

**FERMENTASI KOPI ARABIKA MENGGUNAKAN BAKTERI  
ASAM LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK (*Paradoxurus  
hermaphroditus*)**

*ARABICA COFFEE FERMENTATION USING LACTIC ACID  
BACTERIA OF LUWAK (*Paradoxurus hermaphroditus*)  
DIGESTIVE ORIGIN*

**FITRI**

**P013181016**



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

**FERMENTASI KOPI ARABIKA MENGGUNAKAN BAKTERI ASAM  
LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK (*Paradoxurus  
hermaphroditus*)**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

FITRI

P013181016

kepada

**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

**DISERTASI****FERMENTASI KOPI ARABIKA MENGGUNAKAN BAKTERI ASAM  
LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK (*Paradoxurus  
hermaphroditus*)**

Disusun dan diajukan oleh

**FITRI****NIM P013181016**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Doktor Program Studi Ilmu Pertanian  
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 01 Maret 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Promotor,

  
**Prof. Dr. Ir. Abu Bakar Tawali**  
**NIP 19630702 198811 1 001**

Co-promotor,

  
**Prof. Dr. Ir. Amran Laga, M.Si**  
**NIP 19621231 198803 1 020**

Co-promotor,

  
**Dr. Zaraswati Dwyana Zainuddin, M.Si**  
**NIP 19651209 199008 2 001**Ketua Program Studi  
Ilmu Pertanian,  
**Prof. Dr. Ir. Darmawan Salman, MS**  
**NIP 19630606 198803 1 004**Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin,  
**Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc**  
**NIP 19670308 199003 1 001**

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul "Fermentasi Kopi Arabika Menggunakan Bakteri Asam Laktat Asal Pencernaan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*)" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Dr. Ir. Abu Bakar Tawali, Prof. Dr. Ir. Amran Laga, M.Si, dan Dr. Zaraswati Dwyana Zainuddin, M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian data yang terkait dengan disertasi ini telah dipublikasikan pada jurnal Food Research, 5(3): 60-64, [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(3\).637](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(3).637) dengan judul "Composition of Amino Acids and Fatty Acids on Luwak Coffee Processing". Artikel kedua dipublikasikan pada jurnal Advances in Animal and Veterinary Sciences, 9(10): 1649-1654, <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1649.1654> dengan judul "Enzyme Activity Assay of Lactic Acid Bacteria from Civet (*Paradoxurus hermaphroditus*) Digestive Tract". Artikel ketiga dipublikasikan pada jurnal International Journal of Agriculture & Biology, 26(6): 717-721, DOI: [10.17957/IJAB/15.1887](https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1887) dengan judul "Identification of Lactic Acid Bacteria from Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) Gastrointestinal Tract".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 01 Maret 2022,



FITRI

NIM P013181016

## UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim, puji dan syukur yang tiada henti penulis haturkan kehadiran Allah Subhanahu wa Ta'ala atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga penulis mampu menyelesaikan serangkaian tahapan penelitian serta penulisan disertasi yang berjudul **Fermentasi Kopi Arabika Menggunakan Bakteri Asam Laktat Asal Pencernaan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*)**.

Terdapat banyak kendala dan tantangan yang dihadapi oleh penulis dalam proses penyelesaian studi serta penyusunan disertasi ini. Namun, atas berbagai bantuan, arahan dan dorongan dari berbagai pihak, akhirnya disertasi ini dapat terselesaikan. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh jenjang pendidikan doktor melalui program Beasiswa Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU).
2. Prof. Dr. Ir. Abu Bakar Tawali sebagai promotor, Prof. Dr. Ir. Amran Laga, M.Si. dan Dr. Zaraswati Dwyana Zainuddin, M.Si. sebagai Co-Promotor yang senantiasa membimbing, mendorong, serta mencurahkan perhatiannya kepada penulis sejak awal hingga terselesaikannya disertasi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta, Dr.rer.nat Zainal, STP., M.Food.Tech, Prof. Dr. Ir. Jumriah Langkong, MP., dan Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. serta Prof. Dr. Ir. Nuri Andarwulan, M.Si. sebagai penguji atas masukan dan saran yang diberikan kepada penulis
4. Rektor Universitas Hasanuddin, Dekan Sekolah Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin, Ketua Program Studi, serta seluruh staf akademik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
5. Juniati binti Lukman, S.Si., M.Biomed, Dr. Reta, S.TP. M.Si dan Fuad Gani S.Si. yang telah memberikan banyak saran serta bantuan kepada penulis dalam proses pelaksanaan penelitian.

6. Orang tua penulis, ayahanda tercinta Hamzah Husain dan ibunda terkasih Suparmi Agus, serta saudara-saudara penulis yang selalu memberikan dukungan serta doa tulus kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan studi dengan baik.
7. Suami penulis tercinta, Nasrullah, S.I.P., M.I.P yang senantiasa memberikan dukungan, doa, semangat, serta mendampingi penulis dalam proses penyelesaian penelitian, penyusunan disertasi, dan penyelesaian studi
8. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis baik pada proses penyelesaian studi, penelitian, maupun penyusunan disertasi ini yang tidak dapat penulis tuliskan satu persatu.

Akhir kata, semoga apa yang penulis laporkan dalam disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak khususnya dalam pengembangan ilmu pangan.

Makassar, 01 Maret 2022

Fitri

## ABSTRAK

**FITRI.** *Fermentasi Kopi Arabika Menggunakan Bakteri Asam Laktat Asal Pencernaan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*)* (dibimbing oleh **Abu Bakar Tawali, Amran Laga, dan Zaraswati Dwyana Zainuddin**)

Kopi luwak merupakan salah satu kopi termahal dunia khas Indonesia. Kopi luwak asli memiliki beberapa kelemahan sehingga diperlukan alternatif untuk menghasilkan kopi luwak yaitu produksi kopi menggunakan bakteri asam laktat yang diperoleh dari pencernaan luwak.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh mikroba potensial dari pencernaan binatang luwak, memperoleh kondisi optimum fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal luwak, serta mengetahui profil kimia serta aroma kopi yang difermentasi menggunakan bakteri asam laktat asal luwak.

Penelitian ini terdiri dari empat tahapan yaitu: (1) Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat asal pencernaan luwak (2) Uji aktivitas enzim isolat asal pencernaan luwak (3) Pembuatan starter kering kopi luwak (4) Fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal pencernaan luwak

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Leuconostoc pseudomesenteroides* MG5216, *Lactobacillus plantarum* CAU:227, *Lactobacillus plantarum* IMAU20905, *Weissella cibaria* MG5327, *Leuconostoc pseudomesenteroides* L12001, *Leuconostoc pseudomesenteroides* CF102, dan *Leuconostoc pseudomesenteroides* Ni1324 merupakan bakteri asam laktat yang dapat diperoleh dari pencernaan binatang luwak. Isolat bakteri asam laktat hasil pencernaan luwak mampu menghasilkan enzim protease, lipase, dan selulase dengan tingkat aktivitas enzim yang berbeda-beda. Komposisi bahan yang terdiri dari 2% kulit kopi, 1,5% glukosa, 1% pepton, 5% mineral (0,5% MgSO<sub>4</sub>; 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01% FeSO<sub>4</sub>), 10% maltodekstrin dan 30% tepung beras dapat digunakan sebagai formulasi dalam pembuatan starter kering kopi luwak. Penggunaan starter 1% dengan lama fermentasi 18 jam merupakan kondisi optimum fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal luwak. Kopi BAL luwak yang dihasilkan memiliki nilai *cupping test* 86,52 serta komponen aroma sebanyak 238 senyawa. Kopi BAL luwak memiliki kadar air 7,44%, kadar abu 4,22%, kadar lemak 7,30%, protein 7,13%, karbohidrat 81,36%, total gula 20,42%, dan kafein 0,98%

**Kata Kunci:** *kopi luwak, bakteri asam laktat, starter, fermentasi*

## ABSTRACT

**FITRI.** *Arabica Coffee Fermentation Using Lactic Acid Bacteria of Luwak (Paradoxurus hermaphroditus) Digestive Origin* (supervised by **Abu Bakar Tawali, Amran Laga, and Zaraswati Dwyana Zainuddin**)

Luwak coffee is Indonesian coffee that has become one of the most expensive coffees globally. The original luwak coffee has several weaknesses, so an alternative is needed to produce luwak coffee, namely coffee fermentation using lactic acid bacteria from luwak digestion.

This study aims to obtain potential microbes from the digestion of luwak animals, obtain optimum conditions for coffee fermentation using lactic acid bacteria from the luwak, and determine the chemical profile and aroma of coffee fermented using lactic acid bacteria from the luwak.

This study consisted of four stages, namely: (1) Isolation and characterization of lactic acid bacteria from luwak digestion (2) Enzyme activity assay of isolates from luwak digestion (3) Making dry starter of luwak coffee (4) Fermentation of coffee using lactic acid bacteria from luwak digestion.

The result showed that *Leuconostoc pseudomesenteroides* MG5216, *Lactobacillus plantarum* CAU:227, *Lactobacillus plantarum* IMAU20905, *Weissella cibaria* MG5327, *Leuconostoc pseudomesenteroides* L12001, *Leuconostoc pseudomesenteroides* CF102, and *Leuconostoc pseudomesenteroides* Ni1324 were lactic acid bacteria that could be obtained from the digestion of luwak animal. Lactic acid bacteria isolated from luwak digestion were able to produce protease, lipase, and cellulase enzymes with different enzyme activity levels. The composition of 2% coffee husk, 1,5% glucose, 1% peptone, 5% minerals (0,5% MgSO<sub>4</sub>; 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01% FeSO<sub>4</sub>), 10% maltodextrin and 30% rice flour can be used as a formulation in making dry starter of luwak coffee. Using 1% starter with 18 hours of fermentation is the optimum condition for coffee fermentation using lactic acid bacteria from luwak. The LAB luwak coffee has a cupping test value of 86.52 and 238 aroma compounds. The LAB luwak coffee has 7.44% water content, 4.22% ash content, 7.30% fat content, 7.13% protein, 81.36% carbohydrates, 20.42% total sugar, and 0.98% caffeine.

**Keywords:** *luwak coffee, lactic acid bacteria, starter, fermentation*

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN PENGANTAR .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN UMUM .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.4. Kegunaan Penelitian .....	5
1.5. Kebaruan Penelitian .....	5
1.6. Kerangka Penelitian .....	6
1.7. Tahapan Penelitian .....	7
BAB II. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK.....	10
2.1. Latar Belakang .....	10
2.2. Metode Penelitian .....	11
2.3. Hasil dan Pembahasan .....	16

2.4. Kesimpulan .....	22
BAB III. UJI AKTIVITAS ENZIM BAKTERI ASAL PENCERNAAN LUWAK ..	24
3.1. Latar Belakang .....	24
3.2. Metode Penelitian .....	25
3.3. Hasil dan Pembahasan .....	28
3.4. Kesimpulan .....	32
BAB IV. PEMBUATAN STARTER KERING KOPI LUWAK .....	34
4.1. Latar Belakang .....	34
4.2. Metode Penelitian .....	35
4.3. Hasil dan Pembahasan .....	38
4.4. Kesimpulan .....	44
BAB V. FERMENTASI KOPI MENGGUNAKAN BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK .....	45
5.1. Latar Belakang .....	45
5.2. Metode Penelitian .....	46
5.3. Hasil dan Pembahasan .....	54
5.4. Kesimpulan .....	82
BAB VI. PEMBAHASAN UMUM .....	83
BAB VII. PENUTUP .....	86
8.1. Kesimpulan .....	86
8.2. Saran .....	86
DAFTAR PUSTAKA .....	88
LAMPIRAN .....	98

## DAFTAR GAMBAR

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1.1. Kerangka konseptual penelitian .....	6
1.2. Diagram alir tahapan penelitian .....	8
2.1. Diagram alir prosedur identifikasi bakteri asam laktat asal pencernaan luwak .....	13
2.2. Pertumbuhan bakteri asam laktat pencernaan binatang luwak pada media MRSA + CaCO <sub>3</sub> .....	17
2.3. Hasil pengecatan gram bakteri asam laktat secara mikroskopis .....	18
2.4. Hasil amplifikasi DNA isolat dengan primer 63F dan 1387R .....	20
2.5. Pohon filogenetik isolat asal pencernaan binatang luwak .....	22
3.1. Kurva standar tirosin .....	28
3.2. Aktivitas enzim protease bakteri asam laktat yang diisolasi dari luwak .....	29
3.3. Aktivitas enzim lipase bakteri asam laktat yang diisolasi dari pencernaan binatang luwak .....	30
3.4. Kurva standar glukosa .....	31
3.5. Aktivitas enzim selulase bakteri asam laktat yang diisolasi dari luwak .....	32
4.1. Diagram alir peremajaan isolat BAL .....	36
4.2. Diagram alir propagasi bakteri .....	37
4.3. Diagram alir pembuatan starter kering kopi .....	38
4.4. (a) Granula pati secara mikroskopis (b) Granula pati yang berisi bakteri secara mikroskopis (1450x) .....	41
4.5. Starter kering kopi luwak .....	42
5.1. Prosedur fermentasi kopi BAL luwak .....	48
5.2. Hasil analisis total asam laktat kopi BAL luwak .....	55
5.3. Nilai pH kopi BAL luwak .....	56

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
2.1. Hasil pengamatan morfologi bakteri asam laktat asal pencernaan luwak .....	18
2.2. Hasil pengujian ketahanan BAL terhadap keasaman dan garam empedu .....	19
2.3. Hasil BLAST data sekuensing .....	21
4.1. Perhitungan jumlah koloni starter cair kopi .....	40
4.2. Perhitungan jumlah koloni starter kering kopi.....	43
5.1. Hasil <i>cupping test</i> kopi fermentasi .....	57
5.2. Hasil analisa proksimat, total gula, dan kafein green bean kopi fermentasi .....	58
5.3. Hasil identifikasi komponen aromatik kopi Arabika natural (A02) .....	60
5.4. Hasil identifikasi komponen aromatik kopi Arabika luwak asli (A01) ....	66
5.5. Hasil identifikasi komponen aromatik kopi Arabika BAL luwak (A1B3)	72
5.6. Komponen aromatik kopi arabika natural, arabika luwak asli, dan arabika BAL luwak.....	79
5.7. Perbandingan komponen aromatik kopi arabika natural, arabika luwak asli, dan arabika BAL luwak.....	80

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Data hasil analisis, ANOVA, dan uji tuckey enzim protease isolat BAL .	98
2. Data hasil analisis, ANOVA, dan uji tuckey enzim selulase isolat BAL ..	100
3. Data hasil analisis, ANOVA, dan uji tuckey enzim lipase isolat BAL .....	102
4. Data hasil analisis, ANOVA, dan t-test total asam laktat kopi fermentasi .....	104
5. Data hasil analisis, ANOVA, dan t-test ph kopi fermentasi .....	110
6. Hasil analisis komposisi kimia, ANOVA, dan uji tuckey kopi fermentasi .....	116
7. Hasil GC-MS senyawa aromatik kopi arabika luwak asli (A01) .....	121
8. Hasil GC-MS senyawa aromatik kopi arabika natural (A02) .....	122
9. Hasil GC-MS senyawa aromatik kopi arabika BAL luwak (A1B3) .....	123
10. Dokumentasi penelitian .....	124

# BAB I

## PENDAHULUAN UMUM

### 1.1. Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu produk pertanian yang menempati posisi penting dalam dunia perdagangan internasional. Konsumsi kopi dunia dalam kurun waktu 5 tahun terakhir terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Berdasarkan data yang dikeluarkan oleh *International Coffee Organization* (ICO), konsumsi kopi dunia pada tahun 2020-2021 mencapai 166,34 juta / 60 kg bags kopi dengan laju pertumbuhan majemuk tahunan mencapai 1% (ICO, 2021).

Indonesia memiliki peranan penting pada perdagangan kopi internasional. Posisi geografis Indonesia yang beriklim tropis menyebabkan tanaman kopi dapat tumbuh dengan baik dan menyebabkan Indonesia menjadi salah satu pengeksport terbesar dunia (ICO, 2021). Kondisi iklim yang demikian juga menyebabkan Indonesia dapat memproduksi kopi dengan berbagai varietas.

Terdapat sekitar 70 varietas kopi di seluruh dunia, akan tetapi hanya tiga jenis saja yang dibudidayakan dan diperdagangkan secara global yaitu *Coffea arabica* (kopi arabika, produksi mencapai 70% jumlah kopi dunia), *Coffea canephora* (kopi robusta, produksi mencapai 20% jumlah kopi dunia), dan *Coffea liberica* (produksi <1% jumlah kopi dunia) (Belitz *et al.*, 2009).

Kopi arabika dan robusta memiliki beberapa perbedaan baik dari segi fisik maupun kimianya. Biji kopi arabika berbentuk oval memanjang, sedangkan biji kopi robusta berbentuk bulat. Ukuran biji kopi arabika cenderung lebih besar bila dibandingkan dengan kopi robusta. Kandungan kafein dalam kopi arabika berkisar antara 0,8-1,4%, sedangkan pada robusta berkisar antara 1,7-2,5% (Mastin, 2019). Adapun dari preferensi rasa, kopi arabika lebih diminati oleh konsumen dibandingkan dengan kopi robusta sebab rasanya yang tidak terlalu pahit serta memiliki cita rasa yang kompleks (De Castro dan Marraccini, 2006).

Dibutuhkan serangkaian tahapan untuk mengolah buah kopi segar menjadi minuman kopi. Tahapan tersebut dimulai dari pemanenan, proses pengolahan, pengeringan, penyangraian, hingga penyeduhan. Diantara tahapan tersebut, tahapan pengolahan biji kopi yang paling penting diperhatikan untuk menghasilkan biji kopi yang berkualitas. Pada pengolahan kopi, terjadi proses

fermentasi yang dapat menghasilkan berbagai senyawa pembentuk aroma dan cita rasa kopi (Poltronieri dan Rossi, 2016). Secara umum terdapat tiga metode pengolahan biji kopi, yaitu : *wet process* (proses basah), *dry process* (proses kering), dan *semi-dry process* (proses semi-kering). Pada *wet process*, biji kopi yang telah dikupas kulitnya direndam pada air hingga lapisan lendirnya terlepas. Adapun *dry process*, buah kopi yang sudah dipetik langsung dikeringkan menggunakan matahari. Sedangkan *semi-dry process* hampir mirip dengan *wet process*, perbedaannya adalah air hanya digunakan untuk membersihkan kopi (Karim *et al.*, 2019).

Terdapat teknik pengolahan biji kopi yang tidak lazim selain dari proses pengolahan yang umumnya digunakan oleh petani kopi di seluruh dunia, yaitu pengolahan kopi menggunakan binatang luwak. Kopi yang dihasilkan dari proses tersebut dikenal dengan nama Kopi Luwak. Kopi luwak merupakan kopi yang diproduksi dari hasil pencernaan mamalia jenis luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). Binatang tersebut memiliki kemampuan untuk memilih kopi yang telah matang sempurna untuk kemudian dikonsumsi. Selama proses pencernaan hanya kulit kopi saja yang dicerna sedangkan biji kopi ikut keluar bersama dengan kotoran. Biji kopi yang dihasilkan memiliki aroma dan cita rasa yang sangat unik yang sangat diminati oleh konsumen (Marccone, 2004). Kopi luwak menjadi kopi khas Indonesia yang terkenal secara global. Oleh karena cita rasa dan prosesnya yang unik, kopi tersebut menjadi salah satu kopi termahal dunia. Harga kopi tersebut bisa mencapai \$600/pound di pasar global (Stock, 2021)

Cita rasa dan aroma yang unik pada kopi luwak dihasilkan melalui fermentasi berbagai jenis mikroba dan enzim yang terjadi di dalam pencernaan binatang luwak. Bakteri Asam Laktat (BAL) telah diidentifikasi sebagai mikroba yang dominan berada pada sistem pencernaan binatang luwak. Mikroba tersebut berada pada lambung, usus besar, dan usus halus binatang luwak (Suhandono *et al.*, 2016). Bakteri asam laktat merupakan jenis mikroba yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan berbagai jenis enzim yang dapat menghasilkan berbagai komponen aroma melalui suatu jalur biosintesis seperti *diacetyl*, *acetoin*, *acetaldehyde* serta *acetic acid* (Van Kranenburg *et al.*, 2002).

Keunikan asal usul serta cita rasa yang dimiliki oleh kopi luwak menjadikan permintaan kopi luwak meningkat setiap tahunnya. Meningkatnya permintaan akan kopi luwak menyebabkan usaha budidaya binatang luwak juga meningkat.

Hal tersebut dapat menyebabkan terancamnya kelestarian luwak liar di alam (Schmidt-Burbach *et al.*, 2014). Selain itu masyarakat umum masih sering meragukan perihal kehalalan dan ke higienisan kopi yang dihasilkan dari kotoran binatang luwak. Oleh karena itu diperlukan suatu upaya untuk memproduksi kopi dengan cita rasa yang unik seperti kopi luwak namun dengan proses yang lebih ramah lingkungan, efektif, efisien dan tentunya dapat diterima oleh masyarakat luas.

Alternatif produksi kopi yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan fermentasi kopi tanpa menggunakan tubuh binatang luwak. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan bakteri asam laktat asal pencernaan luwak pada sebuah fermentor. Beberapa penelitian terkait hal tersebut sudah dikembangkan. Guntoro (2010) melakukan fermentasi kopi menggunakan bakteri *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacterium sp.* yang diisolasi dari pencernaan binatang luwak. Fermentasi dilakukan dalam 2 tahap, yaitu fermentasi menggunakan *Lactobacllus sp.* selama 5-8 hari pada tahap pertama, dan fermentasi menggunakan *Bifidobacterium sp.* selama 5-8 hari pada tahap kedua. Kopi yang dihasilkan menggunakan metode tersebut memiliki nilai *cupping test* yang cukup tinggi yaitu 8,21-8,25. Meskipun berhasil menghasilkan kopi dengan cita rasa yang baik, tapi metode fermentasi yang digunakan sangat tidak efisien. Waktu yang digunakan untuk menghasilkan kopi adalah sekiiar 16 hari. Padahal kopi luwak asli hanya membutuhkan waktu 10-12 jam untuk produksinya.

Penelitian terkait fermentasi kopi luwak tanpa menggunakan tubuh binatang luwak juga dilakukan oleh Rubiyo dan Towaha (2013) dengan melakukan fermentasi kopi robusta menggunakan bakteri probiotik yang diisolasi dari pencernaan binatang luwak. Fermentasi juga dilakukan secara bertahap selama 6 hari pada tahap pertama dan 6 hari pada tahap kedua. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kopi yang dihasilkan hanya memiliki nilai total *cupping test* sebesar 79,92. Selain kualitas cita rasa kopi yang dihasilkan tidak terlalu tinggi, proses produksinya juga membutuhkan waktu yang lama sehingga tidak efisien.

Penelitian selanjutnya dilakukan oleh Usman *et al.*, (2015). Usman *et al.*, (2015) melakukan isolasi bakteri yang diduga bakteri asam laktat dari feses binatang luwak dan melakukan fermentasi kopi menggunakan isolat tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan kafein dan pH pada kopi yang difermentasi.

Penelitian lain dilakukan oleh Fauzi *et al.*, (2016) dengan melakukan fermentasi menggunakan starter kopi luwak. Starter kopi dibuat dengan menggunakan bakteri yang diduga sebagai bakteri asam laktat yang diisolasi dari feses binatang luwak. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan variasi perlakuan starter 0,5%, 1,5%, dan 2,5% dengan lama fermentasi 8, 16, dan 24 jam. Perlakuan terbaik diperoleh pada perlakuan konsentrasi starter 0,5% dengan lama fermentasi 16 jam. Kopi yang dihasilkan memiliki nilai *cupping test* sebesar 7 dan menghasilkan komponen flavor sebanyak 59-72 komponen.

Pembuatan starter kopi dari pencernaan luwak seperti yang dilakukan oleh Fauzi *et al.*, (2016) merupakan langkah awal yang baik untuk melakukan fermentasi kopi luwak tanpa menggunakan tubuh binatang luwak. Perlu dilakukan pengadaptasian terlebih dahulu terhadap bakteri yang akan digunakan untuk fermentasi sebab perubahan lingkungan yang ekstrim dapat menyebabkan kematian bakteri (Rampelotto, 2010). Informasi spesifik mengenai jenis bakteri yang akan dibuat starter sangat penting untuk diketahui. Hal tersebut dapat membantu dalam membuat formulasi starter yang akan digunakan untuk fermentasi kopi.

Berdasarkan pemaparan di atas maka penelitian mendalam mengenai fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal pencernaan luwak dilakukan. Pada penelitian ini bakteri dari pencernaan binatang luwak tidak hanya diisolasi, melainkan diidentifikasi secara spesifik sampai ke tingkat spesies. Selain itu, kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim-enzim yang bermanfaat dalam fermentasi kopi juga akan dianalisa. Bakteri-bakteri terpilih selanjutnya akan dibuat menjadi starter dan digunakan untuk fermentasi kopi. Penelitian menyeluruh yang dilakukan pada penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan kopi luwak tanpa menggunakan tubuh binatang luwak dengan kualitas produk yang lebih baik dari penelitian-penelitian yang sudah ada serta dengan proses fermentasi yang lebih efisien.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Proses fermentasi kopi luwak tanpa menggunakan tubuh binatang luwak dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba pencernaan luwak sebagai starter. Sistem pencernaan merupakan tempat yang paling banyak ditumbuhi oleh mikroorganisme dibandingkan dengan organ yang lain. Akan tetapi, tidak

semua mikroba tersebut dapat dimanfaatkan untuk fermentasi biji kopi. Untuk memperoleh mikroba tersebut perlu dilakukan isolasi dan seleksi mikroba sehingga hanya mikroba potensial yang diperoleh. Fermentasi yang berlangsung perlu dilakukan secara optimal dengan mengadaptasi kondisi di dalam pencernaan sehingga dapat menghasilkan biji kopi yang berkualitas

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini yaitu :

1. Untuk memperoleh mikroba potensial dari pencernaan binatang luwak yang dapat digunakan untuk fermentasi kopi.
2. Untuk memperoleh kondisi optimum fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal luwak.
3. Untuk mengetahui profil kimia dan aroma kopi yang difermentasi menggunakan bakteri asam laktat asal pencernaan luwak.

### **1.4. Kegunaan Penelitian**

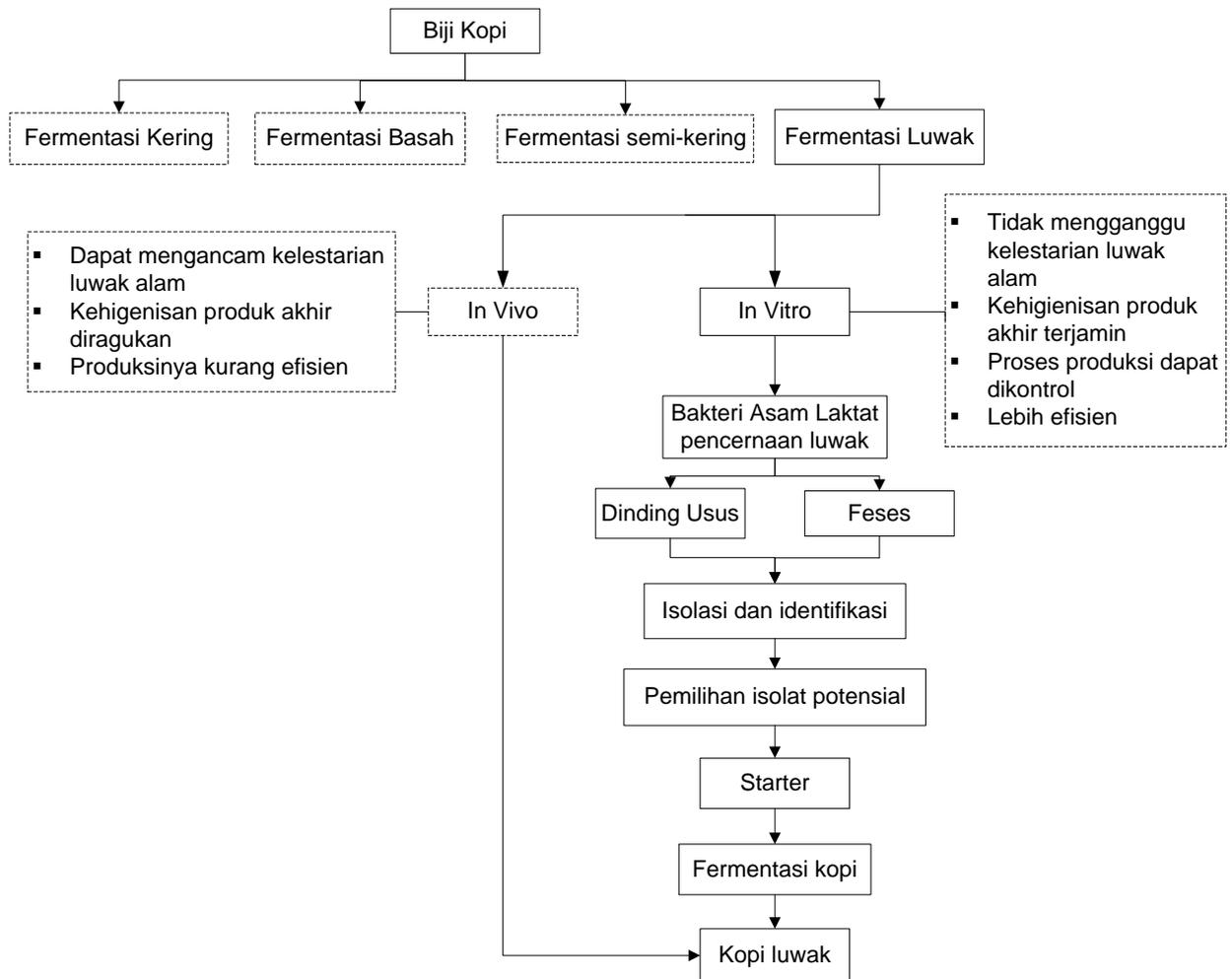
Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang proses fermentasi yang lebih efisien dan efektif untuk meningkatkan kualitas biji kopi dengan menggunakan bakteri pencernaan luwak.

### **1.5. Kebaruan Penelitian**

1. Diperoleh informasi mengenai spesies bakteri asam laktat potensial dari pencernaan binatang luwak.
2. Informasi mengenai enzim-enzim yang bermanfaat untuk fermentasi kopi yang dapat dihasilkan oleh mikroba asal pencernaan luwak.
3. Formulasi starter kering untuk fermentasi kopi luwak.
4. Kondisi optimum fermentasi kopi menggunakan mikroba pencernaan luwak.

## 1.6. Kerangka Konseptual

Berdasarkan kajian teori yang telah dilakukan maka disusun kerangka konseptual yang disajikan pada Gambar 1.1.



**Gambar 1.1. Kerangka konseptual penelitian**

## 1.7. Tahapan Penelitian

Penelitian mengenai fermentasi kopi menggunakan bakteri asam laktat asal pencernaan luwak ini akan dilakukan dalam empat tahapan. Penelitian diawali dengan melakukan isolasi mikroba dari pencernaan binatang luwak. Mikroba yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi jenisnya dan diuji aktivitas enzimnya. Isolat potensial kemudian dibuat menjadi starter kering dan diaplikasikan untuk memfermentasi biji kopi. Setelah itu dilakukan analisa *cupping test* untuk menentukan perlakuan terbaik serta analisa berbagai senyawa kimia untuk mengetahui profil kopi tersebut. Diagram alir prosedur umum penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.2.

### **Tahap 1 (Isolasi dan identifikasi bakteri dari pencernaan binatang luwak)**

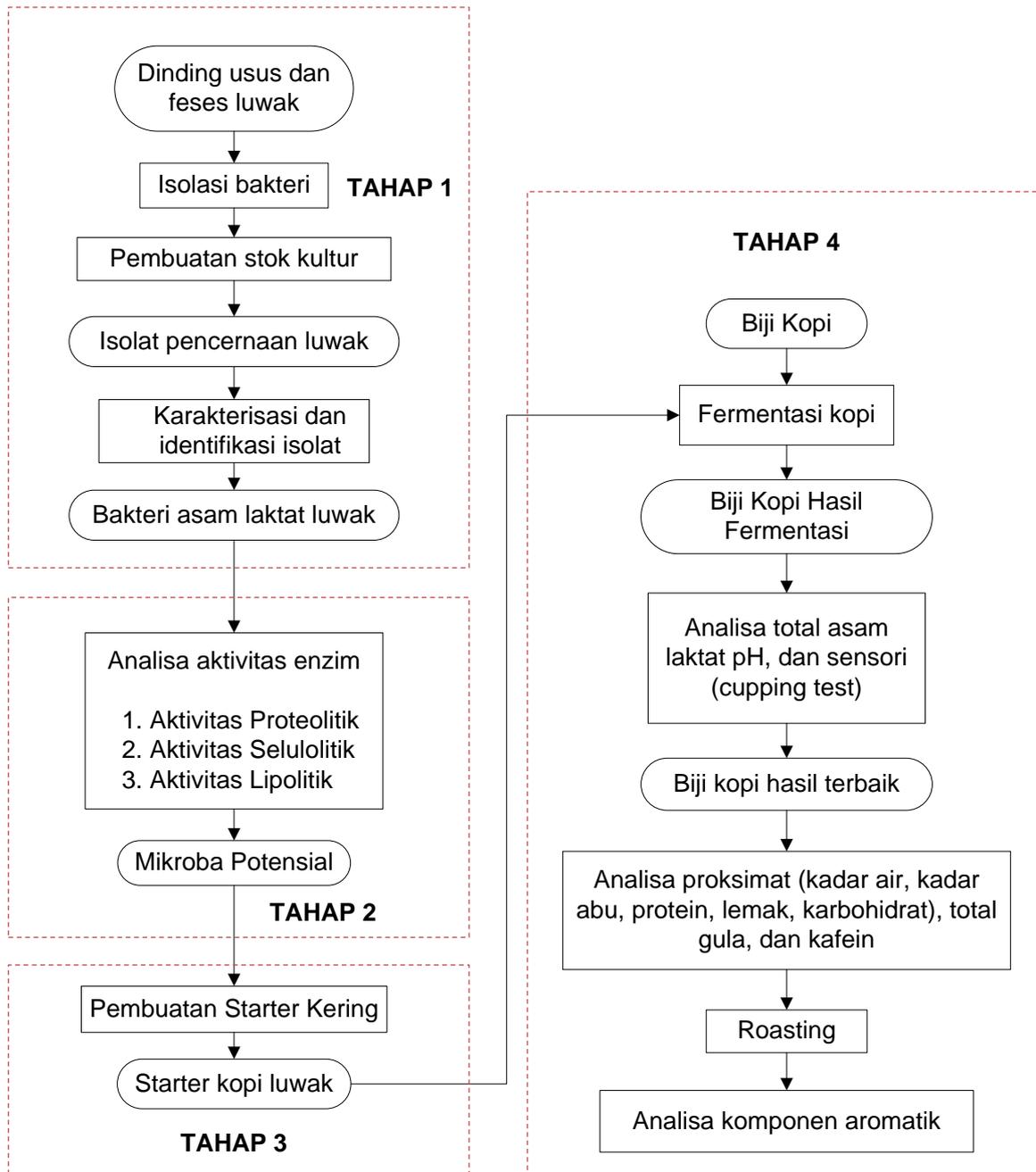
Pada tahap ini dilakukan isolasi mikroba dari dinding usus dan feses binatang luwak. Isolasi dilakukan dengan menggunakan media MRS Agar dengan menggunakan metode *pour plate*. Isolat tunggal yang diperoleh pada tahapan ini dibuatkan kultur stok untuk digunakan pada tahap selanjutnya. Isolat yang diperoleh kemudian diidentifikasi untuk diketahui spesiesnya. Identifikasi dilakukan dengan melihat morfologi, sifat Gram, kemampuan probiotik (ketahanan pada asam dan garam empedu), serta genotipnya menggunakan Gen 16s rRNA.

### **Tahap 2 (Analisa aktivitas enzim isolat pencernaan luwak)**

Isolat bakteri yang telah diketahui spesiesnya kemudian diuji aktivitas enzimnya secara kuantitatif. Aktivitas enzim yang diuji meliputi aktivitas enzim proteolitik, selulolitik, dan lipolitik.

### **Tahap 3 (Pembuatan starter kopi)**

Isolat yang telah diperoleh dari tahapan sebelumnya kemudian dipropagasi dan dibuat dalam bentuk starter kering. Pembuatan starter kering bertujuan untuk menjaga viabilitas isolat serta mempermudah aplikasi mikroba saat melakukan fermentasi.



Gambar 1.2. Diagram alir tahapan penelitian

#### **Tahap 4 (Fermentasi Kopi)**

Fermentasi kopi dilakukan dengan menambahkan starter bakteri yang telah diisolasi dari pencernaan binatang luwak. Fermentasi dilakukan pada suhu 38°C selama 24 jam (dilakukan pengambilan sampel setiap 6 jam sekali). Terdapat perlakuan konsentrasi starter yang digunakan pada proses fermentasi, yaitu konsentrasi starter 1% dan 2%. Analisis sensori kopi (*cupping test*) dilakukan untuk menentukan perlakuan terbaik. Selain itu dilakukan juga analisa komponen kimianya seperti proksimat, kafein, total gula, serta komponen aromatik terhadap kopi kualitas terbaik untuk mengetahui kualitas/profil kopi tersebut.

## BAB II

### ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL PENCERNAAN LUWAK

#### ABSTRAK

Luwak adalah mamalia yang banyak dikembangkan untuk menghasilkan kopi luwak. Kopi luwak adalah salah satu kopi langka dan termahal di dunia dari Indonesia. Bakteri asam laktat diduga sebagai bakteri yang berperan dalam pembentukan cita rasa serta aroma pada kopi luwak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat hasil pencernaan luwak secara akurat hingga tingkat spesies. Parameter yang diuji dalam penelitian ini adalah pewarnaan Gram, resistensi bakteri terhadap asam, resistensi bakteri terhadap garam empedu, dan identifikasi genotip isolat menggunakan metode sekuensing gen 16S rRNA. Hasil penelitian menemukan bahwa US1, FS3, FS4, dan FS6 diidentifikasi sebagai *Leuconostoc pseudomesenteroides*, US2 dan US3 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, FS2 diidentifikasi sebagai *Weissella cibaria*, dan FS5 diidentifikasi sebagai *Staphylococcus haemolyticus*. Semua isolat yang diperoleh termasuk kelompok bakteri Gram-positif berdasarkan hasil pewarnaan Gram. Namun dari 8 isolat yang diperoleh, satu isolat yaitu FS5 (*Staphylococcus haemolyticus*), bukan merupakan bakteri asam laktat, melainkan bakteri patogen.

**Kata Kunci :** bakteri asam laktat, luwak, saluran pencernaan, 16S rRNA

#### 2.1. Latar Belakang

*Paradoxurus hermaphroditus* atau yang lebih dikenal dengan nama Luwak di Indonesia merupakan binatang mamalia yang tergolong ke dalam suku *Viverridae*. Binatang ini dicirikan memiliki ekor yang panjang, kaki yang pendek dan kecil (Rahardjo, 2012; Maha *et al.*, 2018), serta memiliki kelenjar yang dapat mengeluarkan aroma pandan (Rahardjo, 2012). Luwak termasuk binatang nokturnal yang aktif pada malam hari untuk mencari makan (Rahardjo, 2012; Winaya *et al.*, 2020; Nijman *et al.*, 2014). Spesies ini merupakan omnivora yang umumnya makan buah-buahan seperti pisang, pepaya, kopi, tetapi terkadang mengonsumsi serangga, vertebrata kecil, atau reptil (Rahardjo, 2012; Winaya *et al.*, 2020). Pada dasarnya, luwak merupakan satwa liar yang hidup di hutan. Akan tetapi di Indonesia, binatang ini banyak dibudidayakan untuk menghasilkan kopi luwak (Winaya *et al.*, 2020; Schmidt-Burbach *et al.*, 2014).

Kopi luwak merupakan kopi langka dan salah satu kopi termahal dunia khas Indonesia. Proses fermentasi yang berlangsung di dalam pencernaan luwak menghasilkan aroma dan cita rasa yang disenangi oleh pecinta kopi baik di Indonesia maupun di dunia. (Winaya *et al.*, 2020). Berbagai enzim dan mikroorganisme yang diprediksi berasal dari jenis bakteri asam laktat berperan dalam pembentukan aroma tersebut kopi tersebut (Fitri *et al.*, 2019).

Tingginya minat konsumen terhadap kopi luwak menyebabkan meningkatnya keingintahuan para peneliti untuk mengeksplorasi bakteri yang terdapat di dalam pencernaan binatang luwak. Upaya untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri tersebut mulai banyak dilakukan. Akan tetapi identifikasi yang dilakukan hanya sebatas identifikasi secara fenotip (Usman *et al.*, 2015; Fauzi, 2008).

Sifat fenotipik ataupun genotipik bakteri dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu isolat. Identifikasi fenotipik dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi koloni, pewarnaan Gram, uji fisiologis, metabolik (biokimia) atau kemotaksonomi. Identifikasi genotipik dapat dilakukan dengan menggunakan metode molekuler misalnya melalui sekuensing gen pengkode 16S rRNA bakteri dengan metode *Polymerase Chain Reactions* (Ammor, 2005; Donelli *et al.*, 2013). Metode identifikasi secara fenotip memiliki banyak kelemahan, diantaranya identifikasi yang memakan waktu yang lama serta tingkat keakuratan yang rendah disebabkan oleh interpretasinya yang bersifat subjektif (Donelli *et al.*, 2013). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukanlah penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat dari pencernaan luwak secara akurat hingga ke tingkat spesies. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan metode gen 16S rRNA.

## **2.2. Metode Penelitian**

### **2.2.1. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada Agustus 2019 hingga Desember 2019. Pengambilan sampel pencernaan luwak dilakukan di Klinik Hewan Pendidikan UNHAS. Pelaksanaan isolasi dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains FMIPA UNHAS. Identifikasi molekuler dilakukan di PT.Genetika Science Indonesia.

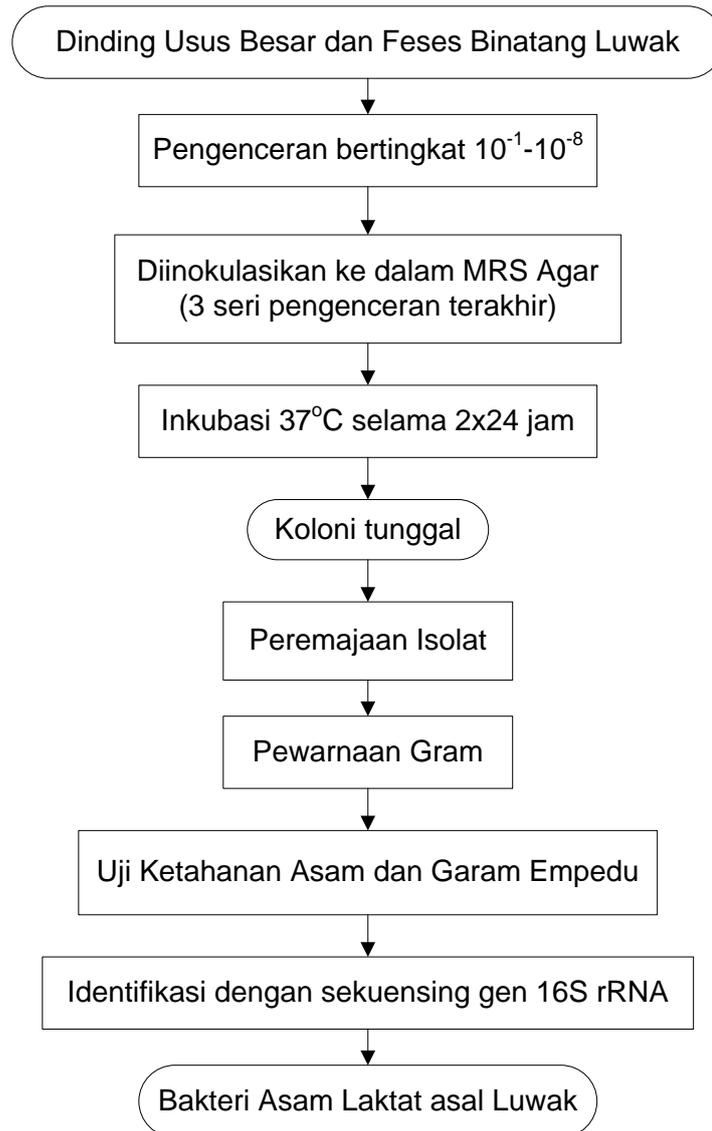
### 2.2.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu spesimen dinding usus besar binatang luwak, feses binatang luwak, NaCl, media MRS (*Man Ragosa Sharpe*) Broth, Bacto Agar, CaCO<sub>3</sub>, akuades, zat warna kristal violet, larutan iodium, alkohol, safranin, HCl, garam empedu TIANamp Genomic DNA Kit Cat.no. DP304, Mytaq HS Red Mix, primer forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'), primer reverse 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'), TAE Buffer, gel agarose

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, ose, tabung reaksi, cawan petri, *vortex*, *waterbath*, sentrifugasi dingin (MPW-260R), alat elektroforesis + tip supply, alat PCR (Applied Biosystems), perangkat lampu UV + kamera digital, timbangan analitik, microwave, freezer - 20°C, micropipet (Biohit 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 20 - 100 µl) (Biorad 100 - 1000 µl), rak tabung eppendorf, tabung eppendorf, collection tube, stopwatch, dan sarung tangan, inkubator, erlenmeyer, tube PCR.

### 2.2.3. Prosedur Penelitian

Binatang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) yang menjadi sampel pada penelitian ini diperoleh dari peternakan luwak Malino, Sulawesi Selatan. Prosedur pengambilan sampel bakteri dari dinding usus besar dibantu oleh tim dari Klinik Hewan Pendidikan UNHAS dengan mengikuti prosedur kode etik pengambilan sampel hewan uji. Prosedur isolasi dan identifikasi bakteri asal pencernaan binatang luwak secara umum dapat dilihat pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1. Diagram alir prosedur identifikasi bakteri asal pencernaan luwak**

### **a. Isolasi Bakteri Asam Laktat**

Sebanyak satu ose permukaan usus besar binatang luwak dan satu gram feses luwak masing-masing dimasukkan ke dalam 9 ml larutan fisiologis. Dilakukan pengenceran bertingkat ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ). Tiga seri pengenceran terakhir diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke media MRS Agar +  $\text{CaCO}_3$  dengan metode *pour plate*. Setelah itu diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2x24 jam. Bakteri asam laktat yang dipilih adalah koloni tunggal yang terdapat zona bening disekelilingnya.

## **b. Pemurnian Bakteri Asam Laktat**

Koloni terpilih dari tahapan sebelumnya diinokulasikan kembali pada media MRS Agar yang baru dengan metode goresan kuadran. Isolasi dilakukan sebanyak dua kali hingga diperoleh bakteri asam laktat murni. Isolat yang diperoleh kemudian diinokulasikan ke agar miring sebagai kultur stok bakteri.

## **c. Pewarnaan Gram (Fauzi, 2008)**

Digoreskan sebanyak satu ose pada objek glass dan difiksasi (ditambah 1 tetes akuades kemudian dikering anginkan), sehingga terbentuk noda. Setelah itu ditetaskan berturut-turut: pewarna kristal violet, larutan iodine, etanol 95%, dan safranin. Masing-masing larutan dibiarkan selama  $\pm 1$  menit sebelum dibilas dengan akuades. Terakhir, objek glass ditutup dengan deg glass dan diamati di bawah mikroskop. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan warna BAL. Jika warna yang terlihat adalah warna ungu kebiruan berarti isolat tersebut termasuk kelompok Gram positif, dan apabila berwarna merah berarti isolat tersebut Gram negatif.

## **d. Uji Ketahanan Asam (Djide dan Wahyuddin, 2008)**

Ketahanan isolat mikroba terhadap asam lambung pada saluran pencernaan yang ber pH rendah dilakukan dengan menambahkan HCl 0,1 N (diatur pada pH 3) pada medium MRSB. Isolat bakteri diambil dari stok sebanyak 1 ose. Kemudian diinokulasikan pada medium MRSB-HCl dan diinkubasi selama 2 x 24 jam dengan temperatur 37°C. Hasil positif ditandai dengan terjadinya pertumbuhan bakteri pada medium yang memiliki keasaman rendah. Hasil negatif jika tidak terjadi pertumbuhan mikroba pada medium

## **e. Uji Ketahanan Garam Empedu (Djide dan Wahyuddin, 2008)**

Garam empedu sintetik (*ox bile*) ditambahkan pada media MRSB dengan konsentrasi 5%. Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada media MRSB-garam. Isolat diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif jika ditandai dengan adanya endapan pada dasar tabung dan adanya perubahan media menjadi lebih keruh dibandingkan sebelum diinkubasi.

## f. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi yang terdapat dalam TIANamp Genomic DNA Kit Cat.no. DP304. Pertama dilakukan preparasi sampel. Isolat yang telah diremajakan disentrifugasi pada kecepatan 13.400 rpm lalu supernatan dibuang. Suspensikan pellet ke dalam 200  $\mu$ l Buffer GA. Ditambahkan 20  $\mu$ l proteinase K lalu di vortex. Setelah itu di tambahkan 200  $\mu$ l buffer GB ke dalam sampel, di vortex, dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit untuk menghasilkan larutan yang homogen. Dilakukan sentrifugasi kecepatan 13.400 rpm selama 2 menit, diganti dengan *collect tube* yang baru. Setelah itu ditambahkan etanol 96% sebanyak 200  $\mu$ l ke dalam sampel, di vortex selama 15 detik. Suspensi dipindahkan ke dalam TIANamp Spin Column CB3 dan di sentrifugasi pada 13.400 rpm selama 30 detik. Tambahkan 500  $\mu$ l Buffer GD ke dalam Spin Column CB3, lalu sentrifugasi pada 13.400 selama 30 detik. Setelah itu ditambahkan 600  $\mu$ l buffer PW dan disentrifugasi pada 13.400 selama 30 detik, ulangi langkah ini. Setrifugasi pada 13.400 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan membran sepenuhnya. Pindahkan spin column CB3 ke dalam tabung mikrosentrifuge 1.5 ml baru yang steril. Pipet 100 buffer TE langsung ke tengah membran. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang (25°C) selama 5 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 13.400 rpm selama 2 menit. Supernatan yang tertampung pada tabung adalah ekstrak DNA

## g. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi. Sebelumnya dibuat campuran reaksi untuk PCR yaitu 16  $\mu$ l 2X Mytaq HS Red Mix dan masing-masing 2 $\mu$ l primer 16S rRNA *forward* 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer *reverse* 1387R (5'-GGCGGTGTGTACAAGGC-3') dan dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ l. Tabung kemudian diisi campuran reaksi PCR sebanyak 24  $\mu$ l lalu masing-masing tabung ditambahkan 6 $\mu$ l ekstrak DNA. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dan setiap siklus terdiri dari predenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57°C selama 1 menit, *extending* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post extending* pada suhu 72°C selama 10 menit, *hold* pada 4°C hingga selesai 30 siklus (Barus dan Wijaya, 2011)

## **h. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis**

Sebanyak 1,5 g serbuk agarosa ditimbang, dilarutkan ke 100 ml TAE Buffer, lalu dipanaskan menggunakan microwave selama 2 menit hingga homogen. Setelah itu ditambahkan Ethidium Bromida sebanyak 8  $\mu$ L. Cairan gel lalu didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 24 sumur. Masing-masing 5  $\mu$ l produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar dengan marker <1500 pb yang sesuai dengan panjang basa 63F dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

## **i. Sekuensing DNA**

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dilakukan sekuensing DNA dilakukan oleh 1<sup>st</sup> Base melalui PT Genetika Indonesia. Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode Sanger dideoksi.

## **j. Analisis Data**

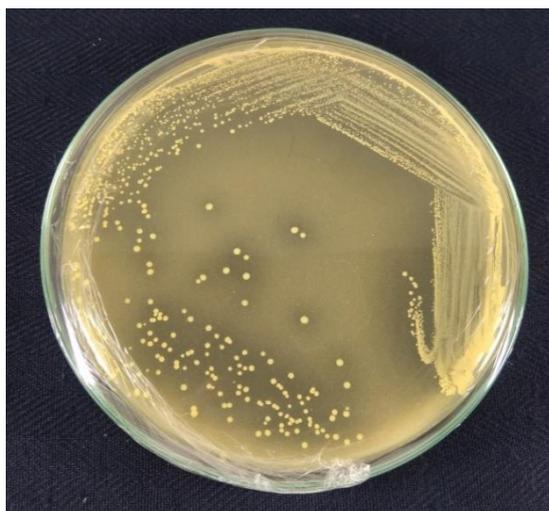
Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan melakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) urutan nukleotida dari hasil sekuensing gen 16S rRNA dengan database yang tersedia pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil yang diperoleh kemudian dibuat pohon filogeni, dengan pensejajaran ganda (*multiple alignment*) selanjutnya visualisasi kekerabatan menggunakan pohon *Neighbor-Joining* dengan bootstrap 1000x pada software MEGA (6.06).

## **2.3. Hasil Dan Pembahasan**

### 2.3.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri dilakukan melalui dua sampel, yaitu dari usus besar dan dari feses binatang luwak, Media MRS Agar yang digunakan pada penelitian adalah media yang direkomendasikan untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Adapun  $\text{CaCO}_3$  yang ditambahkan bertujuan untuk membedakan antara bakteri asam laktat dengan bakteri lain yang tumbuh pada media agar. Selama proses pertumbuhannya BAL akan menghasilkan asam laktat yang dapat bereaksi dengan  $\text{CaCO}_3$  membentuk kalsium laktat (Djide dan Wahyuddin, 2008). Sehingga koloni yang membentuk zona bening pada media agar sebagai hasil reaksi dari kalsium karbonat ditandai sebagai bakteri asam laktat (Seelay *et al.*, 2001)

Dari hasil isolasi bakteri asam laktat diperoleh sebanyak 12 isolat bakteri dan selanjutnya dipilih 8 isolat produktif yang akan digunakan untuk tahapan selanjutnya



**Gambar 2.2.** Pertumbuhan bakteri asam laktat pencernaan binatang luwak pada media MRS +  $\text{CaCO}_3$

### 2.3.2. Pewarnaan Gram

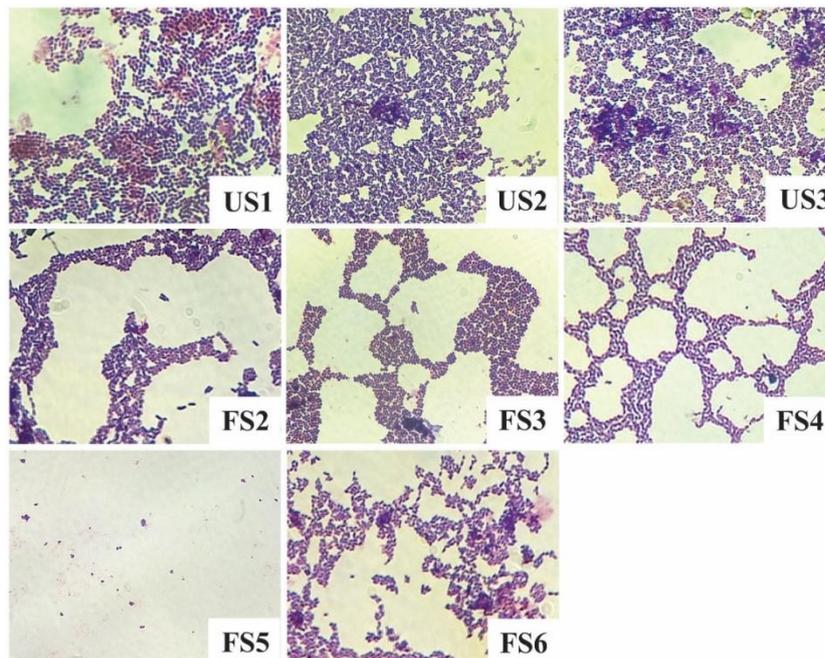
Pewarnaan gram merupakan metode paling umum dalam laboratorium yang digunakan untuk membedakan antara mikroorganisme Gram positif dan Gram negatif (Beccera, 2016). Bakteri Gram positif memiliki dinding peptidoglikan yang tebal sehingga mampu mempertahankan warna dari kristal violet setelah *decolorization*, sedangkan bakteri gram negatif memiliki dinding peptidoglikan

yang tipis sehingga tidak mampu mempertahankan warna setelah pencucian dengan alkohol (Yazdankhah *et al.*, 2001; Bailey, 2020)

Pewarnaan gram yang dilakukan terhadap isolat dapat digunakan untuk mengetahui sifat morfologi bakteri berupa bentuk dan sifat Gram nya. Hasil pewarnaan gram isolat pencernaan luwak dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Gambar 2.3.

**Tabel 2.1. Hasil pengamatan morfologi bakteri asam laktat pencernaan luwak**

Kode Isolat	Morfologi Sel	
	Bentuk	Gram
US1	Coccus	Positif
US2	Basil	Positif
US3	Basil	Positif
FS2	Basil	Positif
FS3	Coccus	Positif
FS4	Coccus	Positif
FS5	Coccus	Positif
FS6	Coccus	Positif



**Gambar 2.3. Hasil pengecatan gram bakteri asam laktat secara mikroskopis**

Berdasarkan Tabel 2.1 dapat dilihat bahwa dari 8 isolat yang diperoleh dari pencernaan luwak, 3 isolat, yaitu US2, US3, dan FS2 memiliki bentuk basil dan 5 isolat yaitu US1, FS3, FS4, FS5, dan FS6 memiliki bentuk coccus. Semua isolat yang diperoleh berwarna ungu dibawah mikroskop (Gambar 2.3) menunjukkan

bahwa semua isolat termasuk ke dalam bakteri Gram positif. Berdasarkan hasil *screening* awal pewarnaan Gram, isolat bakteri yang diperoleh dari pencernaan luwak diduga berasal dari kelompok bakteri asam laktat. Ismail *et al.*, (2018) menyebutkan bahwa bakteri asam laktat termasuk ke dalam golongan bakteri Gram positif. Bakteri tersebut berwarna ungu atau biru dibawah mikroskop sebagai hasil pengecatan Gram

### 2.3.3. Uji Ketahanan terhadap Keasaman dan Garam Empedu

Bakteri asam laktat dapat dimasukkan ke dalam kelompok probiotik (Surono, 2004). Sebagai kelompok probiotik, BAL harus memiliki kemampuan untuk bertahan dalam kondisi pH lambung yang rendah serta tahan terhadap garam empedu ataupun enzim-enzim pencernaan yang akan dilewati selama perjalanannya menuju usus. Secara umum bakteri tumbuh optimal pada kondisi pH netral yakni 7,0. Akan tetapi spesies BAL lebih toleran terhadap kondisi lingkungan pH asam. Hal ini berkaitan dengan kondisi saluran pencernaan hewan yang cenderung lebih asam atau memiliki pH rendah. Hasil pengujian BAL terhadap keasaman rendah dan garam empedu dapat dilihat pada Tabel 2.2

**Tabel 2.2. Hasil pengujian ketahanan BAL terhadap keasaman dan garam empedu**

Kode Isolat	pH 3	Garam Empedu
US1	+++	+++
US2	+++	+++
US3	+++	+++
FS2	++	++
FS3	++	++
FS4	++	++
FS5	+	+
FS6	+++	+++

**Keterangan =** +++ : sangat keruh dan banyak endapan  
 ++ : keruh dan cukup banyak endapan  
 + : tidak keruh dan sedikit endapan

Hasil dari pengujian ketahanan isolat pencernaan luwak terhadap keasaman dan garam empedu (Tabel 2.2.) menunjukkan bahwa dari delapan isolat yang diperoleh hanya 1 isolat yaitu isolat dengan kode FS5 yang tidak mampu bertahan pada kondisi asam maupun garam empedu. Sedangkan tujuh isolat lain mampu bertahan terhadap garam empedu maupun kondisi asam. Hal ini menunjukkan bahwa dari delapan isolat yang diperoleh dari pencernaan luwak, diduga US1, US2, US3, FS2, FS3, FS4, dan FS6 termasuk kedalam

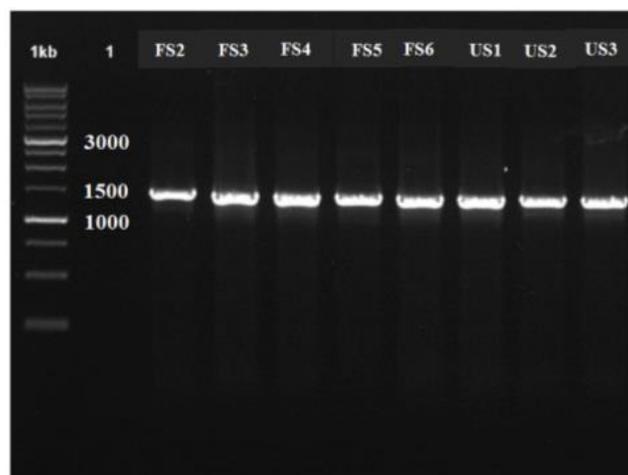
golongan bakteri asam laktat, sedangkan FS5 tidak termasuk ke dalam golongan bakteri asam laktat.

#### 2.3.4. Identifikasi Molekular Bakteri Asal Pencernaan Luwak

Identifikasi molekular dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri hasil isolasi. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan sekuensing Gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA banyak digunakan untuk mengidentifikasi dan konstruksi pohon filogenetik, sebab pada bakteri gen ini memiliki tingkat *similarity* yang tinggi. Pada tahun 1980, terdapat sekitar 1.791 nama spesies yang diakui. Saat ini, jumlahnya telah meningkat menjadi 8.168 spesies (Janda dan Abott, 2007). Peningkatan tersebut disebabkan oleh berkembangnya teknologi sekuensing gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi secara lebih akurat.

##### a. Visualisasi Hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Semua sampel isolat dapat teramplifikasi menggunakan primer 63F dan 1387R dan menunjukkan pita yang terang dan tebal (Gambar 2.4). Menurut Restu *et al.*, (2012) produk ekstraksi DNA yang berkualitas baik ditunjukkan dengan pita DNA yang terlihat menyala, bersih, dan tebal. DNA isolat yang berhasil teramplifikasi oleh pasangan primer 63F dan 1387R memiliki pita yang berukuran <1500 bp. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Barus *et al.*, (2017) yang juga menggunakan pasangan primer 63F dan 1387R untuk mengamplifikasi sekuen gen 16S rRNA menghasilkan fragmen pita yang berukuran 1300 bp.



Gambar 2.4. Hasil amplifikasi DNA sampel isolat dengan primer 63F dan 1387R

## b. Analisis Fragmen 16S rRNA dengan Sekuensing

Identitas gen yang telah diketahui sekuensingnya dapat ditentukan dengan membandingkan kesamaan data yang diperoleh dengan data sekuen yang terdapat pada *Genbank*, salah satunya NCBI pada [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Analisis hasil BLAST memberikan informasi mengenai organisme atau bakteri yang mempunyai urutan DNA homolog dengan sampel sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tersebut. Menurut Narita (2012) bahwa persentase yang dapat diterima dari hasil BLAST data sekuensing minimal 95%. Untuk data sekuen yang pembacaannya lebih rendah diberlakukan 75%. Hasil BLAST isolat asal pencernaan binatang luwak dapat dilihat pada Tabel 2.3.

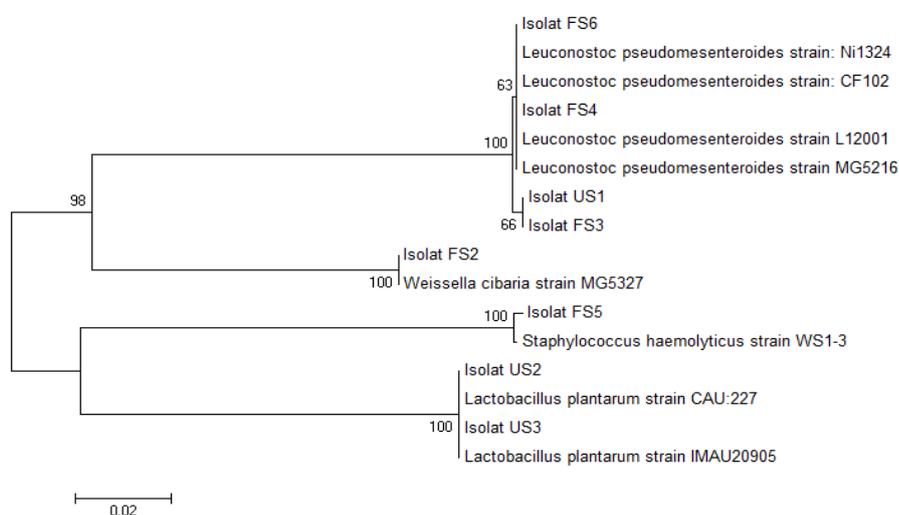
**Tabel 2.3. Hasil BLAST data sekuensing**

Kode Sampel	Spesies Homolog dengan GenBank	Query Cover	Identities	Accession
US1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain MG5216	99%	99,18%	MN368204.1
US2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU:227	99%	99,67%	MF369879.1
US3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IMAU20905	99%	98,71%	MK369825.1
FS2	<i>Weissella cibaria</i> strain MG5327	98%	99,15%	MN368586.1
FS3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain L12001	99%	98,92%	KT952379.1
FS4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain: CF102	99%	98,12%	AB854189.1
FS5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain WS1-3	99%	98,15%	MN448416.1
FS6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain: Ni1324	99%	99,58%	AB598984.1

Berdasarkan hasil analisis menggunakan BLAST, diketahui bahwa 8 isolat bakteri yang diperoleh dari pencernaan luwak teridentifikasi menjadi 4 spesies yaitu *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Weissella cibaria*, dan *Staphylococcus haemolyticus* dengan nilai *query cover* mencapai 98%-99% dan *identities* berkisar diantara 98,12%-99,67%. *Query cover* adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat

pada BLAST, sedangkan *identities* adalah persentasi kecocokan antara sekuen sampel dengan sekuen database yang tersejajarkan (Newell *et al.* 2013).

*Staphylococcus haemolyticus* merupakan jenis bakteri yang termasuk ke dalam kelompok *coagulase-negative staphylococci*. Bakteri tersebut merupakan bakteri normal yang hidup pada kulit manusia dan flora namun dapat bersifat patogen dan menyebabkan infeksi saluran kemih dan penyakit lainnya (Suhartono *et al.*, 2019). Sehingga dari 8 isolat, hanya 7 isolat dari pencernaan luwak yang teridentifikasi sebagai bakteri asam laktat yaitu US1, US2, US3, FS2, FS3, FS4, dan FS6



**Gambar 2.5. Pohon filogenetik isolat asal pencernaan binatang luwak**

## 2.4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diketahui bahwa US1, FS3, FS4, dan FS6 diidentifikasi sebagai bakteri *Leuconostoc pseudomesenteroides*, US2 dan US3 diidentifikasi sebagai bakteri *Lactobacillus plantarum*, FS2 diidentifikasi sebagai bakteri *Weissella cibaria*, dan FS5 diidentifikasi sebagai bakteri *Staphylococcus haemolyticus*. Keseluruhan isolat tersebut termasuk ke dalam gram positif berdasarkan hasil pewarnaan gram. Akan tetapi diantara 8 isolat

yang diperoleh, terdapat 1 isolat yaitu FS5 yang bukan merupakan bakteri asam laktat, melainkan bakteri patogen.