

**ABSTRAK DAN EKSEKUTIF SUMMARY  
HIBAH FUNDAMENTAL**



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI LIGNOSELULOLITIK  
TOLERAN KAFEIN SEBAGAI AGEN BIODEGRADASI  
LIMBAH KULIT BUAH KOPI**

**Peneliti**

**Sattya Arimurti, SP., M.Si      0031037401**  
**Dr. Kahar Muzakhar, S.SI      0003056808**

**Fakultas MIPA**

**Didanai DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2014 Nomor: DIPA  
137/SP2H/PL/Dit.Litabmas/II/2015 Tanggal 5 Februari 2015  
Tahun Anggaran 2015**

## ABSTRAK

Limbah kulit buah kopi memiliki potensi yang sangat tinggi karena mengandung lignoselulosa yang sangat tinggi. Salah satu potensi pemanfaatan lignoselulosa pada limbah kulit buah kopi adalah untuk pupuk organik. Pemanfaatan bakteri lignoselulolitik mampu meningkatkan ketersediaan hara pada limbah kulit buah kopi yang dimanfaatkan sebagai pupuk organik. Penggunaan bakteri lignoselulolitik sebagai agen biodegradasi limbah kulit kopi menghadapi permasalahan yaitu kandungan kafein pada limbah kulit buah kopi yang bersifat sebagai antibakteri. Usaha yang dapat dilakukan dengan skrining bakteri lignoselulolitik toleran kafein sebagai agen biodegradasi limbah kulit buah kopi. Pemanfaatan bakteri lignoselulolitik dan pendegradasi kafein ini diharapkan mampu berperan dalam proses dekomposisi limbah kulit buah kopi. Tahapan penelitian ini adalah isolasi dan pemurnian bakteri lignoselulolitik asal limbah kulit buah kopi robusta, karakterisasi toleransi bakteri lignoselulolitik terpilih terhadap kafein dan identifikasi bakteri berdasarkan 16s rRNA. Hasil penelitian sementara menunjukkan diperoleh isolat bakteri lignoselulolitik dari limbah kulit buah kopi robusta dan arabika. Hasil analisis uji ketahanan kafein terhadap 15 isolat lignoselulolitik yang diuji menunjukkan bahwa isolat C11, X18 dan L13 mampu tumbuh subur pada kafein konsentrasi 0,5 % dan semua tidak toleran pada konsentrasi 1 %. Karakterisasi pertumbuhan dan aktivitas enzim dari bakteri lignoselulolitik yang toleran kafein pada media yang mengandung kafein sedang dilakukan. Hasil Identifikasi isolat menunjukkan koloni isolat C11 pada media NA memiliki warna putih, bulat ( $\varnothing$  2 – 4 mm) dan sel bakteri berbentuk batang dan Gram negatif. Morfologi koloni isolat X18 berwarna putih,  $\varnothing$  sekitar 2 mm dengan bentuk sel coccus dan bersifat Gram positif. Isolat H13 memiliki koloni putih dengan  $\varnothing$  sekitar 2 mm dan sel berbentuk batang dan bersifat Gram positif. Hasil analisis 16s rRNA menunjukkan bahwa C11 adalah *Ochrobacterium intermedium*, X18 *Serratia liquefaciens* dan L13 *Stenotrophomonas maltophilia*.

*Kata Kunci : bakteri, lignoselulolitik, kulit buah kopi, kafein*

## **EKSEKUTIF SUMMARY**

### **PENDAHULUAN**

Limbah kulit buah kopi memiliki potensi yang sangat tinggi karena mengandung lignoselulosa yang sangat tinggi. Lignoselulosa dapat digunakan sebagai sumber energi dan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan sebagai biofuel, pakan ternak dan pupuk organik. Komponen lignoselulosa merupakan kompleks dari polimer selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang sulit didegradasi. Kandungan lignoselulose pada kulit kopi meliputi selulosa 17,7 - 29,4 %, hemiselulosa 3,3 %, dan lignin 17,5 - 8,9 % .

Proses biodegradasi lignoselulosa menggunakan bakteri lignoselulolitik mampu meningkatkan ketersediaan hara pada limbah kulit buah kopi yang dimanfaatkan sebagai pupuk organik. Kemampuan bakteri lignoselulolitik untuk mendegradasi lignoselulosa melibatkan beberapa enzim yang memecah lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Enzim utama yang berperan pada degradasi lignin adalah lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase. Kompleks enzim yang mendegradasi selulosa meliputi endoglukanase, eksoglukanase, dan  $\beta$ -glukosidase. Pada polimer hemiselulosa, jika komponen utama adalah xilan maka enzim yang berperan untuk mendegradasi adalah endo- $\beta$ -1,4 xilanase, xilan 1,4- $\beta$ -xilosodase, dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

Selain lignoselulosa, limbah kulit buah kopi mengandung kafein. Kafein merupakan purin alkaloid yang merupakan metabolit sekunder pada tanaman kopi. Kulit buah kopi mengandung kafein sebesar 0,18 – 5.8 %. Kafein mempunyai sifat antibakteri karena memiliki kemampuan untuk melisis sel dinding sel bakteri sehingga bakteri akan mati.

Berdasarkan hal di atas, salah satu langkah penting untuk memanfaatkan limbah kulit buah kopi sebagai pupuk organik yang berkualitas adalah mendegradasi kandungan lignoselulosa pada limbah tersebut. Usaha yang dapat dilakukan dengan skrining bakteri lignoselulolitik toleran kafein sebagai agen biodegradasi limbah kulit buah kopi. Pemanfaatan bakteri lignoselulolitik toleran kafein ini diharapkan mampu berperan dalam proses dekomposisi limbah kulit buah kopi.

## METODE PENELITIAN

### Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini meliputi 3 tahapan yaitu (1) Pengambilan sampel (2) Isolasi bakteri lignoselulolitik, (3) Skining aktivitas bakteri lignoselulolitik, (4) Karakterisasi toleran bakteri lignoselulolitik terhadap kafein dan (4) Identifikasi bakteri berdasarkan 16s rRNA.

### Pengambilan Sampel Limbah Kulit Buah Kopi

Sampel limbah kulit buah kopi diambil dari lokasi pembuangan limbah kulit buah pabrik pengolahan kopi milik PTPN XII Kebun Jampit Bondowoso yang merupakan perkebunan kopi arabika ( $8^{\circ}00'48.84''S$   $114^{\circ}08'06.23''E$ ) dan Kebun Malangsari Banyuwangi yang merupakan perkebunan kopi robusta ( $8^{\circ}21'34.52''S$   $113^{\circ}56'38.76''E$ ). Parameter fisikokimia limbah buah kopi yang dianalisis meliputi suhu (termometer), kadar air, pH (pH meter), kandungan C-organik (Walkey black), N Total (Kjeldahl).

### Isolasi Bakteri Lignoselulolitik

Sebanyak 25 gram limbah kulit buah kopi dimasukkan ke dalam 225ml garam fisiologis steril selanjutnya disebut pengenceran 10<sup>-1</sup>. Selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai pengenceran 10<sup>-6</sup>. Sebanyak 100 µl suspensi bakteri dari pengenceran 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup> dan 10<sup>-5</sup> disebar sebanyak 15 ml media minimal M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 15g/ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/m, NaCl 0.5 g/ml, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g/ml, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/ml, bakto agar 1,6 g/ml) dengan sumber karbon CMC 0,1 % (m/v) (untuk bakteri selulolitik) dan xylan 0,1 % (m/v) (untuk bakteri hemiselulase) dan lignin alkali 0,1 % (v/m) (untuk bakteri lignolitik).

### Karakterisasi Toleran Bakteri Lignoselulolitik terhadap Kafein

Masing-masing dipilih 5 isolat bakteri dari bakteri selulolitik, hemiselulolitik dan lignolitik diuji ketahanan terhadap kafein. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada 5 ml media LB selama 24 jam dan diletakkan pada shaker dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya suspensi bakteri yang tumbuh disamakan kerapatan bakterinya dengan OD 0,2 menggunakan spektrofotometer dengan media LB sebagai blangko. Masing-masing isolat di drop sebanyak 5 µl ke media NA, NA ditambah kafein 0,5 % dan NA ditambah kafein 1%. Perlakuan dilakukan duplo. Diinkubasi selama 3 hari dan diamati pertumbuhan koloninya. Koloni yang tumbuh subur diberi kode ++, yang tumbuh agak subur + dan yang tidak tumbuh -. Dipilih masing-masing 1 isolat bakteri lignoselulolitik yang toleran terhadap kafein untuk uji lanjut.

Analisis pengaruh kafein terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas enzim secara kuantitatif dianalisis dengan menumbuhkan bakteri lignoselulolitik terpilih pada media uji yaitu media spesifik (M9 + CMC / M9 + Xylan / M9 + Lignin ) dan medium spesifik yang ditambah kafein 0,5 %. Isolat terpilih ditumbuhkan pada media NB sampai diperoleh OD 0,2 sebagai stater. Inokulum sebesar 10% (v/v) ditumbuhkan pada media uji 100 ml pada erlenmeyer 250 ml. Setiap 2 hari selama 14 hari diambil suspensi bakteri untuk dianalisis jumlah bakteri menggunakan OD dan aktivitas spesifik bakteri.

### **Analisis Karakter Biokimia, Morfologi dan Identifikasi Bakteri berdasarkan 16s rRNA**

Analisis karakter biokimia isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan Micobact oxid. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 48 jam.

Sebelum dilakukan identifikasi bakteri berdasarkan 16s rRNA isolat bakteri dilakukan pengamatan morfologi makroskopis dan Mikroskopis. Pengamatan morfologi makroskopis dilakukan pada koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media NA selama 24 jam dengan menggunakan mikroskop Olympus IX-51. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pengecatan Gram dan diamati 100x10 menggunakan mikroskop Olympus BX53F.

Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan sekuen 16S rRNA dengan amplifikasi PCR dilakukan menggunakan Primer 16s RNA primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Kondisi sampel untuk PCR senyakin 10 ml adalah aquades steril 3,6 µl, PCR master mix (2x) 5,0 µl, forward primer (10 pmol) 0,2 µl, reverse primer (10 pmol) 0,2 µl dan sampel DNA konsentrasi 50 µg/ml sebanyak 1 µl. Kondisi PCR adalah 95 °C selama 3 menit, selanjutnya 25 siklus 95 °C selama 30 detik, 50 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 1 menit serta diikuti 72 °C selama 8 menit (Woo dkk., 2013).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi Bakteri Lignoselulolitik**

Hasil penelitian diperoleh bakteri lignoselulolitik dan selanjutnya dipilih masing-masing 5 isolat bakteri selulolitik, xylanolitik dan lignolitik. Isolat tersebut meliputi isolat selulolitik (C2, C8, C11, C14, C21), hemiselulolitik (X2, X10, X17, X18, X31) dan lignoselulolitik (L3, L13, L20, L24, L31).

### **Karakterisasi Toleran Bakteri Lignoselulolitik terhadap Kafein**

Karakterisi toleran bakteri lignoselulolitik terhadap kafein dilakukan dengan menggunakan 2 dosis kafein yaitu 0,5 % dan 1 %. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua isolat lignoselulolitik asal limbah kulit buah kopi toleran terhadap kafein.

## **Pengaruh Kafein pada Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua isolat lignoselulolitik asal limbah kulit buah kopi toleran terhadap kafein. Pada tabel dan gambar tersebut menunjukkan bahwa bakteri selulolitik C11, hemiselulolitik X18 dan lignolitik L13 memiliki toleransi pada kafein 0,5 % dengan ditunjukkan kemampuan tumbuh subur pada media tersebut sedangkan isolat C14, C 21, L3, L20, dan L31 mampu tumbuh tetapi tidak subur. Isolat C8 mampu tumbuh terhadap kafein 0.5 % tetapi pertumbuhannya ditunjukkan setelah inkubasi selama 3 hari. Isolat yang lain tidak toleran terhadap kafein yang ditunjukkan kemampuan tumbuh sangat subur pada media Na tetapi pada media NA ditambah kafein 0,5% tidak mampu tumbuh. Hasil penelitian ini menarik karena semua isolat yang diuji berasal dari limbah kulit buah kopi yang mengandung kafein.

Hasil kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa secara umum keberadaan kafein 0,5% pada media mampu menurunkan jumlah sel yang ditunjukkan dengan optidal density (OD 600). Secara umum pola pertumbuhan bakteri C11, X18 dan L13 pada media yang tidak mengandung kafein menunjukkan pada hari ke 0 sampai hari ke 4 menunjukkan fase logaritmik (fase pertumbuhan) dan setelah hari ke 4 sampai hari ke 7 menunjukkan fase stasioner. Pola pertumbuhan bakteri mirip pada media yang ditambah kafein 5%, tetapi pada media ditambah kafein jumlah selnya lebih rendah.

keberadaan kafein 0,5% mampu menurunkan aktivitas enzim dibandingkan pada media tanpa kafein. Penurunan aktivitas ini dapat terjadi karena seiring dengan penurunan jumlah sel karena keberadaan kafein pada media. Belum ada referensi yang menjelaskan bagaimana kafein mampu menghambat aktivitas enzim tersebut, sehingga perlu adanya kajian lebih lanjut.

## **Sifat Biokimia dan Identifikasi Bakteri C11, X18 dan L13**

Hasil uji Biokimia menggunakan Microbact kit menunjukkan bahwa isolat yang diuji memiliki kemampuan enzim maupun kemampuan menfermentasi karbohidrat berbeda (tabel 4). Bakteri selulolitik C11 tidak memiliki enzim lisin dekarboksilase, Ornitin decarboksilase dan tidak mampu menfermentasi glukosa, manitol dan xilosa. Bakteri ini juga tidak mampu menghasilkan H<sub>2</sub>S, indol dan acetoin, tetapi mampu menghidrolisis o-nitrophenyl-β-d-galactopiranoside (ONPG) dan urea. Bakteri xilanolitik X18 mampu menghasilkan enzim lisin dekarboksilase, memfermentasi glukosa, manitol dan xilosa serta mampu menghidrolisis ONPG dan urea. Sifat biokimia lainnya adalah bakteri ini tidak mampu menghasilkan enzim ornitin decarboksilase, memroduksi H<sub>2</sub>S dan indol dan indol pirufat. Bakteri lignolitik L13 walaupun sama Gram positif dengan bakteri xilanolitik tetapi memiliki karakter biokimia

yang berbeda. Bakteri L13 memiliki enzim lisin dekarboksilase dan Ornitin dekarboksilase. Seperti bakteri selulolitik C11 bakteri ini tidak mampu menfermentasi glukosa, manitol dan xilosa. Berbeda dengan bakteri X18, bakteri L13 tidak mampu memproduksi H<sub>2</sub>S dan indol dan indol piruvat serta tidak mampu memanfaatkan sitrat. Bakteri ini mampu menghidrolisis ONPG tetapi tidak mampu menghidrolisis urea.

Hasil isolasi 16s rRNA menunjukkan bahwa diperoleh panjang sekuen untuk C11 sebesar 994 base pair (bp), X18 sebesar 772 bp dan L13 sebesar 1412. Berdasarkan analisis blast menunjukkan bahwa isolat C11 memiliki homologi 92 % dengan parsial gen 16s rRNA *Ochrobacterium intermedium* NSB-10 dengan kualitas 93% sedangkan X18 memiliki homologi 96 % dengan parsial gen 16s rRNA *Klebsiella oxytoca* NFS118 dengan kualitas hanya 7 %. Berbeda dengan 2 isolat yang lain, hasil sekuensing isolat L13 memiliki homologi 99 % dengan kualitas 100 % dengan gen 16s rRNA *Stenotrophomonas maltophilia* L1.(Tabel 5). Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa hasil sekuensing untuk isolat C11 dan X18 perlu dikonfirmasi lagi untuk mendapatkan nilai homologi 99 % dan hanya isolat L13 yang dapat dilakukan untuk pembuatan pohon pilogeni.

### **Manfaat penelitian**

Berdasarkan penelitian ini diperoleh bakteri lignoselulolitik yang bersifat toleran kafein asal limbah kulit kopi. Isolat ini dapat digunakan sebagai agen potensial untuk biodegradasi limbah kulit kopi