* dimanfaatkan sebagai salah satu sumber protein dan pakan, selain itu *S. cerevisiae* juga mengandung karbohidrat, lemak dan vitamin B kompleks yang cukup tinggi (Purwitasari *et al.*, 2004).

Tabel 2.1 Mikroorganisme yang digunakan sebagai PST

Kelompok	Contoh Mikroorganisme
Yeast	<i>Candida crusei</i> (Yadav <i>et al.</i> , 2016), <i>Candida tropicalis</i> (Gao <i>et al.</i> , 2012), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Anggelopoulos <i>et al.</i> , 2014)
Bakteri	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> (Kurbanoglu dan Agur, 2002)
Alga	<i>Chlorella pyroneidosa</i> (Waghmare <i>et al.</i> , 2016), <i>Chlorella sorokiana</i> (Safafar <i>et al.</i> , 2016) dan <i>Chlorella spp.</i> (Liu <i>et al.</i> , 2012)
Fungi	<i>Aspergillus niger</i> (Kam <i>et al.</i> , 2012), <i>Aspergillus flavus</i> (Valentino <i>et al.</i> , 2016), <i>Aspergillus oryzae</i> (Ravinder <i>et al.</i> , 2003).

*S. cerevisiae* atau pada umumnya disebut khamir adalah sel yang memiliki ukuran lebih besar daripada bakteri, tetapi khamir yang kecil tidaklah sebesar ukuran bakteri yang berukuran besar. Kisaran lebar khamir adalah 1  $\mu\text{m}$  sampai 5  $\mu\text{m}$  dan kisaran panjang adalah 5  $\mu\text{m}$  sampai 30  $\mu\text{m}$  atau lebih (Pelczar & Chan, 2008). *S. cerevisiae* mempunyai bentuk sel bundar dan berkembang biak secara vegetatif dengan membentuk tunas dan membentuk spora aseksual (Ernawati & Raudah, 2012).

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan *S. cerevisiae* adalah media *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) dan *Yeast Extract Peptone Gliserol* (YEPG). Pada penelitian Angelopoulos (2014), bahwa *S. cerevisiae* dapat tumbuh pada substrat kulit jeruk dan menghasilkan protein sebesar 24%. Tidak menutup kemungkinan bahwa *S. cerevisiae* dapat ditumbuhkan pada media lain seperti limbah kulit buah kopi. Perbedaan bahan utama yang digunakan dalam media pertumbuhan *S. cerevisiae* dapat mempengaruhi jumlah populasi yang tumbuh dikarenakan kandungan unsur karbon yang berbeda (Purwitasari *et al.*, 2004).

## BAB 3. METODE

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dimulai pada bulan Januari 2018 sampai Mei 2018.

### 3.2 Alat dan Bahan

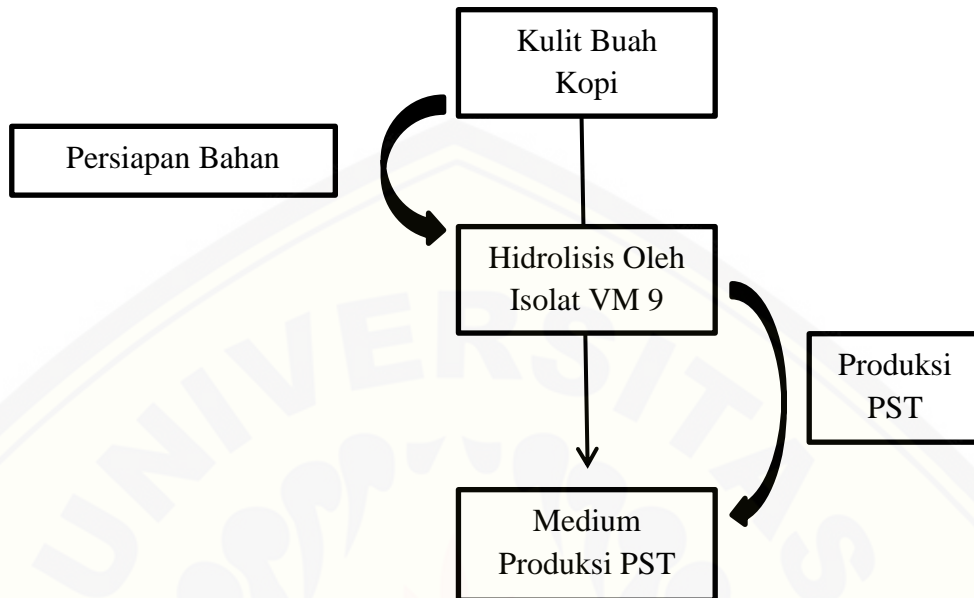
Alat- alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini terdiri dari alat pembuatan media, alat standart sterilisasi, *colony counter*, *haemocytometer* tipe *neubauer improve*, inkubator, *laminar air flow* (LAF), mikroskop, mesin pencacah, pipet ukur, pipet mikro, pH meter, sentrifugator, spektrofotometer, vortex.

Bahan yang digunakan adalah kulit buah kopi Robusta, stok kapang biakan *Pestalotiopsis* sp. VM 9 yang diperoleh dari Penelitian Yuniar (2013), stok isolat biakan *Saccharomyces cerevisiae* dari Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), media YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) agar dan broth, NaCl 1%, subtrat alkali ekstrak kulit lunak buah kopi, buffer fosfat, buffer asetat, akuades, alkohol 70%, akuades 90%, reagen *Somogyi* dan *Nelson* dan larutan NaOH 2 M.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa tahap, yaitu persiapan bahan- bahan penelitian, produksi enzi ekstrak kasar (*crude enzim*), analisis kondisi optimum degradasi kulit lunak buah kopi oleh enzim ekstrakseluler *Pestalotiopsis* sp. berdasarkan kadar gula reduksi menggunakan metode *Somogyi- Nelson*. Berikut adalah rancangan prosedur penelitian

### Rancangan Penelitian



#### 3.3.1 Persiapan Bahan- Bahan Penelitian

a. Persiapan Sampel Kulit Buah Kopi

Persiapan sampel kulit lunak buah kopi adalah mengeringkan sampel pada kondisi kadar air kurang dari 1%, kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling dan disimpan.

b. Peremajaan Sub- kultur *Pestalotiopsis* sp. VM 9 dan *S. cerevisiae*

Peremajaan isolat *Pestalotiopsis* sp. VM9 yaitu menginokulasikan 1 ose biakan *Pestalotiopsis* sp. pada median PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 3 hari. Selanjutnya pembuatan subkultur *S. cerevisiae* dengan menginokulasikan 1 ose biakan *S. cerevisiae* pada media YEPD miring dan diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 3 hari.

c. Pembuatan Subtrat Alkali Ekstrak Kulit Buah Kopi

Pembuatan alkali ekstrak kulit lunak buah kopi adalah mencampurkan 200 gram bubuk kulit lunak buah kopi dalam 160 gram NaOH 2 M dan dilarutkan dalam akuades 1000 ml. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan

*magnetic stir* selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengecekan pH dengan tujuan didapatkan pH netral atau 7 yaitu dengan penambahan asam asetat sedikit demi sedikit. Hasil hidrolisis difiltrasi menggunakan kertas saring sehingga didapatkan filtrat. Selanjutnya, filtrat diekstraksi menggunakan etanol dengan perbandingan etanol dan filtrat adalah 6 : 4. Hasil dari campuran tersebut disentrifugasi sehingga didapatkan pellet dan supernatant. Supernatant dibuang dan diambil pelletnya saja, kemudian dioven pada suhu 50°C selama 24 jam. Ekstrak alkali masih dalam bentuk padatan keras setelah dioven sehingga harus dihaluskan terlebih dahulu agar dapat digunakan dalam penelitian.

d. Pembuatan Medium PST Berbasis Kulit Buah Kopi Jenuh Air

Pada pembuatan medium protein sel tunggal berbasis kulit buah kopi, ditentukan terlebih dahulu kadar air kulit buah kopi. Kulit buah kopi sebanyak 5 gram dimasukkan kedalam kantong teh dan direndam dalam akuades selama 30 menit. Kantong tersebut digantung hingga air tidak menetes, kemudian ditimbang untuk mengetahui berat basahnya. Selanjutnya dioven pada suhu 50°C selama 6 jam dan ditimbang, dilanjutkan dengan dioven kembali pada suhu 50°C selama 6 jam dan ditimbang kembali, sampai hasil yang didapatkan konstan untuk mengetahui berat kering. Hasil selisih dari berat basah dikurangi berat kering merupakan kadar air kulit buah kopi.

Tahap selanjutnya, hasil dari penentuan kadar air tersebut digunakan untuk membuat substrat kulit buah kopi jenuh air. Subtrat kulit buah kopi sebanyak 50 gram dimasukkan kedalam Erlenmeyer 500 ml kemudian ditambahkan air sesuai kadar air yang telah dihitung. Kemudian disterilisasi pada substrat tersebut menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

e. Pembuatan Larutan *Somogyi* dan *Nelson*

Larutan *Somogyi* dan *Nelson* adalah larutan yang digunakan untuk analisis gula reduksi pada ekstrak kasar enzim (*crude enzim*). Pertama adalah pembuatan larutan *Somogyi*, dimana larutan ini dibuat dari 4 macam larutan yang berbeda yaitu larutan A, larutan B, larutan C, dan larutan D. Larutan A yaitu larutan yang komponennya terdiri dari 24 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dan 12 gram pottasium sodium yang telah dilarutkan dalam 240 ml akuades. Larutan B terdiri dari 1 gram

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yang telah dilarutkan dalam 40 ml akuades dan ditambahkan 16 gram  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ . Larutan C adalah hasil campuran dari larutan A dan larutan B, sedangkan larutan D adalah larutan yang dibuat dengan melarutkan 180 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dalam 300 ml akuades dan dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya, larutan C dan larutan D dicampur dan ditambah akuades hingga volume mencapai 1000 ml. Larutan tersebut dipindah ke botol gelap dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Setelah diinkubasi larutan tersebut disimpan pada suhu  $20^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ .

Kedua adalah pembuatan larutan *Nelson*, larutan ini dibuat dari 2 macam larutan yaitu larutan A dan larutan B. Larutan A adalah larutan yang dibuat dari hasil pelarutan 50 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dalam 500 ml akuades yang kemudian ditambah dengan 46 ml sulfanic acid. Larutan B dibuat dari 6 gram  $\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  yang dilarutkan dalam 25 ml akuades. Larutan A dan larutan B dicampur dan ditambah akuades hingga volume mencapai 1000 ml. Larutan tersebut dipindah ke botol gelap dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Setelah diinkubasi larutan tersebut disimpan pada suhu  $20^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ .

f. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standart glukosa diperoleh dari hasil analisis gula reduksi menggunakan metode *Somogyi* dan *Nelson*. Stok glukosa yang diperoleh dibuat menjadi 6 macam seri pengenceran yaitu  $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ , dan  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Reagen *Somogyi* ditambahkan sebanyak 0,5 ml pada setiap seri pengenceran glukosa, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin ditambahkan reagen *Nelson* sebanyak 0,5 ml dan akuades 2,5 ml pada tiap seri pengenceran glukosa. Penentuan kadar gula reduksi dapat diketahui melalui uji spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm sehingga didapat nilai absorbansi. Nilai absorbansi adalah nilai yang digunakan sebagai acuan dalam pembuatan kurva standart glukosa.

g. Pembuatan Kurva Kepadatan Spora

Pada pembuatan kurva kepadatan spora dengan cara ditumbuhkan pada media agar kulit buah kopi alkali 0.1%. Media agar kulit buah kopi alkali 0.1% artinya dalam 0.1 gram ekstrak alkali dan 1.7 gram agar dalam dilarutkan dalam

100 mL akuadest dan dipanaskan diatas hot plate hingga larut. Kemudian media disterilisasi dan diinkubasi selama 3 hari. Selanjutnya dari satu ose isolate kapang umur 3 hari diinokulasikan pada media agar kulit buah kopi alkali 0.1% dan diinkubasi selama 7 hari dengan suhu 30°C. Setiap 24 jam dilakukan perhitungan spora. Perhitungan spora dilakukan dengan menambahkan 1 mL akuades pada tabung biakan isolat dan dikerik menggunakan ose secara perlahan, kemudian dituang kedalam 9 mL akuades steril dan jumlah spora dapat dihitung menggunakan metode *direct counting* haemocytometer dengan rumus:

$$S = \frac{n}{L \times h \times d} \times 10^3$$

Keterangan :

S = jumlah spora

n = rata- rata jumlah spora

L = luas bidang pandang (0,04 mm<sup>2</sup>)

h = kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d = faktor pengenceran (10<sup>-1</sup>)

10<sup>3</sup> = volume suspense yang diambil (μL)

h. Pembuatan Kurva Standart Populasi *S. cerevisiae*

Pembuatan media YEPD padat pada cawan petri untuk peremajaan isolat, YEPD cair pada erlenmeyer sebagai media pertumbuhan dan YEPD cair tanpa inokulum untuk seri pengenceran. Stok isolat *S. cerevisiae* diinokulasikan 1 ose pada media YEPD padat pada cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30°C, kemudian 1 ose koloni tunggal dari stok cawan petri diinokulasikan pada YEPD cair dan diinkubasi shaker selama 3 hari pada suhu 30°C dilakukan seri pengenceran *S. cerevisiae* sebagai berikut:

Kontrol : 0 μL suspensi yeast + 1000 μL YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 5X : 200 μL suspensi yeast + 800 μL YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 4X: 400 μL suspensi yeast + 600 μL YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 3X : 600 μL suspensi yeast + 400 μL YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 2X : 800 μL suspensi yeast + 200 μL YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 0X : 1000 μL suspensi yeast + 0 μL YEPD cair tanpa inokulum



Pada masing- masing pengenceran dihitung jumlah sel menggunakan haemocytometer dengan 3 kali pengulangan, serta dilihat nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Hasil dari perhitungan jumlah sel dan pengukuran absorbansi pada masing- masing pengenceran dibuat grafik hubungan antara keduanya sehingga didapatkan kurva standart populasi *S. cerevisiae*.

### 3.3.2 Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9

#### a. Optimasi Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh *Pestalotiopsis* sp. VM 9

Optimasi hidrolisis dengan cara menginokulasi 1 ml suspensi isolat *Pestalotiopsis* sp. VM 9 yang telah diencerkan dalam 10 ml akuades steril yang telah diinkubasi sesuai waktu inkubasi kepadatan spora pada medium 10 gram substrat kulit buah kopi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari dan dilakukan pemanenan gula reduksi setiap harinya dimulai hari ke- 1 hingga hari ke- 7. Hasil hidrolisis dianalisis gula reduksi menggunakan *Somogyi-Nelson*. Hasil analisis yang diperoleh dibandingkan dengan kurva standart glukosa yang telah dibuat sebelumnya.

#### b. Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9

Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9 diinokulasi pada media substrat kulit buah kopi jenuh air steril sebanyak 50 gram diinokulasikan dengan kapang *Pestalotiopsis* sp. VM 9. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C sesuai dengan waktu inkubasi terbaik yang telah dilakukan pada optimasi hidrolisis kulit buah kopi sebelumnya, selanjutnya disterilkan menggunakan *autoclave* dan dilakukan pemanenan hidrolisat.

#### c. Pemanenan Hidrolisat Hasil Hidrolisi Kulit Buah Kopi

Pemanenan hidrolisat dilakukan dengan menambahkan akuades kedalam hidrolisat dengan perbandingan hidrolisat dan akuades adalah 1:4, kemudian ditambah NaCl 1% dan NaAcide 0,01% dan *dishaker* selama 12 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan filtrasi menggunakan kaca Buchner filter corong sehingga diperoleh hidrolisat. Hidrolisat disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan filtrat dari pelletnya, dan difilter kembali menggunakan minipore filter.

d. Analisis Gula Reduksi dengan Metode *Somogyi-Nelson*

Hidrolisat sebanyak 0.5 ml ditambah 0.5 ml reagen *Somogyi* dan kemudian dididihkan pada penangas air selama 15 menit. Penambahan reagen *Somogyi* untuk menghentikan reaksi enzimatis. Setelah dingin, ditambahkan 0.5 ml reagen *Nelson* yang berfungsi untuk mengikat gula reduksi hidrolisat. Kemudian ditambahkan 2.5 ml akuades dan diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dan panjang gelombang 500 nm. Data absorbansi diplot pada persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva standart glukosa dan selanjutnya dibandingkan dengan larutan standart glukosa.

### 3.3.3 Pertumbuhan *S. cerevisiae* Pada Medium Hidrolisat Kulit Buah Kopi

a. Persiapan Penentuan Konsentrasi Hidrolisat Kulit Buah Kopi dan Waktu Optimum Pertumbuhan PST *S. cerevisiae*.

Isolat *S. cerevisiae* sebanyak 1 ose diinokulasikan pada 20 ml media YEPD cair dan kemudian dishaker 120 rpm, selama 3 hari sampai kultur terlihat keruh. Sebanyak 100 µl dari kultur tersebut diinokulasikan pada hidrolisat kulit buah kopi, kemudian ditambah pepton sebanyak 0.25% dengan variasi konsentrasi yaitu 0x, 2x, 3x, 4x, dan 5x pengenceran dengan 2 kali ulangan. Kultur *S. cerevisiae* pada hidrolisat kulit buah kopi diinkubasi shaker 120 rpm, 3 jam. Pada tiap interval 6 jam diambil sebanyak 500 µl yang digunakan untuk mengukur jumlah sel dan konsumsi gula reduksi dari hidrolisat.

b. Penentuan Konsentrasi Hidrolisat Kulit Buah kopi dan waktu optimum pertumbuhan *S. cerevisiae*.

Kultur *S. cerevisiae* pada variasi konsentrasi dan interval jam diambil sebanyak 100 µl kemudian ditambahkan akuades 900 µl yaitu sama dengan 10 kali pengenceran. Selanjutnya perhitungan populasi dilakukan menggunakan spektrofotometer yang diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 600 nm. Hasil absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan kedalam persamaan dari kurva standart hubungan jumlah populasi *S. cerevisiae* pada spektrofotometer. Selain itu dilakukan juga perhitungan secara langsung dengan *haemocytometer*.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kapang *Pestalotiopsis* sp.VM 9 mampu menghidrolisis kulit buah kopi sehingga menghasilkan hidrolisat. Hidrolisat kulit buah kopi mengandung gula reduksi yang mana telah dibuktikan bahwa hidrolisat tersebut dapat memenuhi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan *S. cerevisiae* untuk tumbuh. Pertumbuhan *S. cerevisiae* mencapai  $8,5 \times 10^6$  sel/ml pada waktu inkubasi dan konsentrasi optimum. Seiring pertumbuhan *S. cerevisiae*, gula reduksi mengalami penurunan hingga jam terakhir inkubasi yaitu 180,44 µg/ml. Gula reduksi yang dimanfaatkan *S. cerevisiae* untuk tumbuh kurang lebih 54% dari total gula reduksi awal yaitu 392,35 µg/ml.

### 5.2 Saran

Untuk mengoptimalkan produksi *S. cerevisiae* pada hidrolisat kulit buah kopi hendaknya dilakukan analisis hidrolisat setelah dilakukan optimasi produksi enzim. Sehingga pada saat produksi enzim skala besar dapat dilakukan tahapan tertentu untuk menyesuaikan kondisi lingkungan optimum untuk pertumbuhan *S. cerevisiae*. Selain itu, dapat dilakukan penambahan senyawa tertentu yang dapat mendukung pertumbuhan *S. cerevisiae* seperti nitrogen, fosfor, dan lain- lain.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat, I. M., & Koutinas, A. A. 2014. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem.* 145, 710–716. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.105
- Amini, Rasoul S. 2011. Single Cell Protein : Production and Process, (May 2014). <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>
- Anjarsari, B., & Effendi, S. 2005. Pembuatan Protein Sel Tunggal dari Limbah Cair Pulp Kakao Oleh *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Infomatek*, 7(2), 93-105
- Arroyo López F. N, Sandi Orlic, Amparo Querol, Eladio Barrio. 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*. 131, 120–127
- Arnata, I. W. 2009. Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Barman, H., Roy, A., & Das, S. K. 2015. Evaluation of plant products and antagonistic microbes against leaf blight (*Alternaria alternata*), a devastating pathogen of tomato. *Trends in Biosciences*, 8(13), 3374–3377. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7391>
- Bonugli-santos, R. C., Maria, R., Vasconcelos, S., & Passarini, M. R. Z. 2015. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications, (April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>
- Bressani R. 1979. The By-Products of Coffee Berries. Di dalam : Braham J E dan Bressani R. (eds.) *Coffee Pulp Composition, Technology, and Utilization*. Institute of Nutrition of Central America and Panama.

- Chubey B.B and Dorrell D. C. 1977. Total Reducing Sugar, Fructose And Glucose Concentrations And Root Yield Of Two Chicory Cultivars As Affected By Irrigation, Fertilizer And Harvest Dates. *can. J. plant Sci.* 5g: 7g9-793
- Devi, M. K., Banu, a R., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V, & Palaniswamy, M. 2008. *Aspergillus niger*. *Journal of Science and Technology*, 1(7), 1–6.
- Elliott, M. L. 2009. Pestalotiopsis ( Pestalotia ) Diseases of Palm 1. *Disease Management*, 1–3.
- Eman El-Argawy. 2015. Characteritaton And Control Of Pestalotiopsis Spp. The Causal Fungus Of Guava Scabby Canker In El-Beheira Governorate, Egypt. *Int. J. Phytopathol.* 04 (03) 2015. 121-136.
- Ernawati, & Raudah. 2012. Pemanfaatan Kulit Kopi Arabika dari Proses Pulping untuk Pembuatan Bioetanol. *Journal of Science and Technology*, 10(21), 12–21.
- Gao, Y., Ki, D., & Liu, Y. 2012. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. *Ann. Microbiol.* 62, 1165–1172.doi: 10.1007/s13213-011-0356-9
- Guava, O. F., Canker, S., & Governorate, I. N. E. 2015. Available Online at ESci Journals, 04(03), 121–136.
- Hatta, U., Sjojfan, O., & Sundu, B. (n.d.). Pengaruh fermentasi kombinasi jamur *Pleurotus ostreatus* dengan *Trichoderma viridae* terhadap kandungan nutrien dan aktivitas enzim selulase bungkil kopra, 24(2), 20–30.
- Held P. Monitoring growth of beer brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Application Note, Monitoring of Cell Suspensions by Kinetic Absorbance Measurements, 2010.
- Heri, D., Yanto, Y., & Tachibana, S. 2016. Utilization of kapok fiber as a natural sorbent in petroleum hydrocarbon biodegradation, 01, 68–73.

- Hermiati, E., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T. C., Suparno, O., & Prasetyo, B. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignosellulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4), 121 - 130.
- Jeewon, R., Liew, E. C. Y., & Hyde, K. D. 2006. Phylogenetic evaluation of species nomenclature *Pestalotiopsis* in relation to host association of. *Fungal Diversity*, 17, 39–55.
- Kam, S., Abedian Kenari, A., & Younesi, H. 2012. Production of single cell protein in stickwater by *Lactobacillus acidophilus* and *Aspergillus niger*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 21, 403–417. doi: 10.1080/10498850.2011.605539
- Khalil, M. 2016. Pengaruh Pemberian Limbah Kulit Kopi (*Coffea Sp.*) Amoniasi Sebagai Pakan Alternatif Terhadap Pertambahan Bobot Ayam Broiler. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*, Volume 1, Issue 1, hal 119-130
- Kurbanoglu, E. B., & Algur, O. F. 2002. Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. *Bioresour. Technol.* 85, 125–129. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00094-9
- Khusna, D. ' J. S. 2015. Pemanfaatan Limbah Padat Kopi Sebagai Bahan Bakar Alternatif Dalam Bentuk Bricket Berbasis Biomass. *Seminar Nasional Sains Dan Teknologi Terapan III*, 247–260.
- Lazarotto, M., Bovolini, M. P., Muniz, M. F. B., Harakawa, R., Reiniger, L. R. S., & dos Santos, A. F. 2014. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 49(6), 440–448. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000600005>
- Liu, B., Li, Y., Song, J., Zhang, L., Dong, J., & Yang, Q. 2014. Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose* 21, 3637–3645. doi: 10.1007/s10570-014-0400-6
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>

- Mandels M, Andreotti R & Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:21-33. 1976.
- Miranti, A. K., Rukmi, I., & Supriyadi, A. 2009. Keanekaragaman Kapang *Aspergillus* pada Serasah Daun Talok ( *Muntingia calabura* L .) di Kawasan Desa Sukolilo Barat , Kecamatan Labang , Kabupaten Bangkalan , Madura The Diversity of *Aspergillus* Mold in Talok Leaf Litter ( *Muntingia calabura* L .) in West S, 98–104.
- Mojsov, Kiro. 2010. Experimental investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus Niger*: Effect of inoculum size and age of spores. *ATI - Applied Technologies & Innovations*. Volume 2 No 2 : 40-46
- Nur, H. S., Meryandini, A., & Hamim. 2009. Pemanfaatan Bakteri Selulolitik dan Xilanolitik yang Potensial untuk Dekomposisi Jerami Padi. *J. Tanah Trop.*, 14(1), 71–80.
- Nurfitriani, S., & Handayanto, E. 2017. Dekomposisi Kulit Kopi Olehbakteri Selulolitik Yang Diisolasi Dari Timbunankulit Kopi Di Perkebunankalibendo, Jawa Timur. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan* Vol 4No 2 : 503-514, 2017 e-ISSN:2549-9793
- Pelczar, Michael J. ECS. Chan. 2008. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Jakarta. UI Press.
- Penaloza WM, Molina MR, Brenes RG, Bressani R. 1985. Solid Substrate Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Applied and Environmental Microbiology* 49 : 388-393.
- Petrik M, Kappeli O, Fiechter A. 1982. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: Involvement of short and long-term regulation. *Journal of General Microbiology* 129: 43-49.
- Pujiyanto. 2007. Pemanfaatan Kulit Buah Kopi dan Bahan Mineral Sebagai Amelioran Tanah Alami. *Pelita Perkebunan*, 23(2)(90), 159–172.

- Purwitasari, E., Pangastuti, A., D., & Setyaningsih, R. 2004. Pengaruh Media Tumbuh terhadap Kadar Protein *Saccharomyces cerevisiae* dalam Pembuatan Protein Sel Tunggal. *Bioteknologi*, 1(2), 37–42. <https://doi.org/10.13057/biotek/c010202>
- Ravinder, R., Venkateshwar Rao, L., & Ravindra, P. 2003. Studies on *Aspergillus oryzae* mutants for the production of single cell proteins from deoiled rice bran. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 243–246.
- Saraswati, R., & Sumarno. 2008. Pemanfaatan Mikroba Penyubur Tanah sebagai Komponen Teknologi Pertanian. *Iptek Tanaman Pangan*, 3, 41–58. Retrieved from <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/ippan/article/view/2649/2288>
- Safar, H., Nørregaard, P. U., Ljubic, A., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. 2016. Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* species cultivated on industrial process water. *J. Mar. Sci. Eng.* 4:84. doi: 10.3390/jmse4040084
- Siswati, N. D., Yatim, M., & Hidayanto, R. 2010. Bioetanol dari Limbah Kulit Kopi dengan Proses Fermentasi. *Journal*, 7–10.
- Sena, A. R. De, Rodrigues, M., Mello, F. De, Cley, T., Leite, C., Moreira, K. A., & Assis, S. A. De. 2014. Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114, 52(4), 459–467.
- Solehah, S.H. 2017. Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh *Trichoderma viridae* dan *Pestalotiopsis* sp. (VM 9) Sebagai Media Pertumbuhan Protein Sel Tunggal *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Skripsi*. Vol (1)
- Rao, R. N. Thakur, M. N. Mithal A. M., & K. S. M. Sastry, Ind. Phytopathol.. 353 . 1982. *Pestalotiopsis versicolor*, 872; 869–872.
- Valentino, M. J. G., Ganado, L. S., & Undan, J. R. 2016. Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate. *Adv. Appl. Sci. Res.* 7, 68–72



- Vieira, É. D., Stupiello, G., & Andrietta, S. R. 2013. Yeast biomass production : a new approach in glucose-limited feeding strategy, 558, 551–558.
- Waghmare, A. G., Salve, M. K., LeBlanc, J. G., & Arya, S. S. 2016. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour. Bioprocess.* 3, 16. doi: 10.1186/s40643-016-0094-8
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Ajila, C. M., Bezawada, J., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2016). Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food Bioprod. Process* 99, 156–165. doi: 10.1016/j.fbp.2016.04.012
- Yokoyama, S. 2008. Buku Panduan Biomassa Asia: Panduan untuk Produksi dan Pemanfaatan Biomassa. *The Japan Institute of Energy*. Retrieved from [http://www.jie.or.jp/biomass/AsiaBiomassHandbook/Indonesian/All\\_I.pdf](http://www.jie.or.jp/biomass/AsiaBiomassHandbook/Indonesian/All_I.pdf)
- Yuniar, W. 2013. *Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik pada Proses Vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)*. *Jurnal skripsi* (Vol. 1).
- Zhang, P. 2006. Involvement of Lignocellulolytic Enzymes in the Decomposition of Leaf Litter in a Subtropical Forest, 53(3), 193–198. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00093.x>

## LAMPIRAN

## Lampiran A. Komposisi Media dan Cara Pembuatannya

A.1 Media *Potato Dektrose Agar (PDA)*

No	Bahan	Jumlah/ Liter
1	Kentang	200 gram
2	Dektrosa	10 gram
3	Agar	17 gram
4	Akuades	1000 ml

Cara pembuatan untuk 250 ml PDA :

1. Menyiapkan *beaker glass* yang telah berisis akuades 250 ml di atas *hot plate*.
2. Menyiapkan bahan yaitu dextrosa 2,5 gram, kentang yang telah dikupas dan dipotong dadu seberat 50 gram, dan agar 4,25 gram.
3. Masukkan potongan dadu kentang kedalam akuades yang telah mendidih, aduk sesekali dan setelah mendidih biarkan 15 menit. Hal ini bertujuan meluruhkan sari- sari kentang.
4. Menyaring air kentang agar diperoleh filtratnya ke dalam *beaker glass*. Setelah itu masukkan bahan yaitu dextrosa dan agar.
5. Memanaskan campuran filtrat, dextrosa dan agar sambil terus diaduk hingga mendidih.
6. Mengangkat medium yang sudah mendidih. Masukkan medium dalam tabung reaksi menggunakan pipet volume 10 ml. Setelah dingin, tutup mulut tabung menggunakan kapas.
7. Melakukan sterilisasi medium menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 lbs atau 1 atm, suhu 121<sup>0</sup>C selama 15- 20 menit.

**A.2 Media *Yeast Extract Peptonet Dextrose (YEPD) Broth dan Agar***

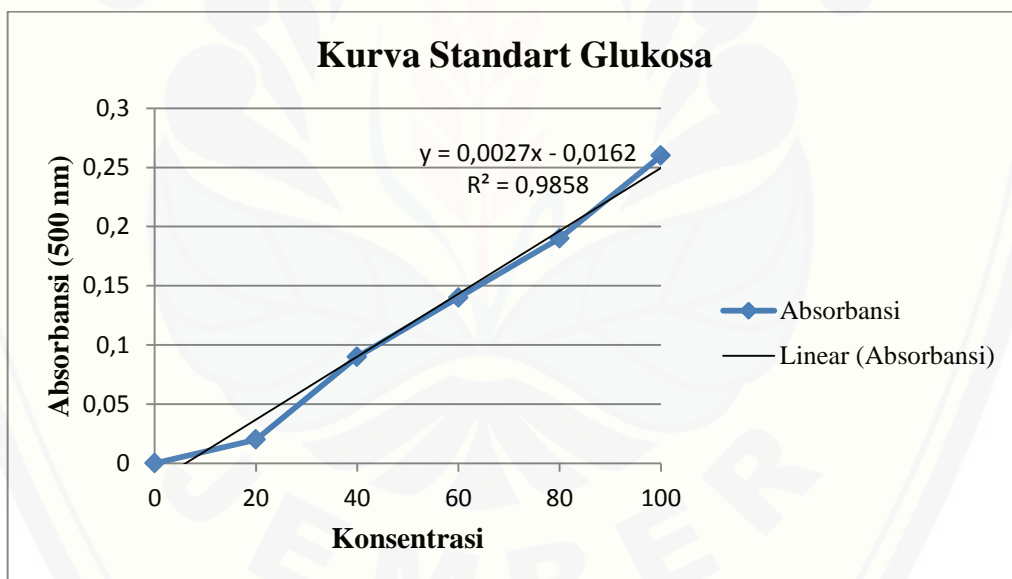
No	Bahan	Jumlah/ Liter
1	Yeast Ekstrak	4,5 gram
2	Pepton	15 gram
3	Dekstrosa	15 gram
4	Agar	11,5 gram
5	Akuades	1000 ml

Cara pembuatan untuk 250 ml YEPD:

1. Menyiapkan *beaker glass* yang telah berisis akuades 250 ml di atas *hot plate*.
2. Menyiapkan bahan yaitu yeast ekstrak 1,125 gram, pepton 3,75 gram, dekstrosa 3,75 gram dan agar 3 gram. Penambahan agar berlaku untuk pembuatan media YEPD agar, sedangkan untuk YEPD broth tidak ditambahkan agar.
3. Masukkan bahan kedalam akuades yang telah mendidih, aduk kembali hingga mendidih.
4. Mengangkat medium yang sudah mendidih. Masukkan medium dalam tabung reaksi menggunakan pipet volume 10 ml. Setelah dingin, tutup mulut tabung menggunakan kapas.
5. Melakukan sterilisasi medium menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 lbs atau 1 atm, suhu 121<sup>0</sup>C selama 15- 20 menit.

**Lampiran B. Kurva Standart Glukosa****B.1 Tabel Standart Glukosa**

Konsentrasi ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Absorbansi (500 nm)
0	0
20	0,02
40	0,09
60	0,14
80	0,19
100	0,26

**C.2 Kurva Standart Glukosa**

**Lampiran C. Kurva Standart Populasi PST****C.1 Tabel Standart Populasi PST**

Absorbansi	Populasi Yeast x 10 <sup>6</sup> (sel/ ml)
0	0
0,159	1,3475
0,19	1,68
0,258	2,025
0,381	2,425
0,446	3,1675

**C.2 Kurva Standart Populasi PST**