



**VIABILITAS BAKTERI SELULOLITIK DAN AMILOLITIK
ASAL FESES LUWAK MENGGUNAKAN MEDIA KARBON
KULIT TANDUK KOPI ARABIKA**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana pada
program studi Biologi.*

SKRIPSI

Oleh

**Alfis Saadah
221810401084**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA BIOLOGI
JEMBER
2026**

PERSEMBAHAN

Penulisan skripsi ini dipersembahkan kepada ibu sebagai orang tua penulis, keluarga dan para guru yang telah mengajari penulis selama berada di bangku sekolah. Terima kasih kepada dosen-dosen S1 Prodi Biologi Universitas Jember yang membimbing penulis selama masa perkuliahan.

MOTTO

“Pressure is privilege”

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Alfis Saadah

NIM : 221810401084

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Viabilitas Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Asal Feses Luwak Menggunakan Media Karbon Kulit Tanduk Kopi Arabika* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Penelitian ini merupakan bagian penelitian Prof. Dr. Kahar Muzakhar S.Si., Penelitian Kompetitif Nasional Skema Riset Konsorsium Unggulan Berdampak (RIKUB) pendanaan Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi 2026, dengan Nomor Kontrak Induk 018/C3/DT.05.00/RIKUB/2026 tanggal 13 April 2026 dan Nomor Kontrak Turunan 3208/DST/UN25.C1/LT/2026 tanggal 14 April 2026..

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 Juli 2026

Yang menyatakan,



(Alfis Saadah)

NIM. 221810401084

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul *Viabilitas Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Asal Feses Luwak Menggunakan Media Karbon Kulit Tanduk Kopi Arabika* telah diuji dan disetujui pada

Hari : **SELASA**
Tanggal : **28 JUL 2026**
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji

Ketua,



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

Anggota II,



Dr. Sutoyo, M.Si
NIP. 196610141992031002

Anggota II,



Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si.
NIP. 197003031999032001

ABSTRACT

Kopi luwak is a high-value export commodity characterized by unique sensory qualities. Its production relies on a natural fermentation process occurring within the digestive tract of the Asian palm civet (Paradoxurus hermaphroditus). Digestive enzymes and microbial consortia contribute to the hydrolysis—or breakdown—of coffee fruit layers, yielding simple compounds for fermentation and influencing the flavor of the coffee beans. Understanding bacterial survival, or viability, during fermentation and storage is essential. This study analyzed bacteria with cellulolytic and amylolytic potential—previously isolated—to assess their viability using solid-state fermentation (SSF). The objective was to determine bacterial viability levels throughout the fermentation and storage periods. SSF was selected due to its capacity for high enzyme yields and efficient substrate conversion, utilizing coffee parchment (husk) as a carbon source. The isolates underwent qualitative enzyme activity testing using CMC, SSA, and 1% coffee parchment extract media, resulting in the selection of five isolates with the highest activity indices (IFL 6, 8, 10, 13, and 14). Quantitative testing using the blue value and Somogyi-Nelson methods revealed that IFL 10 (cellulase) and IFL 13 (amylase) exhibited the highest activity. Furthermore, molecular analysis identified the isolates as belonging to the following genera: IFL 6 and 13 (Escherichia), IFL 8 (Serratia), IFL 10 (Shigella), and IFL 14 (Klebsiella).

Keywords: kopi luwak, solid state fermentation, bacterial viability, potential amylolytic and cellulolytic bacteria, enzyme activity, molecular identification

RINGKASAN

Viabilitas Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Asal Feses Luwak Menggunakan Media Karbon Kulit Tanduk Kopi Arabika; Alfis Saadah; 221810401084; 2026; 45 halaman; Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Kopi luwak merupakan salah satu produk *specialty coffee* yang memiliki nilai ekonomi tinggi secara global karena cita rasa serta aroma yang khas. Keunikan kopi luwak dihasilkan melalui proses fermentasi alami di dalam saluran pencernaan luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) yang mengalami perubahan biokimia akibat aktivitas enzim dan mikroorganisme pencernaan. Penelitian menunjukkan bahwa saluran pencernaan luwak mengandung komunitas mikroorganisme yang beragam, meliputi bakteri asam laktat/non, khamir, dan mikroorganisme penghasil enzim hidrolitik. Mikroorganisme inilah yang berkontribusi dalam proses hidrolisis lapisan buah kopi menjadi gula sederhana yang dapat digunakan selama fermentasi. Proses hidrolisis tersebut tidak hanya menyediakan nutrisi bagi mikroorganisme, tetapi juga menghasilkan berbagai prekursor aroma dan senyawa volatil yang berkontribusi terhadap pembentukan karakteristik khas kopi luwak.

Penelitian sebelumnya berhasil mengisolasi sepuluh jenis bakteri asal feses luwak, yang hidup endosimbion pada sistem pencernaan luwak. Pada penelitian ini, isolat tersebut diuji viabilitasnya menggunakan metode *solid state fermentation* (SSF) selama jangka waktu 8 minggu. Setelah itu, ditumbuhkan kembali pada media *Nutrient Broth* (NB) untuk mengetahui pertumbuhannya berdasarkan kekeruhan. Hasil ditemukan bahwa semua isolat IFL mampu tumbuh hingga minggu ke-8. Namun IFL 10 dan 14 viabilitasnya menurun pada minggu ke-6, sehingga hanya dapat tumbuh hingga minggu ke -4.

Informasi mengenai keberadaan aktivitas enzim selulase dan amilase pasca fermentasi juga dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif aktivitas enzim selulase menggunakan media CMC 1% diperoleh IFL 6, IFL 10 dan IFL 4 dengan indeks tertinggi. Selanjutnya diuji kembali dengan media ekstrak kulit tanduk 1% diperoleh ketiganya dapat membentuk zona bening, tetapi zona yang

dibentuk IFL 6 dan 10 tidak selebar IFL 14. Uji kuantitatif dengan metode *somogyi nelson* menunjukkan bahwa ketiganya memang memiliki aktivitas dalam memproduksi enzim selulase dengan hasil IFL 6 sebesar 47,7 U/mL dan IFL 14 sebesar 46,8 U/mL (substrat CMC). Sedangkan pada media ekstrak kulit tanduk 1% diperoleh aktivitas tertinggi IFL 14 sebesar 36,2 U/mL dengan gula reduksi yang dihasilkan sebanyak 9,76 mg/mL.

Uji aktivitas amilase dilakukan sebagai pertimbangan bahwa bakteri ini memiliki kemampuan menghidrolisis amilum yang terkandung dalam lapisan sebelum kulit tanduk. Analisis kualitatif diperoleh isolat IFL 6, 8 dan 13 dengan indeks tertinggi. Berdasarkan pengujian kuantitatif menggunakan metode *blue value*, diperoleh aktivitas IFL 6 sebesar 0.0097 U/mL, IFL 8 0.0044 U/mL dan IFL 13 sebesar 0,22 U/mL. Disamping itu, analisis genetik dilakukan untuk mengetahui kelompok jenis daripada bakteri tersebut, karena sangat penting sebagai informasi keberlanjutan dari mikroorganisme pencernaan luwak untuk fermentasi. Berdasarkan analisis similaritas dan pohon filogenetik, IFL 6 dan 13 berasal dari kelompok *Escherichia*, IFL 8 dari kelompok *Serratia*, IFL 10 dari kelompok *Shigella*, dan IFL 14 dari kelompok *Klebsiella*.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, nikmat, dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Sarjana di Strata Satu (S1) Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan berbagai pihak, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu dan Papa yang selalu memberikan dukungan berupa usaha, doa, kasih sayang serta biaya selama penulis berkuliah di S1 Biologi Universitas Jember.
2. Dr. Sattya Arimurti, S.P., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah memberikan motivasi penulis selama perkuliahan S1 Biologi Universitas Jember.
3. Dosen Pembimbing Tugas Akhir, Prof. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. yang telah membimbing selama proses penelitian hingga akhir penyelesaian skripsi.
4. Dr. Sutoyo, M.Si. selaku Dosen Penguji I dan Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si. selaku Dosen Penguji II telah memberikan masukan dalam rangka penyempurnaan hasil penelitian dan penyelesaian skripsi.
5. Dr.rer.nat. Pratiwi Prananingrum, M.Sc. dan Isfina Nurfaidatur Rohmah terima kasih atas dukungan mental yang selama ini diberikan kepada penulis selama berada di Bogor.
6. Mikrobiologi 22 dan keluarga enzim selaku teman laboratorium yang menemani penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi.
7. Rima, Refia, Diah, dan Vita selaku teman-teman yang memberikan perhatian mental kepada penulis selama perkuliahan sampai penelitian.

Penulis terbuka untuk menerima saran dan kritik atas kepenulisan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat sebagai literatur ilmiah dengan segala kekurangannya bagi para pembaca.

Jember, 13 Juli 2026

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alfis' followed by a stylized surname.

Alfis Saadah

NIM. 221810401084

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN.....	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN.....	v
ABSTRACT	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR NOTASI.....	xvi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN TEORI.....	5
2.1 Struktur Buah Kopi	5
2.2 Fermentasi Kopi dan Transformasi Biokimia Selama Proses Fermentasi	6
2.3 Mikroorganisme Pencernaan Luwak dan Potensinya dalam Fermentasi Kopi.....	7
2.4 Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Sebagai Agen Biokonversi Biomassa.....	8
2.5 Kulit Tanduk Kopi (<i>Coffee Parchment</i>) Sebagai Biomassa Lignoselulosa.....	8
2.6 Kulit Tanduk Kopi Sebagai <i>Biocarrier</i> Mikroorganisme	9
2.7 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF).....	9
2.8 Enzim Selulase dan Mekanisme Hidrolisis Selulosa	10
2.9 Enzim Amilase dan Mekanisme Hidrolisis Pati.....	10
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	12
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	12

3.2	Populasi dan Sampel/Subyek Penelitian	12
3.3	Desain Penelitian.....	12
3.4	Prosedur Penelitian.....	13
3.4.1.	Uji Viabilitas Isolat	13
3.4.2.	Estraksi Selulosa dan Pembuatan Media Ekstrak Kulit Tanduk .	13
3.4.3.	Uji Aktivitas Enzim (kualitatif).....	14
3.4.4.	Uji Aktivitas Enzim (kuantitatif).....	14
3.4.5.	Analisis Filogenetik Isolat.....	15
3.5	Pengumpulan Data Penelitian	17
3.6	Alat/Instrumen Penelitian.....	17
3.7	Metode Analisis.....	17
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1	Uji Viabilitas	19
4.2	Uji Aktivitas Enzim Selulase	24
4.3	Uji Aktivitas Enzim Amilase	30
4.4	Analisis Filogenetik Isolat.....	35
BAB 5.	KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN	45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA		46
LAMPIRAN-LAMPIRAN		51

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Pada Lapisan Kulit Buah Kopi	6
Tabel 3. 1 Pengaturan Suhu dan Durasi PCR	17
Tabel 4. 1 Hasil Perhitungan Populasi (CFU/mL)	20
Tabel 4.2 Viabilitas Isolat Selama Fermentasi 8 Minggu Berdasarkan Kekeruhan Media NB	23
Tabel 4.3 Similaritas Isolat IFL 6	36
Tabel 4.4 Similaritas Isolat IFL 8	38
Tabel 4.5 Similaritas Isolat IFL 10	39
Tabel 4.6 Similaritas Isolat IFL 13	40
Tabel 4.7 Similaritas Isolat IFL 14	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Buah Kopi (Sumber : Coffeeland Indonesia.com).....	5
Gambar 2.2 Mekanisme Hidrolisis Enzim Selulase (Yoon <i>et al.</i> , 2014).....	10
Gambar 2.3 Struktur Kimia Amilosa dan Amilopektin (Muharam <i>et al.</i> , 2022)..	11
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian	12
Gambar 4.1 Hasil Uji Viabilitas (a):IFL 10, (b) IFL 13 (K=kontrol, M 1-8=minggu ke 1-8).....	24
Gambar 4.2 Uji Kualitatif Aktivitas Selulase Media CMC 1% (a) IFL 6 umur 72 jam, (b) IFL 10 umur 12 jam, (c) IFL 14 umur 12 jam	27
Gambar 4.3 Uji Kualitatif Aktivitas Selulase Media Ekstrak Kulit Tanduk 1% (a) IFL 6 umur 24 jam, (b) IFL 10 umur 48 jam, (c) IFL 14 umur 24 jam	27
Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Enzim Selulase (CMC 1%)	30
Gambar 4.5 Grafik Aktivitas Enzim Selulase (ekstrak kulit tanduk 1%)	30
Gambar 4.6 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase (a) IFL 6 umur 20 jam, (b) IFL 8 umur 12 jam dan (c) IFL 13 umur 5 jam	32
Gambar 4.7 Grafik Aktivitas Enzim Amilase	33
Gambar 4.8 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 6 Dengan Beberapa Spesies Referensi.....	37
Gambar 4.9 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 8 Dengan Beberapa Spesies Referensi.....	39
Gambar 4.10 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 10 Dengan Beberapa Spesies Referensi.....	40
Gambar 4.11 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 13 Dengan Beberapa Spesies Referensi.....	42
Gambar 4.12 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 14 Dengan Beberapa Spesies Referensi.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 3. 1 Pembuatan Media <i>Nutrient Broth</i>	51
Lampiran 3. 2 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i>	51
Lampiran 3. 3 NaOH 1 M	51
Lampiran 3. 4 Media CMC 1 %.....	52
Lampiran 3. 5 Media SSA 1 %	52
Lampiran 3. 6 NaCl 1 M	52
Lampiran 3. 7 Larutan Iodin 0,2% KI 2%	52
Lampiran 3. 8 Larutan Pati %	53
Lampiran 3. 9 Buffer Fosfat ph 6,2.....	53
Lampiran 3. 10 Larutan HCL 0,1 M	53
Lampiran 3. 11 Media Padat Ekstrak Kulit Tanduk	53
Lampiran 4. 1 Hasil Viabilitas Bakteri Pasca Solid State Fermentation.....	54
Lampiran 4. 2 Perhitungan Indeks Zona Bening Aktivitas Enzim Selulase	54
Lampiran 4. 3 Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase	54
Lampiran 4. 4 Perhitungan Indeks Zona Bening Aktivitas Enzim Amilase	54
Lampiran 4. 5 Perhitungan Aktivitas Enzim Amilase	55
Lampiran 4. 6 Kurva Standar Amilum (Amilase).....	55
Lampiran 4. 7 Kurva Kalibrasi Amilum (Selulase)	55

DAFTAR NOTASI

IU	: aktivitas enzim (Unit/mL)
ΔA	: selisih absorbansi antara kontrol dan sampel,
V_{total}	: volume total reaksi (mL),
ϵ	: koefisien ekstinsi kompleks biru (diperoleh dari kurva standar),
l	: panjang lintasan cahaya kuvet (biasanya 1 cm),
V_e	: volume enzim yang digunakan (mL),
t	: waktu inkubasi (menit),
μM glukosa	: kadar glukosa dalam satuan μM

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Singkatan/Istikal	Arti dan keterangan
SSF	<i>Solid State Fermentation</i>
CMC	Departemen Kesehatan
SSA	<i>Starch Soluble Agar</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi luwak merupakan salah satu produk *specialty coffee* yang memiliki nilai ekonomi tinggi secara global karena cita rasa serta aroma yang khas. Keunikan kopi luwak dihasilkan melalui proses fermentasi alami di dalam saluran pencernaan luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) yang mengalami perubahan biokimia akibat aktivitas enzim dan mikroorganisme pencernaan (Watanabe *et al.*, 2020). Selama proses fermentasi, berbagai komponen kompleks penyusun buah kopi dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana dan membentuk kualitas sensorik yang unik (Muzaifa *et al.*, 2019).

Penelitian menunjukkan bahwa saluran pencernaan luwak mengandung komunitas mikroorganisme yang beragam, meliputi bakteri asam laktat/non, khamir, dan mikroorganisme penghasil enzim hidrolitik (de Carvalho Neto *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2020). Mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim seperti selulase, amilase, dan enzim hidrolitik lainnya yang berperan dalam mendegradasi komponen penyusun buah atau *cherry* kopi. Proses hidrolisis tersebut tidak hanya menyediakan nutrisi bagi mikroorganisme, tetapi juga menghasilkan berbagai prekursor aroma dan senyawa volatil yang berkontribusi terhadap pembentukan karakteristik khas kopi luwak (Kusmiyati *et al.*, 2020). Oleh karena itu, mikroorganisme asal saluran pencernaan luwak berpotensi besar untuk dikembangkan sebagai agen fermentasi pada sistem produksi kopi secara terkontrol dan terstandar (de Carvalho Neto *et al.*, 2018; Hadipernata & Nugraha, 2018).

Penelitian sebelumnya berhasil mengisolasi sepuluh jenis bakteri asal feses luwak, yang hidup endosimbion pada sistem pencernaan luwak (Amadea, 2025). Kemampuan mendegradasi senyawa polisakarida tersebut menunjukkan bakteri asal feses luwak memiliki kapasitas metabolik untuk menghidrolisis biomassa kompleks menjadi gula sederhana dalam proses fermentasi. Potensi ini menjadikan bakteri asal feses luwak sebagai kandidat inokulum mikroba yang menjanjikan dalam pengembangan fermentasi kopi berbasis mikroorganisme.

Proses fermentasi berkelanjutan membutuhkan agen atau *starter* dengan peluang viabilitas tinggi untuk mempertahankan aktivitas enzimatisnya pada substrat alami yang kompleks masih sangat terbatas. Hal ini penting untuk menentukan kemampuan bakteri untuk bertahan hidup, beradaptasi, dan tetap aktif menghasilkan enzim selama proses fermentasi berlangsung (Kalaiselvan *et al.*, 2025; Yafetto, 2022). Salah satu bahan yang berpotensi digunakan sebagai sumber karbon sekaligus biocarrier bagi inokulum bakteri tersebut adalah kulit tanduk kopi Arabika (*coffee parchment*). Kulit tanduk kopi merupakan salah satu limbah agroindustri kopi yang jumlahnya melimpah, namun pemanfaatannya masih relatif rendah mengandung selulosa sekitar 30–49%, hemiselulosa sekitar 21–32%, dan lignin sekitar 20–35% (Campuzano *et al.*, 2024; Gondim *et al.*, 2024; Mesa *et al.*, 2024). Kandungan lignoselulosa yang tinggi menyebabkan kulit tanduk kopi memiliki struktur padat dan berserat yang relatif resisten terhadap degradasi biologis.

Karakteristik tersebut memberikan peluang bagi kulit tanduk kopi untuk dikembangkan sebagai *biocarrier* bagi bakteri selulolitik dan amilolitik asal feses luwak. Struktur berserat pada kulit tanduk kopi dapat menyediakan permukaan perlekatan (*attachment surface*), melindungi sel bakteri dari tekanan lingkungan, serta menyediakan sumber karbon secara bertahap melalui proses biodegradasi lignoselulosa (Andrea *et al.*, 2024; Gondim *et al.*, 2024; Kalaiselvan *et al.*, 2025). Pemanfaatan bahan lignoselulosa banyak dikembangkan dalam proses fermentasi dan biokonversi karena mampu meningkatkan stabilitas, mempertahankan viabilitas, dan memperpanjang aktivitas metabolik mikroorganisme selama penyimpanan maupun proses fermentasi berlangsung (Andrea *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023; Yafetto, 2022).

Informasi mengenai kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dan mempertahankan aktivitas enzim selulase serta amilasena pada media berbasis kulit tanduk kopi diperlukan sebagai tahap awal dalam merancang sistem inokulum yang stabil dan aplikatif. Bakteri yang memiliki viabilitas tinggi dan tetap aktif menghasilkan enzim selama fermentasi berpotensi dikembangkan sebagai konsorsium mikroba atau *starter culture* yang dapat diaplikasikan sebagai agen

fermentasi kopi secara terkontrol pada skala industri. Pendekatan analisis genetik molekuler perlu dilakukan, untuk mengetahui jenis atau kelompok genus bakteri yang memiliki viabilitas dan aktivitas enzimatis tinggi. Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai viabilitas bakteri selulolitik dan amilolitik asal feses luwak menggunakan media karbon kulit tanduk kopi Arabika serta jenisnya dari analisis molekuler. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan kesepuluh isolat bakteri dalam mempertahankan pertumbuhan dan aktivitas enzim selulase dan amilase selama fermentasi.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Bagaimana viabilitas dan kestabilan isolat bakteri dengan metode SSF menggunakan kulit tanduk kopi sebagai penyedia sumber karbon didalam media pertumbuhan?
2. Bagaimana aktivitas selulase dan amilase yang dihasilkan oleh bakteri ketika digunakan sumber karbon dari kulit tanduk kopi sebagai media pertumbuhan?
3. Bagaimana analisis genetik molekuler untuk mengetahui genus dari bakteri dengan viabilitas dan aktivitas enzim yang tinggi?

1.3 Batasan Penelitian

Batasan penelitian ini sebagai berikut :

1. Objek penelitian dibatasi pada penggunaan bakteri fermentatif hasil isolasi (IFL 1, IFL2, IFL4, IFL6, IFL 8, IFL 9, IFL 10, IFL 11 IFL 13 dan IFL 14) yang berpotensi selulolitik dan amilolitik.
2. Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini dibatasi pada kulit tanduk kopi (*endocarp*) yang berasal dari proses pengupasan biji kopi arabika yang telah melalui proses pengeringan.
3. Parameter utama yang dianalisis meliputi: (a) viabilitas isolat bakteri pada media fermentasi berbasis kulit tanduk kopi, (b) aktivitas enzim selulase yang dihasilkan selama proses fermentasi dan amilase dari

seluruh isolat, dengan pertimbangan bahwa hewan luwak juga mengonsumsi buah kopi (*cherry coffee*) yang mengandung amilum dalam *pulp* kopi. (c) analisis molekuler untuk mengetahui jenis bakteri terpilih yang mempunyai viabilitas dan aktivitas enzim yang tinggi.

4. Proses fermentasi dilakukan dalam skala laboratorium, sehingga hasil yang diperoleh merupakan kajian awal (*proof of concept*) yang masih perlu dikembangkan lebih lanjut untuk aplikasi skala industri.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini sebagai berikut:

1. Memperoleh data viabilitas dan kestabilan pertumbuhan isolat bakteri dengan metode SSF, sehingga diketahui kemampuannya dalam memanfaatkan sumber karbon dari media kulit tanduk kopi.
2. Mendeteksi aktivitas enzim selulase dan amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri selama proses fermentasi menggunakan media kulit tanduk kopi dan analisis molekuler tiap isolat.
3. Menganalisis jenis bakteri secara molekuler yang memiliki viabilitas dan aktivitas tinggi.

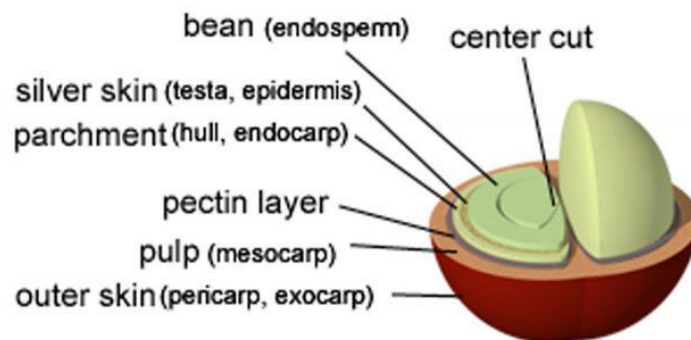
1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini menyediakan data empiris mengenai kemampuan viabilitas isolat bakteri dalam memanfaatkan sumber karbon media kulit tanduk. Aktivitas enzim selulase dan amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri hasil skrining dari feses luwak dapat menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan sistem fermentasi terkendali. Selain itu, penelitian ini sebagai metode alternatif yang meniru proses biokimia dalam saluran pencernaan hewan luwak secara etis, berkelanjutan, dan terstandar secara ilmiah.

BAB 2. TINJAUAN TEORI

2.1 Struktur Buah Kopi

Kopi memiliki struktur buah yang terdiri dari eksokarp (kulit) bagian paling luar, selanjutnya mesokarp (daging buah/*pulp*), lendir, endokarp (kulit tanduk/*parchment*), *silverskin* atau kulit ari dan biji berada di lapisan paling dalam (Hussin, 2018) yang dapat dilihat pada Gambar 2.1. Kulit tanduk merupakan lapisan yang melindungi biji, terletak diantara *pectin layer* dan *silverskin*.



Gambar 2.1 Struktur Buah Kopi (Sumber : Coffeeland Indonesia.com)

Parchment sebagai lapisan pelindung, memiliki serat dengan derajat kristalinitas tinggi dan ikatan lignoselulosa yang kuat, menjadikannya lebih resisten terhadap degradasi kimia dan biologis dibandingkan bagian lain dari buah kopi. Perspektif bioindustri, *coffee parchment* merupakan limbah yang melimpah dan seringkali kurang termanfaatkan, padahal volumenya mencapai 4–12% dari berat biji kopi kering. Komposisi kimia mencakup selulosa tinggi (30–49%) dan lignin sedang (20–28%), *parchment* dapat berfungsi sebagai substrat fermentasi, bahan baku biopolimer, atau sumber serat pangan (Mesa *et al.*, 2024). Menurut penelitian (Gondim *et al.*, 2024) kadar selulosa *parchment* sekitar 48%, hemiselulosa mendekati 32% dan lignin mendekati 35%. Selain itu lapisan *pulp* memiliki kandungan amilum sebesar 45,67%, 10,63% protein dan 36,07% fiber di bagian *pulp* (Fierro *et al.*, 2018) dalam (Rivera *et al.*, 2024). Secara keseluruhan, kandungan yang dimiliki oleh kulit kopi dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Aswanto *et al.*, 2023; Gondim *et al.*, 2024; Rivera *et al.*, 2024).

Tabel 2.1 Kandungan Pada Lapisan Kulit Buah Kopi

Kandungan	Kadar (%)
Amilum	45,67
Protein	10,63
Fiber	36,07
Lemak	2,53
Serat	25,28
Selulosa	48
Hemiselulosa	35
Lignin	32

2.2 Fermentasi Kopi dan Transformasi Biokimia Selama Proses Fermentasi

Fermentasi merupakan salah satu tahapan pascapanen yang sangat menentukan mutu akhir kopi. Selama fermentasi, terjadi transformasi berbagai senyawa organik melalui aktivitas enzim endogen buah kopi dan metabolisme mikroorganisme yang berkembang pada permukaan maupun bagian internal buah. Transformasi tersebut menyebabkan perubahan komposisi gula, protein, polisakarida, asam organik, dan senyawa volatil yang selanjutnya memengaruhi karakteristik sensori kopi, meliputi aroma, cita rasa, *body*, *acidity*, dan *aftertaste* (Bruyn *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015).

Proses fermentasi kopi pada dasarnya merupakan sistem biodegradasi alami yang melibatkan interaksi kompleks antara substrat buah kopi dan komunitas mikroba. Mikroorganisme memanfaatkan berbagai komponen organik, terutama karbohidrat dan senyawa nitrogen, sebagai sumber energi dan nutrisi untuk pertumbuhannya. Sebagai konsekuensinya, berbagai metabolit sekunder, asam organik, alkohol, ester, dan senyawa aromatik dihasilkan selama fermentasi dan berkontribusi terhadap pembentukan kualitas akhir kopi (Bruyn *et al.*, 2017; Gilberto *et al.*, 2017).

Fermentasi yang berlangsung di dalam saluran pencernaan hewan, termasuk pada luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) merupakan bentuk fermentasi biologis

yang unik karena berlangsung dalam lingkungan yang kaya mikroorganisme dan enzim hidrolitik. Sistem tersebut memungkinkan terjadinya modifikasi komponen buah kopi secara lebih intensif sehingga menghasilkan profil kimia dan sensori yang berbeda dibandingkan kopi yang diproses secara konvensional (Marcone, 2004; Watanabe *et al.*, 2020). Penelitian terkini menunjukkan bahwa pemanfaatan mikroorganisme pencernaan sebagai *starter* fermentasi mampu menghasilkan karakteristik kopi yang mendekati kopi luwak alami melalui pendekatan fermentasi terkontrol (Ngamnok *et al.*, 2023).

2.3 Mikroorganisme Pencernaan Luwak dan Potensinya dalam Fermentasi Kopi

Saluran pencernaan mamalia merupakan habitat bagi komunitas mikroba yang memiliki kapasitas metabolik tinggi dalam mendegradasi bahan organik kompleks. Keberadaan mikroorganisme tersebut memungkinkan berlangsungnya berbagai reaksi hidrolisis terhadap polisakarida, protein, lipid, dan senyawa organik lainnya melalui produksi enzim ekstraseluler (de Carvalho Neto *et al.*, 2018). Penelitian mengenai mikrobiota pencernaan luwak menunjukkan adanya komunitas bakteri yang beragam, meliputi kelompok bakteri asam laktat, Enterobacteriaceae, Bacillaceae, dan berbagai bakteri fermentatif lainnya yang menunjukkan aktivitas hidrolitik terhadap substrat lignoselulosa dan patin (Watanabe *et al.*, 2020).

Sebagian besar bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim pektinase, protease, selulase, amilase, maupun lipase yang berperan dalam perombakan komponen penyusun buah kopi selama fermentasi (Ngamnok *et al.*, 2023). Keberadaan mikroorganisme pencernaan luwak menjadi menarik dari perspektif bioteknologi karena menyediakan sumber inokulum alami yang telah beradaptasi terhadap lingkungan fermentatif dan memiliki kemampuan memanfaatkan substrat buah kopi sebagai sumber nutrisi. Karakteristik tersebut menjadikan mikroorganisme pencernaan luwak berpotensi dikembangkan sebagai starter culture untuk fermentasi kopi terkontrol dan berkelanjutan (de Carvalho Neto *et al.*, 2018; Hadipernata & Nugraha, 2018).

2.4 Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Sebagai Agen Biokonversi Biomassa

Bakteri selulolitik merupakan kelompok mikroorganisme yang mampu memanfaatkan selulosa melalui produksi kompleks enzim selulase. Aktivitas selulolitik memungkinkan terjadinya depolimerisasi polisakarida menjadi gula sederhana yang kemudian digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhan sel. Sebaliknya, bakteri amilolitik menghasilkan enzim amilase yang menghidrolisis pati menjadi oligosakarida, maltosa, dan glukosa yang lebih mudah dimetabolisme (Gupta *et al.*, 2003; Lynd *et al.*, 2002).

Kemampuan menghasilkan enzim hidrolitik mempunyai implikasi penting dalam proses fermentasi berbasis biomassa lignoselulosa. Mikroorganisme yang mampu mengonversi polisakarida kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana umumnya memiliki daya adaptasi yang lebih baik pada substrat dengan ketersediaan nutrisi rendah. Oleh karena itu, aktivitas selulolitik dan amilolitik sering digunakan sebagai indikator potensi metabolik mikroorganisme pada berbagai proses fermentasi dan biokonversi biomassa (Bhat, 2000; Lynd *et al.*, 2002).

2.5 Kulit Tanduk Kopi (*Coffee Parchment*) Sebagai Biomassa Lignoselulosa

Kulit tanduk kopi atau *coffee parchment* merupakan lapisan endokarp yang menyelimuti biji kopi dan terbentuk setelah proses perkembangan buah. Material ini tersusun oleh jaringan serat yang mempunyai tingkat kristalinitas tinggi dan didominasi oleh polimer struktural penyusun dinding sel tanaman (Mesa *et al.*, 2024). Secara kimia, *coffee parchment* mengandung selulosa sekitar 30–49%, hemiselulosa 21–32%, dan lignin sekitar 20–35% (Campuzano *et al.*, 2024; Gondim *et al.*, 2024; Mesa *et al.*, 2024). Proporsi lignoselulosa yang tinggi menyebabkan material ini bersifat relatif resisten terhadap dekomposisi alami.

Karakteristik tersebut justru memberikan nilai tambah karena menyediakan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan secara bertahap melalui aktivitas mikroorganisme pendegradasi lignoselulosa. Pemanfaatan limbah lignoselulosa sebagai substrat fermentasi telah berkembang secara luas dalam berbagai proses

produksi enzim, biokonversi biomassa, dan pengembangan kultur starter. Keuntungan limbah lignoselulosa memiliki ketersediaan tinggi, biaya rendah, serta mengandung komponen karbon yang memadai untuk menunjang pertumbuhan mikroorganisme (Pandey *et al.*, 2000; Soccol *et al.*, 2017).

2.6 Kulit Tanduk Kopi Sebagai *Biocarrier* Mikroorganisme

Biocarrier merupakan material padat yang berfungsi sebagai tempat perlekatan, perlindungan, dan penyangga metabolik bagi sel mikroorganisme. Material lignoselulosa diketahui mampu meningkatkan ketahanan sel terhadap perubahan lingkungan melalui pembentukan mikrohabitat yang mendukung pertumbuhan dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Nguyen *et al.*, 2023). Struktur serat pada *coffee parchment* memiliki luas permukaan yang relatif tinggi dan mampu menyerap air serta nutrien dalam jumlah tertentu. Karakteristik tersebut memungkinkan terbentuknya ruang mikro yang mendukung kolonisasi sel bakteri dan mempertahankan viabilitasnya selama proses fermentasi berlangsung. Selain itu, degradasi bertahap komponen lignoselulosa dapat menyediakan sumber karbon secara kontinu sehingga membantu mempertahankan aktivitas metabolik mikroorganisme dalam jangka waktu yang lebih lama (Andrea *et al.*, 2024; Kalaiselvan *et al.*, 2025).

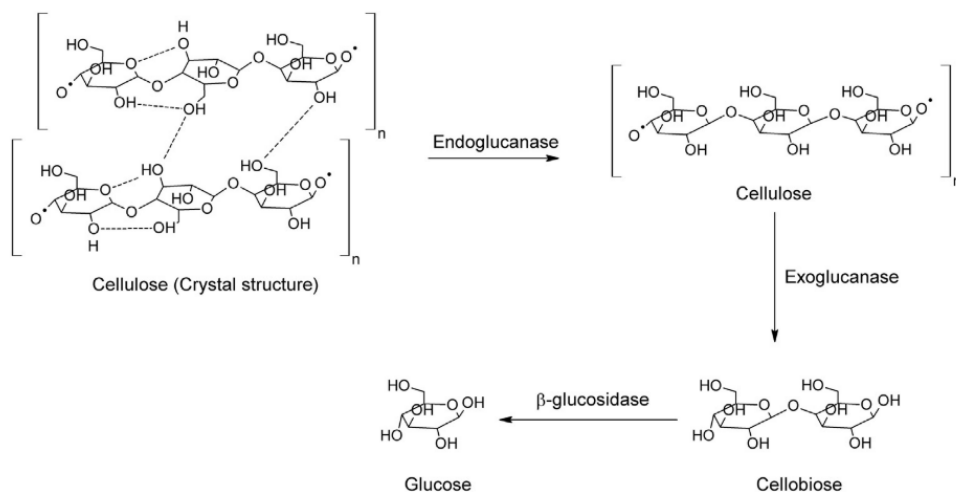
2.7 *Solid State Fermentation* (SSF)

Solid State Fermentation (SSF) merupakan sistem fermentasi yang menggunakan substrat padat dengan kadar air bebas yang rendah sebagai tempat pertumbuhan mikroorganisme. Kondisi tersebut menyerupai habitat alami berbagai mikroorganisme yang hidup pada material organik padat sehingga mendukung kolonisasi sel dan produksi metabolit ekstraseluler (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009). SSF banyak diaplikasikan pada proses fermentasi biomassa lignoselulosa karena menghasilkan efisiensi konversi substrat yang tinggi, kebutuhan energi yang lebih rendah, serta risiko kontaminasi yang relatif kecil dibandingkan fermentasi cair. Selain itu, berbagai penelitian menunjukkan bahwa produksi enzim hidrolitik, terutama selulase dan amilase, sering kali lebih tinggi pada sistem SSF

dibandingkan sistem *submerged fermentation* (Pandey *et al.*, 2000; Soccol *et al.*, 2017).

2.8 Enzim Selulase dan Mekanisme Hidrolisis Selulosa

Selulase merupakan kelompok enzim yang bekerja secara sinergis dalam menghidrolisis ikatan β -(1,4)-glikosidik pada molekul selulosa. Sistem selulase terdiri atas endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase (Gambar 2.2). Ketiga enzim tersebut bekerja secara berurutan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir (Yoon *et al.*, 2014). Aktivitas selulase menjadi indikator penting dalam evaluasi kemampuan mikroorganisme memanfaatkan biomassa lignoselulosa. Semakin tinggi kemampuan menghasilkan selulase, semakin besar peluang mikroorganisme untuk menggunakan selulosa sebagai sumber karbon dan mempertahankan pertumbuhan pada substrat yang miskin gula sederhana (Lynd *et al.*, 2002).

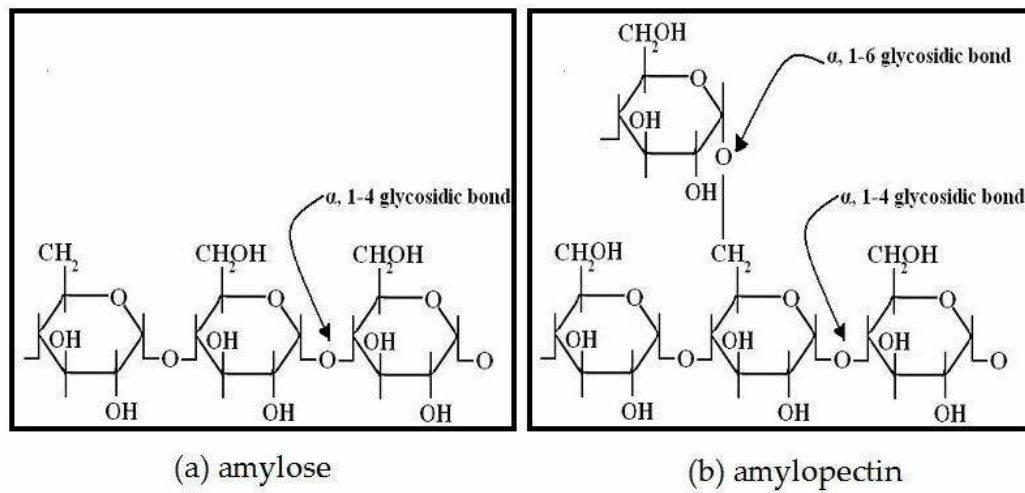


Gambar 2.2 Mekanisme Hidrolisis Enzim Selulase (Yoon *et al.*, 2014)

2.9 Enzim Amilase dan Mekanisme Hidrolisis Pati

Amilase merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan α -(1,4)-glikosidik dan α -(1,6)-glikosidik pada molekul pati (Gambar 2.3). Berdasarkan pola pemotongannya, amilase dibedakan menjadi α -amilase, β -

amilase, dan γ -amilase. Aktivitas enzim tersebut menghasilkan glukosa, maltosa, dan dekstrin yang selanjutnya dimanfaatkan sebagai sumber energi oleh mikroorganisme (Gupta *et al.*, 2003). Evaluasi aktivitas amilase pada bakteri asal feses luwak penting dilakukan karena kemampuan mendegradasi pati menunjukkan fleksibilitas metabolik mikroorganisme dalam memanfaatkan berbagai jenis polisakarida yang terdapat pada buah kopi dan lingkungan fermentasinya.



Gambar 2.3 Struktur Kimia Amilosa dan Amilopektin (Muharam *et al.*, 2022)

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

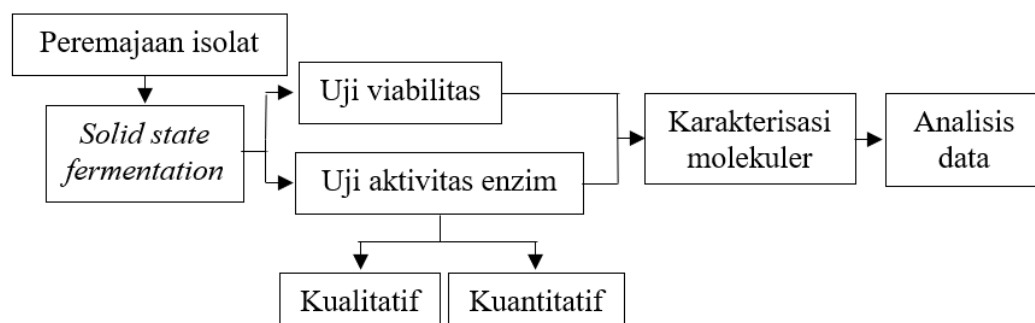
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2025 sampai Juni 2026.

3.2 Populasi dan Sampel/Subyek Penelitian

Populasi subyek penelitian yang digunakan adalah bakteri selulolitik yang diidentifikasi pada penelitian sebelumnya dari feses luwak yang terdapat 10 isolat. Sumber karbon yang digunakan pada media yaitu kulit tanduk kopi untuk menguji viabilitas pertumbuhan bakteri dan kestabilan dalam memproduksi enzim selulase dan amilase.

3.3 Desain Penelitian

Bagan alir penelitian Viabilitas Bakteri Selulolitik dan Amilolitik Asal Feses Luwak Menggunakan Media Karbon Kulit Tanduk Kopi Arabika dapat dilihat pada Gambar 3.1. Penelitian ini menguji viabilitas isolat dalam memanfaatkan sumber karbon kulit tanduk kopi selama proses fermentasi 8 minggu. Aktivitas enzim yang dimiliki isolat juga diuji secara kualitatif dan kuantitatif, disamping itu dilakukan karakterisasi molekuler untuk mengetahui jenis genus isolat.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1. Uji Viabilitas Isolat

Pengujian viabilitas isolat menggunakan metode Fermentasi menggunakan kulit tanduk steril semi halus sebanyak 500 mg diinokulasikan dengan 1 mL masing-masing kultur IFL didalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 8 minggu pada suhu 37 °C. Pemanenan dilakukan setiap minggu ke 1, 2, 3, 4, 6 dan 8 dengan menambahkan NaCl 1 % 5 mL setiap sampel, diinkubasi selama 30 menit menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C. **Uji viabilitas** dilakukan dengan menumbuhkan sebanyak 100 µL sampel media NB (Lampiran 3.1), diinkubasi selama 48 jam di dalam shaker suhu 37°C kecepatan 120 rpm. Kultur 48 jam diamati kekeruhannya untuk mengetahui **viabilitasnya** setelah 8 minggu fermentasi menggunakan kulit tanduk (SSF).

Perhitungan populasi dilakukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk mengetahui jumlah isolat bakteri yang diinokulasikan ke setiap tabung fermentasi kulit tanduk. Teknik *spread plate* dilakukan dengan menginokulasikan 100 µL pada media NA (Lampiran 3.2) pada pengenceran 10^{-9} dan 10^{-10} menggunakan larutan NaCl 0,9% sebanyak 4,5 mL setiap tabung dan penambahan kultur 500 µL. Inkubasi dilakukan selama 24 – 72 jam suhu 37°C. Koloni dihitung menggunakan rumus 3.1 (Nisa'A'yunin *et al.*, 2025).

$$CFU = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \quad \dots\dots\dots(3.1)$$

3.4.2. Estraksi Selulosa dan Pembuatan Media Ekstrak Kulit Tanduk

Ekstraksi selulosa menggunakan 200 gram kulit tanduk halus yang dihidrolisis dengan 1,5 liter larutan NaOH 1 M (Lampiran 3.3) selama 12 jam suhu 60°C terus diaduk. Larutan didinginkan menggunakan suhu ruang, diukur pH sampai 6 menggunakan sodium asetat dan didiamkan beberapa saat sampai mengendap. Supernatan diambil dan disaring menggunakan kertas filter serta didialisis dengan membran dialisis filter berukuran 10 kd. Hasil dialisis dievaporasi untuk mengurangi kadar pelarut sehingga lebih pekat dan diperoleh volume sekitar 50 mL. Larutan dipresipitasi dengan ethanol 97% (8:2) menggunakan sentrifugasi

10.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dikeringkan secara terbuka di oven selama 2 jam suhu 55°C dan disimpan pada suhu 4°C.

3.4.3. Uji Aktivitas Enzim (kualitatif)

Isolat bakteri yang dapat tumbuh dan bertahan pada media NB sampai minggu terakhir, ditumbuhkan kembali pada media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) (Lampiran 3.4) dan *Soluble Starch Agar* (SSA) (Lampiran 3.5), masing-masing 1% pada cawan petri. Kultur isolat diinokulasikan menggunakan ujung tusuk gigi ke atas media metode dot pada tengah media dan diinkubasi selama 48 jam suhu 37°C. Aktivitas enzim selulase diamati zona beningnya dengan pewarnaan menggunakan *congo red* 0,1% yang didiamkan 30 menit dan dicuci dengan larutan NaCl 1 M (Lampiran 3.6) selama 15 menit hingga terlihat. Aktivitas enzim amilase diamati zona yang terbentuk dengan diberi pewarna iodin 0,33% (Lampiran 3.7) selama 1-2 menit hingga terlihat. Zona bening setiap isolat diukur diameter vertikal dan horizontal menggunakan jangka sorong dan dihitung indeksinya dengan rumus 3.2 (Choi *et al.*, 2005) dalam (Isnaini & Muslimin, 2020). Isolat bakteri dengan indeks zona bening 3 terbesar diujikan pada media NA *plate* yang telah ditambahkan ekstrak selulosa kulit tanduk kopi (Lampiran 3.11). Teknik inokulasi dan pewarnaan yang sama untuk mengamati zona bening yang terbentuk.

$$\text{indeks zona bening} = \frac{\text{diameter zona} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}} \quad \dots\dots(3.2)$$

3.4.4. Uji Aktivitas Enzim (kuantitatif)

Produksi enzim dilakukan dengan menumbuhkan 1 mL kultur pada 5 gram media SSF yaitu *powder* kulit tanduk dalam kondisi jenuh, diinkubasi selama 72 jam. Pemanenan dengan ditambahkan NaCl 1% sebanyak 5 mL, diinkubasi dalam *thermoshkaer* selama 4 jam 120 rpm, dan disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan atau *crude* enzim yang akan diuji dengan metode *somogyi nelson* dan *blue value*. Larutan pati/amilum 1 % (Lampiran 3.8) untuk membuat kurva kalibrasi (selulase) dan kurva standar (amilase) menggunakan konsentrasi 0; 0.02; 0.04; 0.06; 0.08 dan 0.1 (mg/mL).

Uji kualitatif enzim selulase metode *somogyi nelson* menggunakan 1% substrat CMC dalam buffer fosfat 20 mM pH 6,2 (Lampiran 3.9) sebanyak 900 µL ditambahkan 100 µL ekstrak enzim, diinkubasi selama 30 menit suhu 37°C, ditambahkan 1 mL reagen *somogyi*. Sampel direbus pada suhu 100°C, didinginkan, ditambahkan 1 mL reagen *nelson*, dihomogenkan dengan *vortex* dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 500 nm. Aktivitas enzim dihitung menggunakan rumus 3.3 (Wahyuningtyas *et al.*, 2013). Hal yang sama dilakukan menggunakan substrat ekstrak kulit tanduk 1% (Lampiran 12).

$$IU = \frac{\mu M \text{ glukosa}}{t \times Ve} \dots\dots\dots (3.3)$$

Uji kualitatif enzim amilase metode *blue value* menggunakan 0,1% substrat pati dalam buffer fosfat 20 mM pH 6,2 sebanyak 100 µL ditambahkan 250 µL ekstrak enzim dan 250 µL buffer, diinkubasi selama 3 jam suhu 37°C. Sampel ditambahkan 1 mL HCL 0,1 M (Lampiran 3.10) dan 1 mL iodin-KI, didiamkan selama 5 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600nm. Penurunan absorbansi dibandingkan kontrol menunjukkan tingkat aktivitas enzim. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan rumus 3.4.

$$IU = \frac{\Delta A \times V_{total}}{\epsilon \times l \times Ve \times t} \dots\dots\dots (3.4)$$

3.4.5. Analisis Filogenetik Isolat

a. Isolasi DNA bakteri

Microtube volume 2 mL ditimbang dalam keadaan kosong. Pemanenan sel dilakukan dengan mengisi *microtube* sebanyak 2 mL kultur cair dari isolat bakteri, disentrifus pada kecepatan 11.000 x g selama 10 menit. Langkah ini diulangi hingga berat basah sel sebanyak 50-100 mg. Isolasi DNA dimulai dengan meresuspensikan sel dalam 200 µL PBS dan 750 µL *BashingBead* Buffer ke dalam *ZR BashingBead Lysis Tube*. Tube divortex 20 menit, disentrifugasi kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke *column filter tube*, disentrifugasi kecepatan 8.000 x g selama 1 menit. Filtrat dalam tube ditambahkan 1,2 mL *Genomic lysis buffer*, dan sebanyak 800 µL dipindahkan ke *column filter tube* dan disentrifugasi

kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. *Filter column* diambil, dipindahkan ke tube baru dan cairan *flow through* dibuang, langkah ini diulangi pada sisa cairan sebelumnya. *Column filter* ditambahkan 200 μ L DNA *Pre-wash buffer*, disentrifugasi kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. *Column filter* dipindahkan ke tube baru, ditambahkan 500 μ L g-DNA *Wash buffer* dan disentrifugasi kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. *Column filter* dipindahkan ke tube baru, ditambahkan 100 μ L DNA *elution buffer* dan disentrifugasi kecepatan 10.000 x g selama 30 detik, filtrat yang diperoleh adalah cairan DNA.

b. Amplifikasi DNA Bakteri

Amplifikasi DNA menggunakan *primer universal* yaitu 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') sebagai penanda gen 16S rRNA dengan target mencapai 1.500 bp. Reagen PCR yang terdiri atas 25 μ L PCR master mix (mengandung Taq *polymerase*, dNTP, MgCl_2 , dan buffer reaksi), primer masing-masing 2,5 μ L dan 4 μ L DNA *template*. *Coctail* diresuspensikan dan diamplifikasi menggunakan mesin PCR dengan pengaturan tabel 3.1. Visualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1% yang dilarutkan pada buffer TAE ditambahkan 4 μ L Etidium Bromida (EtBr). Buffer *running* menggunakan TAE dan *Marker* 10 kb.

c. Analisis sekuensing

Sampel diproses sekuensing untuk mendapatkan kontig sekuens *forward* dan *reverse* yang nantinya akan dianalisis menggunakan *software* BioEdit, MEGA 12 serta homogenitas pada BLASTn NCBI. Analisis similaritas dilakukan menggunakan pendekatan matrix jarak kedekatan gen dengan spesies terpilih berdasarkan hasil BLASTn. Pohon filogenetik dibuat menggunakan *Neighbor-Joining* (NJ) *tree* metode *Maximum Composite Likelihood*, *bootstrap* 1000x pada fitur MEGA 12 (Siddique *et al.*, 2023).

Tabel 3. 1 Pengaturan Suhu dan Durasi PCR

<i>Treatment</i>	<i>Temperature</i>	<i>Duration</i>
Denaturasi	94°C	5 menit
Elongasi	56°C	1 menit
<i>Annealing</i>	72°C	1 menit
<i>Extention</i>	72°C	10 menit
Siklus 24x		

3.5 Pengumpulan Data Penelitian

Data penelitian primer diperoleh dari hasil eksperimen viabilitas dan aktivitas bakteri selulolitik dan amilolitik secara kualitatif berupa zona bening dan kuantitatif berupa grafik aktivitas enzim selulase dan amilase. Selain itu, analisis profil molekuler berupa genus dengan similaritas tertinggi dan pohon filogenetik sebagai visualisasi kekerabatan isolat dengan beberapa genus terkait.

3.6 Alat/Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, tabung *falcon*, timbangan analitik, mikropipet, *waterbath*, *sentrifuge*, *laminar air flow*, cawan petri, jarum inokulasi, mikrotip, labu erlenmeyer, gelas ukur, kertas lakmus, gelas Beaker, mikrotube, *shaker*, oven/inkubator, autoklaf, *vortex*, spektrofotometer, PCR, elektroforesis. Analisis data menggunakan *software Microsoft excel*, Bioedit, NCBI, MEGA 12 untuk menganalisis grafik aktivitas enzim selulase dan amilase serta analisis molekuler isolat.

3.7 Metode Analisis

Analisis data absorbansi aktivitas enzim selulase dan amilase diolah menggunakan *Microsoft excel*, kemudian ditampilkan dalam bentuk grafik sebagai data kuantitatif. Hasil viabilitas bakteri ditampilkan berupa dokumentasi kekeruhan media setelah masa fermentasi selama 8 minggu, dan dokumentasi zona bening menggunakan media CMC, SSA dan media ekstrak kulit tanduk untuk data

kualitatif. Analisis profil molekuler isolat terpilih, diolah menggunakan Bioedit untuk mendapatkan consensus, kemudian dilakukan BLASTn pada fitur NCBI untuk memperoleh genus dengan similaritas tinggi. Consensus isolat disejajarkan dengan genus sejenis untuk melihat kekerabatannya pada visualisasi pohon filogenetik menggunakan MEGA 12.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Viabilitas

Viabilitas mikroorganisme merupakan salah satu parameter biologis yang sangat penting dalam pengembangan kultur starter fermentasi. Viabilitas mencerminkan kemampuan sel untuk mempertahankan kehidupan, aktivitas metabolisme, serta kapasitas menghasilkan metabolit dan enzim selama proses fermentasi berlangsung. Mikroorganisme yang memiliki viabilitas tinggi akan tetap aktif melakukan sintesis protein, menghasilkan enzim ekstraseluler, serta mampu memanfaatkan substrat secara berkelanjutan sehingga proses biokonversi biomassa dapat berlangsung secara optimal. Oleh karena itu, pengujian viabilitas menjadi tahapan awal yang penting sebelum dilakukan evaluasi aktivitas enzim selulase dan amilase pada isolat bakteri asal feses luwak. Pada sistem SSF, viabilitas kultur *starter* menjadi salah satu indikator utama keberhasilan fermentasi yang berkaitan erat dengan kemampuan mikroorganisme beradaptasi terhadap kondisi substrat padat, mempertahankan metabolisme, dan memproduksi enzim selama proses fermentasi berlangsung (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009; Soccol *et al.*, 2017; Yafetto, 2022).

Seluruh isolat terlebih dahulu dihitung jumlah populasinya menggunakan metode TPC sebelum diaplikasikan dalam fermentasi, untuk memastikan bahwa setiap isolat memiliki jumlah sel yang memadai sebagai kultur awal (*starter culture*). Media NA digunakan karena mengandung pepton sebagai sumber nitrogen dan karbon, sedangkan yeast *extract* menyediakan vitamin, asam amino, serta berbagai faktor pertumbuhan yang diperlukan oleh bakteri untuk berkembang secara optimal. Perhitungan populasi melalui metode TPC merupakan metode standar untuk menentukan jumlah sel hidup yang mampu membentuk koloni pada media padat (Suharman *et al.*, 2023). Menurut Rivera *et al.* (2024), inokulum dengan kepadatan lebih besar dari 10^7 CFU/mL umumnya mempunyai kemampuan adaptasi yang lebih baik sehingga mampu mempercepat kolonisasi substrat dan meningkatkan keberhasilan fermentasi.

Berdasarkan hasil perhitungan populasi yang disajikan pada Tabel 4.1, seluruh isolat mempunyai jumlah populasi di atas batas minimum yang direkomendasikan sebagai kultur starter. Populasi tertinggi diperoleh pada isolat IFL 14 sebesar $43,1 \times 10^9$ CFU/mL, sedangkan populasi terendah terdapat pada IFL 6 sebesar $5,85 \times 10^7$ CFU/mL. Meskipun terdapat variasi jumlah populasi antar isolat, seluruh isolat memenuhi persyaratan sebagai inokulum fermentasi karena memiliki kepadatan sel yang cukup tinggi. Kepadatan populasi awal yang tinggi diketahui mampu memperpendek fase adaptasi (*lag phase*), meningkatkan kemampuan kolonisasi substrat, serta mengurangi peluang berkembangnya mikroorganisme kontaminan selama fermentasi (Madigan *et al.*, 2021; Tortora *et al.*, 2021).

Tabel 4. 1 Hasil Perhitungan Populasi (CFU/mL)

Kode Isolat	Jumlah Koloni (CFU/mL)
IFL 1	20×10^7
IFL 2	$39,2 \times 10^9$
IFL 4	$34,5 \times 10^7$
IFL 6	$58,5 \times 10^6$
IFL 8	$26,5 \times 10^7$
IFL 9	$36,8 \times 10^8$
IFL 10	14×10^9
IFL 11	$50,5 \times 10^7$
IFL 13	$27,4 \times 10^9$
IFL 14	$43,1 \times 10^9$

Menariknya, hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah populasi awal tidak selalu berbanding lurus dengan kemampuan mempertahankan viabilitas selama fermentasi. Isolat IFL 14, yang memiliki populasi awal tertinggi, justru kehilangan viabilitas setelah minggu keempat fermentasi, sedangkan IFL 6, yang mempunyai populasi awal relatif lebih rendah, masih mampu bertahan hingga minggu kedelapan. Fenomena tersebut menunjukkan bahwa keberhasilan suatu isolat selama fermentasi tidak hanya ditentukan oleh besarnya populasi awal, tetapi

lebih dipengaruhi oleh kemampuan fisiologisnya dalam beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan fermentasi. Adaptasi tersebut meliputi kemampuan mempertahankan integritas membran sel, mengatur keseimbangan energi, mempertahankan aktivitas enzimatik, serta memanfaatkan substrat kompleks sebagai sumber karbon ketika nutrisi sederhana mulai berkurang (Stanbury *et al.*, 2017; Soccol *et al.*, 2017).

Fenomena tersebut dapat dijelaskan berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri. Setelah diinokulasikan ke dalam media fermentasi, bakteri terlebih dahulu memasuki fase lag, yaitu fase adaptasi ketika sel belum mengalami peningkatan jumlah secara nyata, tetapi melakukan sintesis RNA, protein, dan enzim yang diperlukan untuk memanfaatkan substrat baru. Lama fase ini sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis inokulum, komposisi media, dan kemampuan bakteri menyesuaikan diri terhadap lingkungan fermentasi (Rolfe *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2021). Ketika adaptasi selesai, bakteri memasuki fase log (eksponensial) yang ditandai oleh pembelahan sel secara aktif disertai peningkatan aktivitas metabolisme. Pada fase ini produksi enzim ekstraseluler, termasuk selulase dan amilase, berlangsung secara intensif sehingga mikroorganisme mampu memanfaatkan substrat lignoselulosa sebagai sumber karbon. Seiring berjalannya fermentasi, sebagian besar isolat diperkirakan memasuki fase stasioner, yaitu fase ketika laju pembentukan sel baru seimbang dengan laju kematian sel akibat mulai terbatasnya nutrisi. Mikroorganisme mengaktifkan berbagai mekanisme respons terhadap stres untuk mempertahankan viabilitasnya. Sebaliknya, isolat IFL 10 dan IFL 14 diduga lebih cepat memasuki fase kematian (*death phase*), yang ditandai dengan laju kematian sel lebih tinggi dibandingkan laju pembentukan sel baru sehingga kedua isolat tidak lagi mampu tumbuh kembali pada media NB setelah minggu keenam fermentasi (Maier *et al.*, 2021).

Pengujian viabilitas pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode SSF dengan substrat berupa *parchment* kopi Arabika. SSF dipilih karena berlangsung pada substrat padat dengan kadar air terbatas sehingga mampu menyediakan kondisi yang menyerupai habitat alami berbagai mikroorganisme pendegradasi biomassa (Hansen *et al.*, 2015; Yegin, 2025). Kulit tanduk kopi

mengandung selulosa sekitar 48%, hemiselulosa sekitar 32%, dan lignin sekitar 35%, sehingga berpotensi menjadi sumber karbon bagi mikroorganisme selulolitik (Gondim *et al.*, 2024). Selain sebagai sumber karbon, struktur berserat kulit tanduk kopi juga menyediakan permukaan kolonisasi bagi bakteri sehingga berfungsi sebagai *biocarrier* alami yang mendukung pembentukan biofilm, mempertahankan kelembapan mikro, serta menyediakan karbon secara bertahap melalui proses hidrolisis lignoselulosa (Soccol *et al.*, 2017).

Pemilihan kulit tanduk kopi juga didasarkan pada karakteristik fisiologis isolat yang berasal dari feses luwak. Selama proses pencernaan buah kopi, mikroorganisme dalam saluran pencernaan luwak berperan dalam mendegradasi komponen polisakarida pada lapisan buah kopi melalui produksi enzim hidrolitik, sehingga isolat-isolat tersebut diduga telah beradaptasi untuk memanfaatkan biomassa kopi sebagai sumber nutrisi (Amadea, 2025). Oleh karena itu, penggunaan kulit tanduk kopi sebagai substrat fermentasi tidak hanya relevan secara ekologis, tetapi juga memberikan kondisi yang sesuai dengan kemampuan fisiologis isolat.

Hasil pengujian viabilitas pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa delapan isolat, yaitu IFL 1, IFL 2, IFL 4, IFL 6, IFL 8, IFL 9, IFL 11, dan IFL 13, masih mampu mempertahankan pertumbuhan hingga minggu kedelapan fermentasi. Sebaliknya, isolat IFL 10 dan IFL 14 tidak lagi menunjukkan pertumbuhan pada minggu keenam maupun minggu kedelapan (Lampiran 4.1). Perbandingan viabilitas antara IFL 10 dan IFL 13 dapat dilihat pada Gambar 4.1. Penentuan viabilitas dilakukan berdasarkan kemampuan kultur hasil fermentasi untuk tumbuh kembali pada media NB, yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan media setelah inokulasi sebanyak 100 μ L kultur hasil fermentasi. Perbedaan viabilitas antar isolat menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki kemampuan adaptasi fisiologis yang berbeda terhadap kondisi fermentasi berbasis lignoselulosa.

Selama fermentasi berlangsung, mikroorganisme menghadapi berbagai tekanan lingkungan, antara lain berkurangnya nutrisi yang mudah dimanfaatkan, penurunan aktivitas air (*water activity*), perubahan pH, serta akumulasi metabolit hasil fermentasi yang dapat menghambat aktivitas metabolisme. Kondisi tersebut

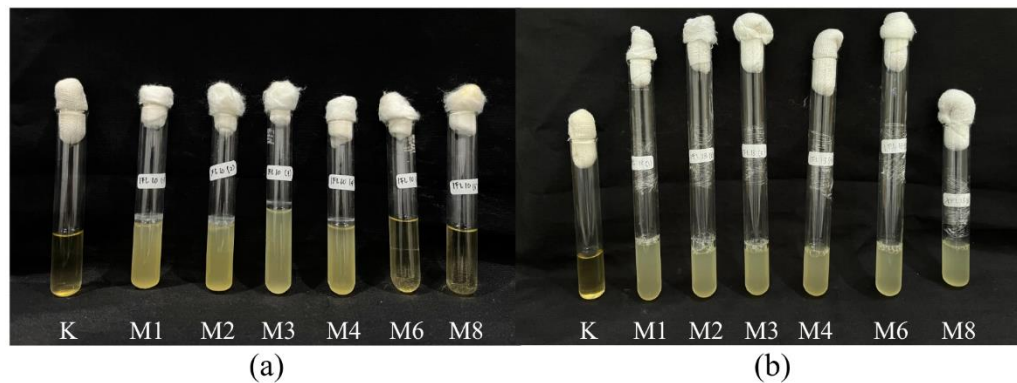
menyebabkan sebagian isolat mengalami penurunan aktivitas fisiologis sehingga memasuki fase kematian lebih cepat. Sebaliknya, isolat yang mampu mempertahankan viabilitas hingga minggu kedelapan diduga memiliki sistem regulasi metabolik yang lebih baik sehingga tetap mampu memanfaatkan karbon yang dilepaskan secara bertahap dari substrat lignoselulosa. Fenomena ini sejalan dengan laporan (Nocianitri *et al.*, 2025), yang menyatakan bahwa perubahan pH, akumulasi metabolit, dan keterbatasan nutrisi merupakan faktor utama yang memengaruhi viabilitas mikroorganisme selama fermentasi.

Tabel 4.2 Viabilitas Isolat Selama Fermentasi 8 Minggu Berdasarkan Kekeruhan Media NB

Kode isolat	Minggu ke-					
	1	2	3	4	6	8
IFL 1	+	+	+	+	+	+
IFL 2	+	+	+	+	+	+
IFL 4	+	+	+	+	+	+
IFL 6	+	+	+	+	+	+
IFL 8	+	+	+	+	+	+
IFL 9	+	+	+	+	+	+
IFL 10	+	+	+	+	-	-
IFL 11	+	+	+	+	+	+
IFL 13	+	+	+	+	+	+
IFL 14	+	+	+	+	-	-

Keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar isolat bakteri asal feses luwak memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap fermentasi menggunakan kulit tanduk kopi. Viabilitas yang tinggi menunjukkan bahwa isolat masih mampu mempertahankan aktivitas metaboliknya selama fermentasi sehingga berpotensi mempertahankan produksi enzim hidrolitik, terutama selulase dan amilase. Oleh karena itu, viabilitas dapat dijadikan salah satu indikator penting dalam seleksi kultur *starter*, karena isolat yang mampu bertahan hidup lebih lama diperkirakan memiliki kontribusi yang lebih besar terhadap proses degradasi biomassa selama fermentasi. Hasil uji viabilitas ini selanjutnya menjadi

dasar ilmiah untuk mengevaluasi kemampuan masing-masing isolat dalam menghasilkan enzim selulase dan amilase pada pembahasan berikutnya.



Gambar 4.1 Hasil Uji Viabilitas (a):IFL 10, (b) IFL 13 (K=kontrol, M 1-8=minggu ke 1-8)

4.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase

Hasil uji viabilitas yang telah dibahas pada 4.1, menunjukkan bahwa sebagian besar isolat bakteri asal feses luwak mampu mempertahankan pertumbuhan selama fermentasi menggunakan kulit tanduk kopi hingga minggu ke-8, meskipun kemampuan bertahan hidup masing-masing isolat berbeda. Kemampuan mempertahankan viabilitas menunjukkan bahwa sel masih mampu menjaga integritas membran, mempertahankan metabolisme dasar, serta menjalankan fungsi fisiologis yang diperlukan untuk kelangsungan hidup. Namun demikian, viabilitas yang tinggi tidak selalu berkorelasi dengan kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan enzim ekstraseluler secara optimal. Sintesis enzim merupakan proses metabolik yang memerlukan regulasi ekspresi gen, sintesis protein, ketersediaan energi, serta mekanisme induksi oleh substrat yang sesuai. Oleh karena itu, mikroorganisme yang masih hidup belum tentu mampu mempertahankan tingkat produksi enzim yang tinggi apabila menghadapi kondisi lingkungan yang kurang mendukung atau mengalami keterbatasan nutrisi (Madigan *et al.*, 2021; Stanbury *et al.*, 2017). Berdasarkan pertimbangan tersebut, setelah dilakukan seleksi berdasarkan viabilitas, penelitian ini dilanjutkan dengan pengujian aktivitas enzim selulase untuk mengevaluasi kemampuan fisiologis setiap isolat dalam memanfaatkan biomassa lignoselulosa sebagai sumber karbon selama fermentasi.

Pengujian aktivitas enzim selulase menjadi tahapan penting dalam penelitian ini karena substrat fermentasi yang digunakan berupa kulit tanduk kopi, yaitu limbah pertanian yang tersusun atas matriks lignoselulosa yang kompleks. Berbeda dengan karbohidrat sederhana yang dapat langsung dimanfaatkan oleh mikroorganisme, selulosa pada biomassa lignoselulosa terikat erat dengan hemiselulosa dan lignin sehingga memerlukan proses hidrolisis enzimatis sebelum dapat dikonversi menjadi gula sederhana sebagai sumber karbon dan energi. Oleh karena itu, keberhasilan mikroorganisme dalam memanfaatkan kulit tanduk kopi sangat bergantung pada kemampuannya menghasilkan sistem enzim selulase yang mampu memutus ikatan β -1,4-glikosidik pada rantai selulosa. Dengan demikian, aktivitas selulase tidak hanya menggambarkan kemampuan degradasi biomassa, tetapi juga mencerminkan potensi fisiologis isolat untuk berkembang pada substrat lignoselulosa dan mendukung proses fermentasi secara berkelanjutan (Bhat, 2000; Lynd *et al.*, 2002).

Gambaran kemampuan hidrolisis selulosa secara lebih komprehensif dilihat dari aktivitas enzimnya melalui pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kualitatif dilakukan menggunakan media CMC 1% sebagai substrat model dan media yang mengandung ekstrak kulit tanduk kopi sebagai substrat alami, sedangkan aktivitas enzim secara kuantitatif ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang terbentuk menggunakan metode *Somogyi–Nelson*. Kombinasi kedua pendekatan tersebut dipilih karena masing-masing memberikan informasi yang berbeda.

Uji kualitatif berfungsi sebagai metode skrining awal untuk mendeteksi kemampuan isolat dalam mensekresikan enzim selulase melalui pembentukan zona hidrolisis, sedangkan pengujian kuantitatif memberikan informasi mengenai kapasitas katalitik enzim berdasarkan jumlah produk hidrolisis yang dihasilkan. Oleh karena itu, penggunaan kedua metode secara bersamaan menghasilkan evaluasi yang lebih objektif dibandingkan apabila hanya menggunakan salah satu metode saja (Ghose, 1987). Perlu diperhatikan bahwa metode pewarnaan *Congo red* yang digunakan pada penelitian ini mengidentifikasi daerah selulosa yang telah terdegradasi melalui hilangnya ikatan antara pewarna dan polisakarida, sehingga

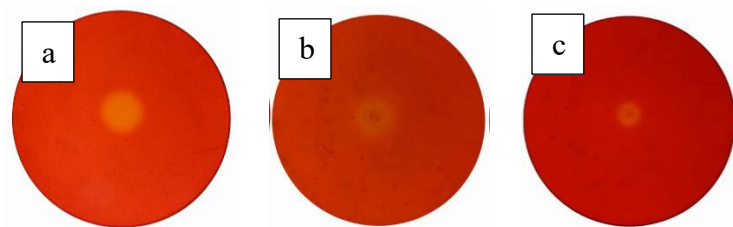
pembentukan zona bening terutama merefleksikan adanya aktivitas hidrolitik dan bukan secara langsung menunjukkan besarnya aktivitas katalitik enzim (Teather & Wood, 1982).

Hasil pengujian pada media CMC 1% (Gambar 4.2) menunjukkan bahwa seluruh isolat yang diuji masih mampu membentuk zona bening di sekitar koloni. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa isolat tetap mampu mensekresikan enzim selulase ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada substrat CMC sehingga daerah yang telah mengalami degradasi tidak lagi mengikat pewarna Congo red. Namun demikian, kemampuan hidrolisis yang ditunjukkan oleh masing-masing isolat berbeda. Isolat IFL 6 menghasilkan indeks hidrolisis terbesar, sedangkan IFL 10 dan IFL 14 menunjukkan indeks hidrolisis yang lebih rendah (Gambar 4.2) (Lampiran 4.2). Perbedaan tersebut mengindikasikan bahwa setiap isolat mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mensekresikan enzim maupun memanfaatkan substrat selulosa yang tersedia pada media. Variasi tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan tingkat ekspresi enzim, kemampuan sekresi protein ekstraseluler, maupun karakter fisiologis masing-masing isolat (Wood, 1980).

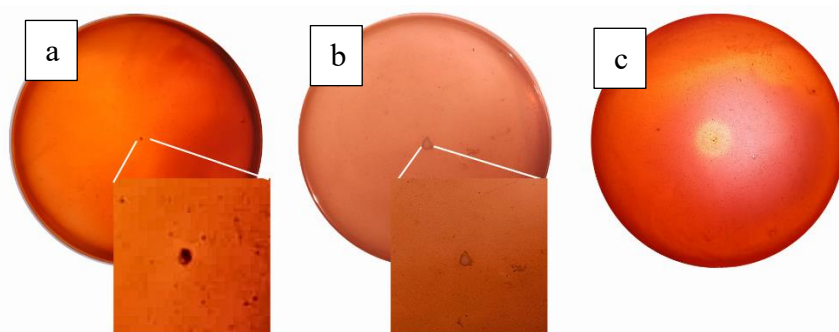
Meskipun demikian, besarnya diameter zona bening tidak dapat diartikan secara langsung sebagai tingginya aktivitas enzim. Zona bening yang terbentuk pada media padat dipengaruhi oleh jumlah enzim yang disekresikan, kemampuan enzim berdifusi di dalam agar, ukuran molekul enzim, laju pertumbuhan koloni, serta sifat fisik media. Oleh karena itu, uji zona bening lebih tepat digunakan sebagai metode skrining awal untuk mendeteksi keberadaan aktivitas selulolitik daripada sebagai ukuran kuantitatif produktivitas enzim. Dengan demikian, diperlukan pengujian lanjutan secara kuantitatif untuk memperoleh gambaran kapasitas katalitik enzim yang sebenarnya (Teather & Wood, 1982).

Media CMC dipilih sebagai substrat skrining karena merupakan turunan selulosa yang bersifat amorf sehingga relatif mudah dihidrolisis oleh enzim endoglukanase. Struktur CMC yang bersifat amorf menyebabkan ikatan hidrogen antar rantai selulosa jauh lebih rendah dibandingkan selulosa alami sehingga lebih mudah diakses oleh endoglukanase. Oleh karena itu, aktivitas enzim pada media

CMC umumnya lebih tinggi dibandingkan pada biomassa lignoselulosa yang masih mengandung lignin dan hemiselulosa. Sebaliknya, degradasi biomassa alami memerlukan kerja sinergis berbagai komponen kompleks enzim selulase untuk membuka struktur serat lignoselulosa sebelum selulosa dapat dihidrolisis secara efektif (Horn *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2014). Akan tetapi, kondisi tersebut belum sepenuhnya merepresentasikan lingkungan fermentasi yang sebenarnya. Pada proses fermentasi menggunakan kulit tanduk kopi, selulosa berada dalam matriks lignoselulosa bersama hemiselulosa dan lignin sehingga akses enzim menuju serat selulosa menjadi lebih terbatas. Kompleks lignoselulosa tersebut menyebabkan proses hidrolisis berlangsung lebih lambat dibandingkan substrat CMC, sehingga kemampuan isolat pada media CMC belum tentu sama dengan kemampuannya pada biomassa alami (Bhat, 2000; Lynd *et al.*, 2002).



Gambar 4.2 Uji Kualitatif Aktivitas Selulase Media CMC 1% (a) IFL 6 umur 72 jam, (b) IFL 10 umur 12 jam, (c) IFL 14 umur 12 jam



Gambar 4.3 Uji Kualitatif Aktivitas Selulase Media Ekstrak Kulit Tanduk Kopi 1% (a) IFL 6 umur 24 jam, (b) IFL 10 umur 48 jam, (c) IFL 14 umur 24 jam

Oleh karena itu, ketiga isolat selanjutnya diuji menggunakan media ekstrak kulit tanduk kopi sebagai substrat alami. Hasil pengujian (Gambar 4.3) menunjukkan bahwa seluruh isolat masih mampu membentuk zona bening, yang

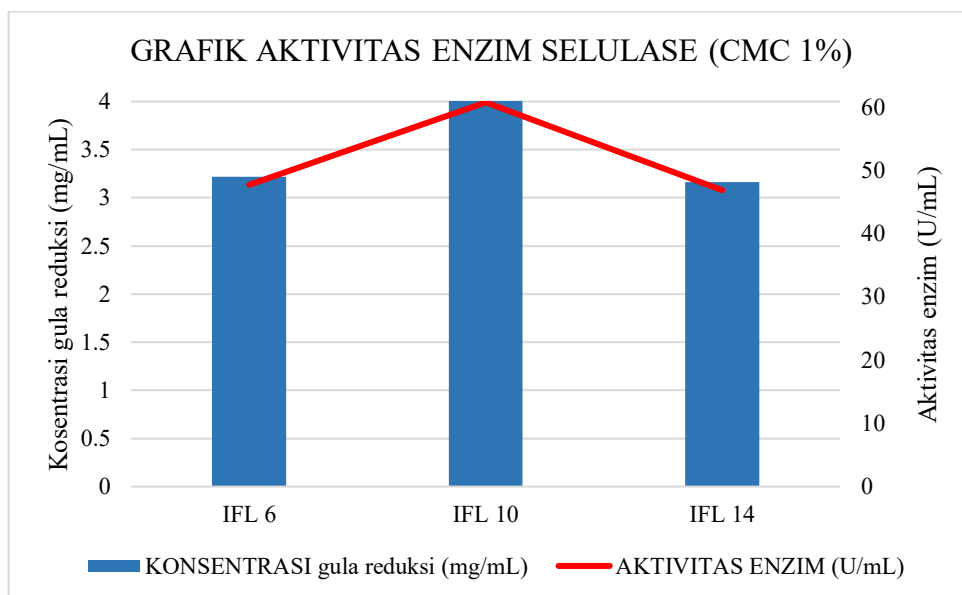
mengindikasikan bahwa aktivitas selulase tetap berlangsung pada substrat lignoselulosa alami. Akan tetapi, pola hidrolisis berbeda dibandingkan media CMC. Zona bening yang dihasilkan oleh IFL 6 dan IFL 10 tampak lebih kecil dibandingkan IFL 14. Perubahan pola tersebut menunjukkan bahwa karakteristik substrat memberikan pengaruh yang nyata terhadap kemampuan hidrolisis masing-masing isolat. Kemampuan IFL 14 mempertahankan zona hidrolisis yang lebih besar mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki sistem enzim yang lebih sesuai untuk mendegradasi lignoselulosa alami dibandingkan dua isolat lainnya (Lynd *et al.*, 2002; Soccol *et al.*, 2017).

Perbedaan hasil antara media CMC dan media ekstrak kulit tanduk kopi juga menunjukkan bahwa kemampuan hidrolisis suatu isolat sangat dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia substrat. Pada media CMC, aktivitas enzim terutama ditentukan oleh kemampuan endoglukanase menghidrolisis rantai selulosa yang bersifat amorf. Sebaliknya, pada kulit tanduk kopi, proses degradasi memerlukan kerja sinergis endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase karena selulosa masih terikat kuat dengan hemiselulosa dan lignin. Oleh sebab itu, pengujian menggunakan substrat alami memberikan informasi yang lebih representatif mengenai potensi isolat dalam aplikasi fermentasi biomassa dibandingkan pengujian menggunakan CMC saja (Bhat, 2000; Lynd *et al.*, 2002).

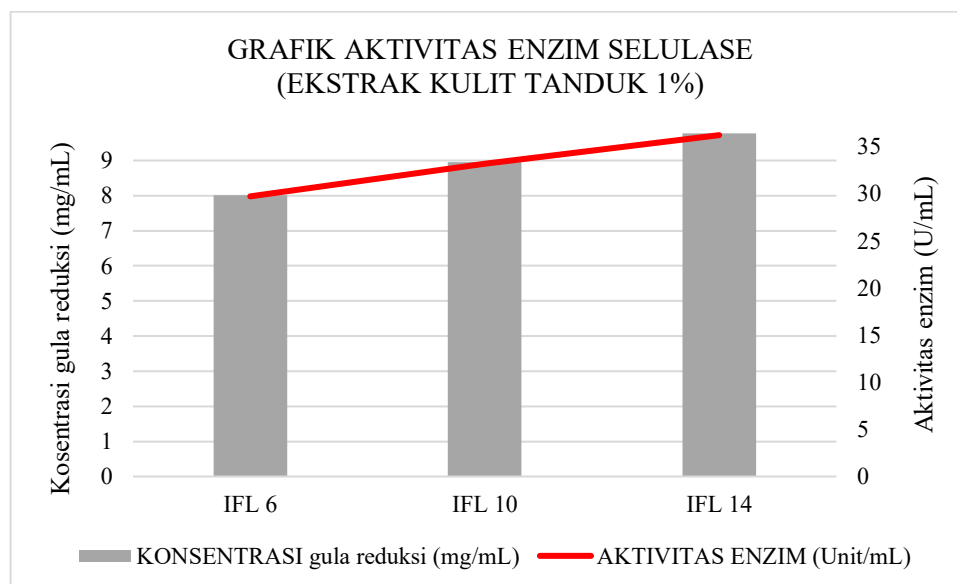
Hasil pengujian kuantitatif menggunakan metode Somogyi–Nelson (Gambar 4.4) (Lampiran 4.3) (Lampiran 4.7) memperlihatkan bahwa pola aktivitas enzim berbeda dengan hasil uji kualitatif. Pada media CMC, aktivitas selulase tertinggi diperoleh pada isolat IFL 10 sebesar 60,7 U/mL, sedangkan IFL 6 dan IFL 14 masing-masing menghasilkan 47,7 U/mL dan 46,8 U/mL. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa besarnya zona bening tidak selalu berkorelasi dengan aktivitas katalitik enzim. Zona bening hanya menggambarkan kemampuan enzim berdifusi pada media padat, sedangkan metode Somogyi–Nelson mengukur jumlah gula reduksi yang benar-benar dihasilkan selama proses hidrolisis. Dengan demikian, pengukuran kuantitatif memberikan estimasi yang lebih akurat terhadap kapasitas katalitik enzim dibandingkan pengamatan visual melalui zona bening (Ghose, 1987).

Ketika substrat CMC diganti menggunakan ekstrak kulit tanduk kopi (Gambar 4.5), pola aktivitas enzim kembali mengalami perubahan. Aktivitas tertinggi justru diperoleh pada IFL 14, sedangkan aktivitas IFL 6 dan IFL 10 mengalami penurunan dibandingkan pada media CMC (Lampiran 4.3). Hasil ini menunjukkan bahwa kemampuan suatu isolat dalam mendegradasi substrat sangat dipengaruhi oleh karakteristik biomassa yang digunakan. Aktivitas yang lebih tinggi pada IFL 14 mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki sistem enzim yang lebih adaptif terhadap substrat lignoselulosa alami sehingga lebih efisien dalam menghidrolisis kulit tanduk kopi. Temuan ini juga menunjukkan bahwa performa isolat pada substrat model seperti CMC tidak selalu dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan hidrolisis pada biomassa alami (Singhania *et al.*, 2009; Soccol *et al.*, 2017).

Hasil pengujian aktivitas enzim jika dibandingkan dengan hasil uji viabilitas pada 4.1, terlihat bahwa kemampuan mempertahankan viabilitas tidak selalu sejalan dengan kemampuan menghasilkan enzim selulase. Isolat IFL 6 mampu mempertahankan viabilitas hingga akhir fermentasi, tetapi tidak menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada substrat alami. Sebaliknya, IFL 14, yang mengalami penurunan viabilitas lebih awal, justru menunjukkan aktivitas selulase tertinggi pada media ekstrak kulit tanduk kopi. Temuan tersebut menunjukkan bahwa viabilitas dan produktivitas enzim merupakan dua karakter fisiologis yang berbeda. Viabilitas menggambarkan kemampuan mikroorganisme mempertahankan kelangsungan hidup, sedangkan aktivitas enzim mencerminkan efisiensi metabolisme dan kemampuan mengalokasikan sumber daya sel untuk sintesis protein ekstraseluler. Oleh karena itu, seleksi kultur *starter* fermentasi tidak dapat didasarkan hanya pada satu parameter, tetapi perlu mempertimbangkan kedua parameter tersebut secara terpadu agar diperoleh isolat yang mampu bertahan selama fermentasi sekaligus efektif mendegradasi biomassa lignoselulosa (Madigan *et al.*, 2021; Stanbury *et al.*, 2017; Soccol *et al.*, 2017).



Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Enzim Selulase (CMC 1%)



Gambar 4.5 Grafik Aktivitas Enzim Selulase (ekstrak kulit tanduk 1%)

4.3 Uji Aktivitas Enzim Amilase

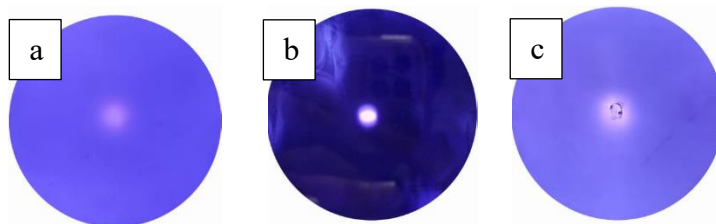
Aktivitas enzim amilase merupakan salah satu parameter penting dalam mengevaluasi potensi fisiologis bakteri asal feses luwak sebagai agen fermentasi kopi. Enzim amilase berfungsi menghidrolisis pati menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana, seperti dekstrin, maltosa, dan glukosa, yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi mikroorganisme selama proses

fermentasi. Walaupun kandungan pati pada buah kopi relatif lebih rendah dibandingkan selulosa, hemiselulosa, dan pektin, pati masih ditemukan pada jaringan mesokarp (*pulp*) dan lapisan mucilage sebagai cadangan karbohidrat yang dapat dimanfaatkan oleh komunitas mikroba selama fermentasi berlangsung. Hidrolisis pati akan meningkatkan ketersediaan gula sederhana yang tidak hanya mendukung pertumbuhan bakteri, tetapi juga menjadi prekursor berbagai metabolit sekunder, seperti asam organik, alkohol, ester, dan senyawa volatil lainnya yang berkontribusi terhadap pembentukan cita rasa dan aroma kopi fermentasi (Bruyn *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015; Murthy & Naidu, 2012).

Pengujian aktivitas amilase pada penelitian ini diawali dengan metode kualitatif menggunakan media *Starch Agar* (SSA) yang mengandung pati sebagai substrat. Setelah masa inkubasi, media ditetesi larutan iodin sehingga pati yang tidak mengalami hidrolisis membentuk kompleks berwarna biru kehitaman, sedangkan daerah yang telah mengalami degradasi oleh aktivitas amilase tampak sebagai zona bening di sekitar koloni. Mekanisme ini terjadi karena enzim α -amilase memutus ikatan α -1,4-glikosidik pada molekul pati sehingga terbentuk dekstrin dan gula sederhana yang tidak lagi mampu membentuk kompleks berwarna dengan iodin (Gupta *et al.*, 2003). Oleh karena itu, keberadaan zona bening menjadi indikator kemampuan isolat menghasilkan enzim amilase ekstraseluler, sedangkan diameter zona bening secara umum mencerminkan kapasitas hidrolisis pati secara kualitatif.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa seluruh isolat yang diuji, yaitu IFL 6, IFL 8, dan IFL 13, mampu membentuk zona bening pada media SSA (Gambar 4.6) (Lampiran 4.4) (Lampiran 4.6). Temuan tersebut menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki kemampuan mensekresikan enzim amilase ke lingkungan ekstraseluler. Akan tetapi, perbedaan diameter zona bening di antara ketiga isolat mengindikasikan adanya variasi kemampuan hidrolisis pati. Variasi tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan tingkat ekspresi gen penyandi amilase, efisiensi sistem sekresi protein ekstraseluler, laju pertumbuhan sel, maupun kemampuan adaptasi masing-masing isolat terhadap kondisi media. Menurut Gupta *et al.* (2003), produksi amilase oleh bakteri dipengaruhi oleh karakter genetik strain, komposisi

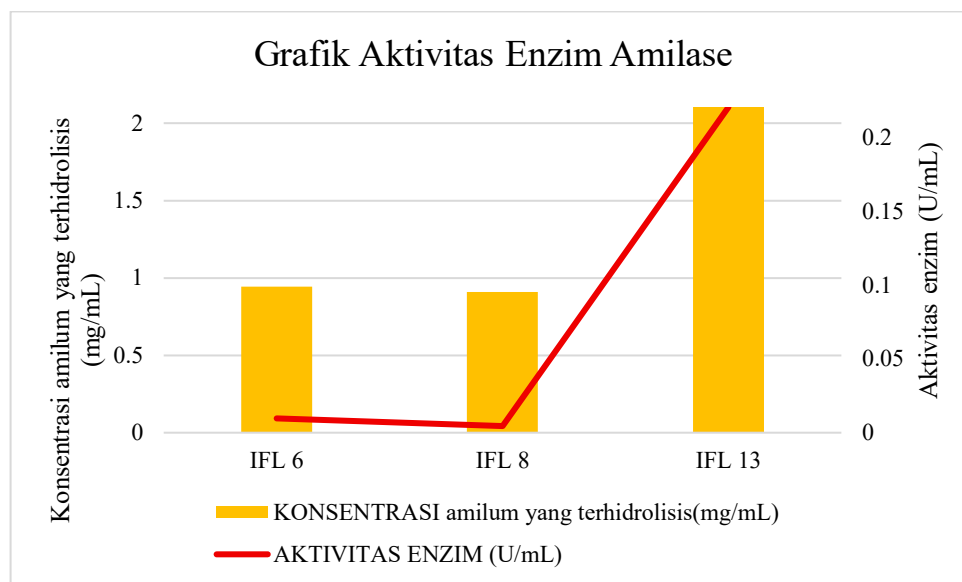
nutrisi media, konsentrasi substrat, pH, suhu inkubasi, serta mekanisme regulasi katabolit yang mengendalikan sintesis enzim.



Gambar 4.6 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase (a) IFL 6 umur 20 jam, (b) IFL 8 umur 12 jam dan (c) IFL 13 umur 5 jam

Meskipun pengujian secara kualitatif mampu menunjukkan keberadaan aktivitas amilase, metode tersebut belum dapat menggambarkan kemampuan katalitik enzim secara kuantitatif. Oleh karena itu, dilakukan pengujian aktivitas amilase menggunakan metode *Blue Value*, yaitu metode yang didasarkan pada penurunan intensitas warna kompleks pati–iodin setelah substrat mengalami hidrolisis. Selama reaksi berlangsung, molekul pati dipecah menjadi fragmen yang lebih pendek sehingga kemampuan membentuk kompleks dengan iodin semakin berkurang. Akibatnya, intensitas warna biru menurun dan nilai absorbansi menjadi lebih rendah. Semakin besar penurunan absorbansi yang terjadi, semakin tinggi aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh isolat (Fuwa, 1954; Hidayah *et al.*, 2023).

Hasil pengujian kuantitatif (Gambar 4.7) menunjukkan adanya perbedaan aktivitas amilase yang cukup nyata antar isolat (Lampiran 4.5). Isolat IFL 13 memiliki aktivitas amilase tertinggi sebesar 0,22 U/mL dengan jumlah amilum yang terhidrolisis sebesar 2,18 mg/mL. Sebaliknya, isolat IFL 6 dan IFL 8 hanya menghasilkan aktivitas masing-masing sebesar 0,0097 U/mL dan 0,0044 U/mL. Perbedaan aktivitas tersebut menunjukkan bahwa meskipun seluruh isolat memiliki kemampuan amilolitik, efisiensi hidrolisis pati sangat dipengaruhi oleh karakter fisiologis masing-masing strain. Fenomena ini umum dijumpai pada bakteri penghasil enzim ekstraseluler karena kemampuan produksi enzim dipengaruhi oleh regulasi metabolisme, efisiensi translasi protein, kapasitas sistem sekresi, serta kemampuan adaptasi terhadap lingkungan pertumbuhan (Gupta *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2000).



Gambar 4. 7 Grafik Aktivitas Enzim Amilase

Tingginya aktivitas amilase yang dimiliki isolat IFL 13 menunjukkan bahwa isolat tersebut mempunyai kemampuan lebih baik dalam memanfaatkan pati sebagai sumber karbon dibandingkan dua isolat lainnya. Kemampuan tersebut berpotensi meningkatkan laju penyediaan gula sederhana selama fermentasi kopi sehingga mendukung pertumbuhan populasi mikroorganisme serta mempercepat pembentukan metabolit fermentasi. Gula hasil hidrolisis pati selanjutnya dapat dimanfaatkan melalui jalur glikolisis untuk menghasilkan berbagai produk metabolisme seperti asam laktat, etanol, asetat, maupun senyawa volatil yang berkontribusi terhadap karakteristik sensoris kopi. Dengan demikian, aktivitas amilase yang tinggi dapat mempercepat dinamika metabolisme mikroba selama fermentasi sehingga berpengaruh terhadap kualitas akhir biji kopi (Bruyn *et al.*, 2017; Gilberto *et al.*, 2017).

Aktivitas amilase yang tinggi pada isolat IFL 13 menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki potensi sebagai bakteri starter dalam fermentasi kopi, terutama pada tahap awal ketika sumber karbohidrat kompleks masih tersedia dalam jumlah cukup banyak. Menurut Lee *et al.* (2015), bakteri yang mampu menghasilkan enzim hidrolitik secara efisien memiliki kemampuan kolonisasi substrat yang lebih baik karena dapat memperoleh sumber karbon lebih cepat dibandingkan

mikroorganisme lain. Kondisi tersebut memberikan keuntungan kompetitif selama proses fermentasi berlangsung.

Waktu inkubasi selama tiga jam pada pengujian aktivitas amilase dalam penelitian ini terbukti telah mampu mendeteksi aktivitas enzim pada seluruh isolat. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Hidayah *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa semakin tinggi aktivitas amilase maka semakin besar jumlah pati yang terhidrolisis sehingga intensitas warna kompleks pati-iodin semakin menurun. Oleh karena itu, metode *Blue Value* dinilai cukup sensitif untuk mengukur aktivitas amilase pada ekstrak kasar enzim dan banyak digunakan dalam penelitian enzim hidrolitik karena memiliki sensitivitas tinggi terhadap perubahan konsentrasi pati selama proses hidrolisis.

Hasil pengujian aktivitas selulase pada subbab sebelumnya jika dibandingkan, terlihat bahwa kemampuan menghasilkan enzim hidrolitik berbeda pada setiap isolat. Isolat yang menunjukkan aktivitas selulase tertinggi tidak selalu memiliki aktivitas amilase tertinggi. Sebaliknya, isolat IFL 13 memperlihatkan kemampuan amilolitik yang paling tinggi dibandingkan isolat lainnya. Perbedaan tersebut menunjukkan adanya spesialisasi metabolik pada masing-masing isolat dalam memanfaatkan jenis substrat tertentu. Mikroorganisme lignoselulolitik umumnya mengalokasikan energi dan regulasi metabolisme secara spesifik terhadap substrat dominan yang tersedia di lingkungannya sehingga ekspresi berbagai enzim hidrolitik tidak selalu berlangsung secara bersamaan (Lynd *et al.*, 2002). Karakteristik tersebut menjadi keuntungan apabila beberapa isolat dikembangkan sebagai konsorsium mikroba, karena kombinasi aktivitas selulolitik, amilolitik, pektinolitik, dan enzim hidrolitik lainnya memungkinkan proses degradasi biomassa kopi berlangsung secara lebih efektif dibandingkan penggunaan kultur tunggal.

Keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri asal feses luwak memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase ekstraseluler, meskipun tingkat aktivitasnya berbeda secara nyata. Isolat IFL 13 merupakan kandidat terbaik sebagai penghasil amilase berdasarkan aktivitas enzim tertinggi yang diperoleh pada penelitian ini. Sementara itu, isolat IFL 6 dan IFL 8 tetap

memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai anggota konsorsium fermentasi karena berkontribusi terhadap degradasi substrat melalui mekanisme metabolik yang berbeda. Kombinasi berbagai isolat dengan kemampuan enzimatis yang saling melengkapi diharapkan mampu meningkatkan efisiensi degradasi komponen biomassa kopi selama fermentasi sehingga menghasilkan mutu kopi yang lebih baik. Oleh karena itu, identifikasi molekuler terhadap isolat-isolat terpilih menjadi langkah penting untuk memastikan identitas taksonomi, hubungan kekerabatan, serta menghubungkan karakter fisiologis yang diamati dengan potensi biologis masing-masing isolat sebagai kandidat kultur starter fermentasi kopi.

4.4 Analisis Filogenetik Isolat

Identifikasi molekuler dilakukan terhadap lima isolat bakteri terpilih, yaitu IFL 6, IFL 8, IFL 10, IFL 13, dan IFL 14. Pemilihan isolat tersebut didasarkan pada hasil seleksi bertingkat yang mempertimbangkan viabilitas selama proses SSF, aktivitas enzim selulase dan amilase, serta kemampuan tumbuh kembali setelah penyimpanan. Pendekatan ini bertujuan agar analisis molekuler difokuskan pada isolat-isolat yang memiliki potensi biologis paling tinggi sebagai kandidat kultur starter fermentasi kopi. Identifikasi dilakukan menggunakan sekuens gen 16S rRNA yang dianalisis melalui BLASTn terhadap basis data NCBI, kemudian dilanjutkan dengan penyusunan pohon filogenetik dan analisis kedekatan gennya dengan spesies pembanding menggunakan perangkat lunak MEGA 12 untuk mengetahui hubungan kekerabatan antarisolat.

Gen 16S rRNA merupakan penanda molekuler yang paling banyak digunakan dalam identifikasi bakteri karena mengandung daerah konservatif dan daerah hipervariabel yang memungkinkan identifikasi pada tingkat genus, bahkan pada beberapa kelompok hingga tingkat spesies. Selain mampu membandingkan tingkat similaritas sekuens dengan database GenBank, analisis filogenetik juga memberikan informasi mengenai kedekatan evolusioner suatu isolat dengan bakteri referensi sehingga hasil identifikasi tidak hanya bergantung pada nilai percent identity dari BLAST, tetapi juga didukung oleh pola pengelompokan pada pohon filogenetik. Meskipun demikian, identifikasi menggunakan gen 16S rRNA tetap

memiliki keterbatasan, terutama pada kelompok bakteri yang memiliki tingkat konservasi sekuens sangat tinggi sehingga beberapa spesies sulit dibedakan hanya berdasarkan satu marka molekuler.

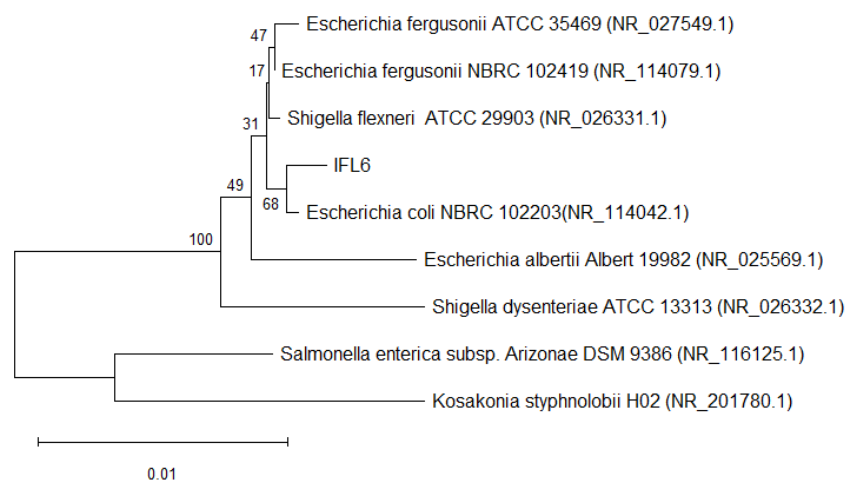
Tabel 4.3 Similaritas Isolat IFL 6

Nama Spesies	Similaritas (%)
<i>Escherichia fergusonii</i> NBRC 102419 (NR_114079.1)	99.86
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203(NR_114042.1)	99.79
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR_026331.1)	99.71
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR_027549.1)	99.64
<i>Escherichia albertii</i> Albert 19982 (NR_025569.1)	98.92
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR_026332.1)	98.85
<i>Intestinirhabdus alba</i> BIT-B35 (NR_180509.1)	97.98
<i>Phytobacter palmae</i> S29 (NR_179034.1)	97.97
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i> DSM 9386 (NR_116125.1)	97.68
<i>Kosakonia styphnolobii</i> H02 (NR_201780.1)	97.09

Berdasarkan hasil perataan strain menggunakan BLASTn, isolat IFL 6 homolog dengan beberapa referensi kelompok *Escherichia* di NCBI, dengan identitas maksimumnya sebesar 99,5%. Analisis evolusi dengan urutan nukleotida dari spesies referensi terpilih menghasilkan informasi mengenai kesamaan urutan 16s rRNA (Tabel 4.3). Urutan 16s rRNA IFL 6 dengan isolat lainnya memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu pada rentang 97,09-99,86%. Hubungan genetik antara IFL 6 dan *Escherichia fergusonii* NBRC 102419 dinilai cukup dekat dengan similaritas sebesar 99,86%, sehingga dapat diduga merupakan spesies yang sama.

Hasil tersebut didukung oleh konstruksi pohon filogenetik yang menempatkan isolat IFL 6 pada klad yang sama dengan kelompok *Escherichia* (Gambar 4.8). Keberadaan anggota genus *Escherichia* pada saluran pencernaan mamalia merupakan hal yang umum karena kelompok bakteri ini merupakan bagian dari mikrobiota usus yang berperan dalam metabolisme berbagai senyawa organik. Pada kopi luwak, beberapa penelitian juga melaporkan keberadaan

Escherichia sebagai salah satu anggota komunitas mikroorganisme selama fermentasi alami di saluran pencernaan luwak (Muzaifa *et al.*, 2019). Beberapa strain *Escherichia* juga diketahui mampu menghasilkan enzim hidrolitik, termasuk amilase dan selulase, meskipun kemampuan tersebut sangat bergantung pada variasi strain dan kondisi lingkungan (Fotou *et al.*, 2024; Pang *et al.*, 2019).



Gambar 4.8 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 6 Dengan Beberapa Spesies Referensi

Meskipun demikian, hasil identifikasi IFL 6 perlu diinterpretasikan secara hati-hati karena penelitian sebelumnya terhadap isolat yang sama melaporkan kedekatan yang sangat tinggi dengan *Cytobacillus firmus* (similaritas 99,993%) serta menunjukkan karakter fenotip berupa sel berbentuk batang Gram positif (Amadea, 2025). Karakter tersebut lebih sesuai dengan genus *Cytobacillus* dibandingkan *Escherichia* yang merupakan bakteri gram negatif. Perbedaan hasil identifikasi tersebut kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain kualitas sekuens yang diperoleh, panjang fragmen DNA hasil amplifikasi, proses *editing* dan *trimming* sekuens, maupun perbedaan algoritma pencarian dan pembaruan database GenBank. Selain itu, identifikasi berbasis gen 16S rRNA memang memiliki keterbatasan resolusi pada beberapa kelompok bakteri sehingga hasil BLAST perlu dipadukan dengan karakter morfologi, fisiologi, serta analisis filogenetik sebelum menarik kesimpulan mengenai identitas isolat. Oleh karena itu, status taksonomi IFL 6 masih memerlukan konfirmasi lebih lanjut menggunakan

pendekatan molekuler dengan resolusi yang lebih tinggi, seperti *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) atau *whole genome sequencing*.

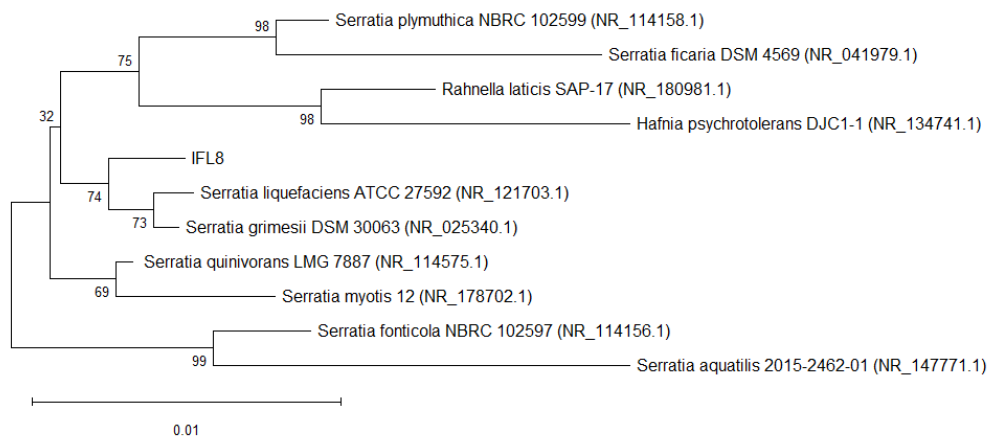
Tabel 4.4 Similaritas Isolat IFL 8

Nama Spesies	Similaritas (%)
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592 (NR_121703.1)	99.57
<i>Serratia grimesii</i> DSM 30063 (NR_025340.1)	99.42
<i>Serratia quinivorans</i> LMG 7887 (NR_114575.1)	99.42
<i>Serratia plymuthica</i> NBRC 102599 (NR_114158.1)	98.91
<i>Serratia myotis</i> 12 (NR_178702.1)	98.84
<i>Rahnella laticis</i> SAP-17 (NR_180981.1)	98.40
<i>Serratia fonticola</i> NBRC 102597 (NR_114156.1)	98.25
<i>Serratia ficaria</i> DSM 4569 (NR_041979.1)	97.88
<i>Hafnia psychrotolerans</i> DJC1-1 (NR_134741.1)	97.73
<i>Serratia aquatilis</i> 2015-2462-01 (NR_147771.1)	97.36

Berdasarkan hasil perataan strain menggunakan BLASTn, isolat IFL 8 homolog dengan beberapa referensi kelompok *Serratia* di NCBI, dengan identitas maksimumnya sebesar 99,36%. Analisis evolusi dengan urutan nukleotida dari spesies referensi terpilih menghasilkan informasi mengenai kesamaan urutan 16s rRNA (Tabel 4.4). Urutan 16s rRNA IFL 8 dengan isolat lainnya memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu pada rentang 97,36-99,57%. Hubungan genetik antara IFL 8 dan *Serratia liquefaciens* ATCC 27592 dinilai cukup dekat dengan similaritas sebesar 99,57%.

Hasil tersebut didukung oleh konstruksi pohon filogenetik yang menempatkan isolat IFL 8 pada klad yang sama dengan kelompok *Serratia* (Gambar 4.9). Genus ini termasuk anggota famili Enterobacteriaceae yang dikenal memiliki kemampuan menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler, seperti selulase, amilase, protease, pektinase, dan lipase. Keberadaan *Serratia* pada lingkungan yang kaya bahan organik menunjukkan kemampuan adaptasi metabolik yang tinggi terhadap substrat kompleks, termasuk biomassa lignoselulosa. Pada penelitian ini, IFL 8 memiliki aktivitas amilase yang cukup tinggi meskipun lebih rendah dibandingkan IFL 13. Penelitian (Arsy *et al.*, 2021) menunjukkan bahwa anggota

genus ini memiliki potensi amilolitik yang cukup tinggi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat ini tetap memiliki kontribusi dalam proses degradasi karbohidrat selama fermentasi kopi.



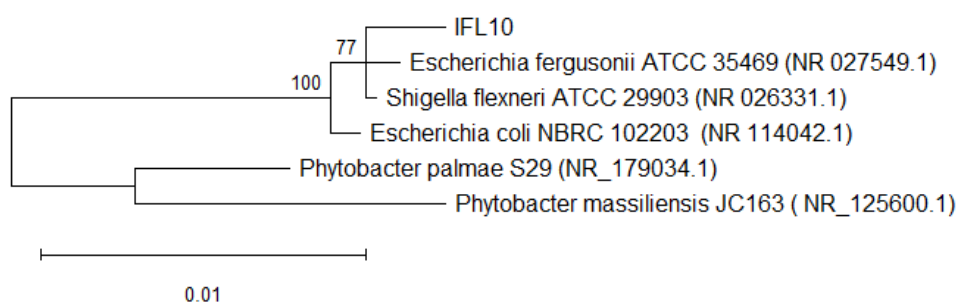
Gambar 4.9 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 8 Dengan Beberapa Spesies Referensi

Tabel 4.5 Similaritas Isolat IFL 10

Nama Spesies	Similaritas (%)
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	99.71
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 027549.1)	99.64
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203 (NR 114042.1)	99.49
<i>Phytobacter palmae</i> S29 (NR_179034.1)	97.82
<i>Phytobacter massiliensis</i> JC163 (NR_125600.1)	97.38

Berdasarkan hasil perataan strain menggunakan BLASTn, isolat IFL 10 homolog dengan beberapa spesies referensi di NCBI, dengan identitas maksimumnya sebesar 99,65%. Analisis evolusi dengan urutan nukleotida dari spesies referensi terpilih menghasilkan informasi mengenai kesamaan urutan 16s rRNA (Tabel 4.5). Urutan 16s rRNA IFL 10 dengan isolat lainnya memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu pada rentang 97,38-99,71%. Hubungan genetik antara IFL 10 dan *Shigella flexneri* ATCC 29903 dinilai cukup dekat dengan similaritas sebesar 99,71%.

Hasil tersebut didukung oleh konstruksi pohon filogenetik yang menempatkan isolat IFL 10 pada klad yang sama dengan kelompok *Shigella* dan *Escherichia* (Gambar 4.10). Kedua genus ini biasanya ditemukan pada feses hewan yang ditemukan di beberapa negara eropa dan memiliki potensi dalam menghidrolisis seluase yang tinggi (Han *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2017). Akan tetapi, interpretasi hasil ini juga perlu dilakukan secara hati-hati karena secara filogenetik genus *Shigella* dan *Escherichia* memiliki tingkat kemiripan gen 16S rRNA yang sangat tinggi sehingga keduanya sering tidak dapat dipisahkan hanya menggunakan marka 16S rRNA. Oleh karena itu, identifikasi IFL 10 dapat diduga lebih tepat dinyatakan memiliki kedekatan genetik dengan kelompok *Shigella* daripada secara definitif diidentifikasi sebagai *Shigella*. Kedua genus ini termasuk anggota famili Enterobacteriaceae yang dikenal memiliki kemampuan menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler dan umumnya ditemukan pada saluran pencernaan hewan ataupun manusia (Donna *et al.*, 2025).



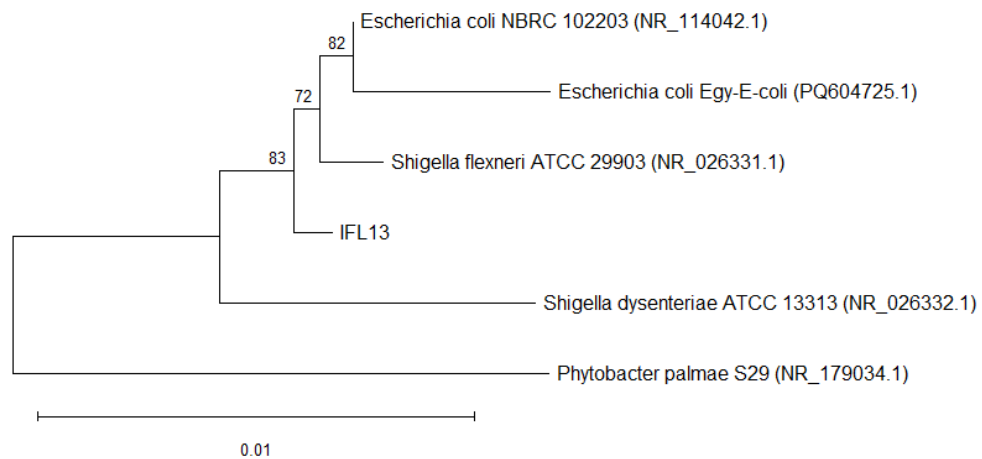
Gambar 4.10 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 10 Dengan Beberapa Spesies Referensi

Tabel 4.6 Similaritas Isolat IFL 13

Nama Spesies	Similaritas (%)
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203 (NR_114042.1)	99.78
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR_026331.1)	99.70
<i>Escherichia coli</i> Egy-E-coli (PQ604725.1)	99.32
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR_026332.1)	99.02
<i>Phytobacter palmae</i> S29 (NR_179034.1)	98.03

Berdasarkan hasil perataan strain menggunakan BLASTn, isolat IFL 13 homolog dengan beberapa spesies referensi di NCBI, dengan identitas maksimumnya sebesar 99,72%. Analisis evolusi dengan urutan nukleotida dari spesies referensi terpilih menghasilkan informasi mengenai kesamaan urutan 16s rRNA (Tabel 4.6). Urutan 16s rRNA IFL 13 dengan isolat lainnya memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu pada rentang 98,03-99,78%. Hubungan genetik antara IFL 13 dan *Escherichia coli* NBRC 102203 dinilai cukup dekat dengan similaritas sebesar 99,78%.

Hasil tersebut didukung oleh konstruksi pohon filogenetik yang menempatkan isolat IFL 13 pada klad yang sama dengan kelompok *Shigella* dan *Escherichia* (Gambar 4.11). IFL 13 memiliki kekerabatan cukup dekat dengan IFL 10 yang berasal dari famili Enterobacteriaceae, sehingga memiliki potensi yang cukup mirip dapat menghasilkan enzim hidrolitik (Donna *et al.*, 2025). IFL 13 memiliki tingkat aktivitas amilase tertinggi, sehingga kemampuannya sangat baik dalam menghidrolisis pati menjadi gula sederhana yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi selama fermentasi. Walaupun pati bukan merupakan komponen dominan pada kulit tanduk kopi, keberadaan amilum pada lapisan *pulp* dan lendir buah kopi memungkinkan aktivitas amilase tetap berkontribusi pada proses fermentasi secara keseluruhan. Oleh karena itu, IFL 13 berpotensi berperan dalam tahap awal degradasi karbohidrat sebelum proses dekomposisi lignoselulosa berlangsung secara intensif.



Gambar 4.11 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 13 Dengan Beberapa Spesies Referensi

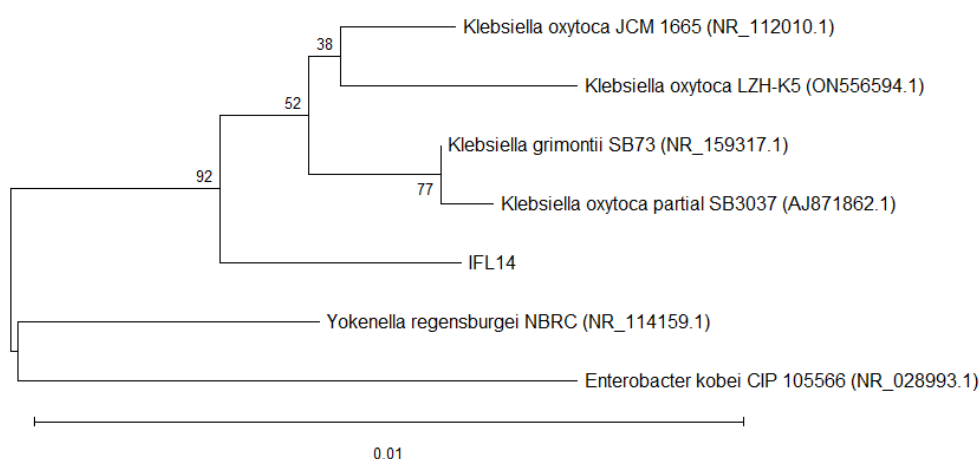
Tabel 4.7 Similaritas Isolat IFL 14

Nama Spesies	Similaritas (%)
<i>Klebsiella oxytoca</i> LZH-K5 (ON556594.1)	99.29
<i>Klebsiella oxytoca</i> JCM 1665 (NR_112010.1)	99.29
<i>Klebsiella oxytoca</i> partial SB3037 (AJ871862.1)	99.21
<i>Klebsiella grimontii</i> SB73 (NR_159317.1)	99.21
<i>Yokenella regensburgei</i> NBRC (NR_114159.1)	98.85
<i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566 (NR_028993.1)	98.63

Berdasarkan hasil perataan strain menggunakan BLASTn, isolat IFL 14 homolog dengan beberapa referensi kelompok *Klebsiella* di NCBI, dengan identitas maksimumnya sebesar 99,22%. Analisis evolusi dengan urutan nukleotida dari spesies referensi terpilih menghasilkan informasi mengenai kesamaan urutan 16s rRNA (Tabel 4.7). Urutan 16s rRNA IFL 14 dengan isolat lainnya memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu pada rentang 98,63-99,29%. Hubungan genetik antara IFL 14 dengan *Klebsiella oxytoca* LZH-K5 dan strain JCM 1665 dinilai cukup dekat dengan similaritas sebesar 99,29%, sehingga dapat diduga merupakan spesies yang sama.

Hasil tersebut didukung oleh konstruksi pohon filogenetik yang menempatkan isolat IFL 14 pada klad yang sama dengan kelompok *Klebsiella*

(Gambar 4.12). Genus *Klebsiella* diketahui memiliki kemampuan metabolik yang luas, termasuk menghasilkan enzim selulase (Oktiarni *et al.*, 2023). Pada penelitian ini, IFL 14 menunjukkan aktivitas selulase yang tinggi, baik pada media CMC maupun media ekstrak kulit tanduk kopi, sehingga mengindikasikan kemampuan adaptasi yang baik terhadap substrat lignoselulosa. Aktivitas tersebut memperlihatkan bahwa IFL 14 berpotensi menjadi salah satu mikroorganisme penting dalam proses biokonversi komponen struktural kulit tanduk kopi menjadi gula sederhana yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme lain selama fermentasi berlangsung.



Gambar 4.12 Konstruksi Pohon Filogenetik IFL 14 Dengan Beberapa Spesies Referensi

Hasil identifikasi molekuler juga menunjukkan bahwa seluruh isolat terpilih berasal dari kelompok bakteri yang secara ekologis umum ditemukan pada saluran pencernaan mamalia dan memiliki kemampuan metabolik yang beragam dalam memanfaatkan berbagai sumber karbon. Keragaman tersebut merupakan keuntungan apabila isolat-isolat tersebut dikembangkan sebagai konsorsium mikroba, karena setiap isolat memiliki spesialisasi metabolik yang berbeda. IFL 14 lebih dominan dalam aktivitas selulolitik, sedangkan IFL 13 menunjukkan aktivitas amilolitik tertinggi. Sebaliknya, IFL 6, IFL 8, dan IFL 10 memberikan kontribusi tambahan melalui kemampuan adaptasi terhadap substrat fermentasi dan aktivitas enzimatis yang saling melengkapi. Kombinasi berbagai isolat tersebut diperkirakan

mampu meningkatkan efisiensi degradasi biomassa kopi dibandingkan penggunaan kultur tunggal sehingga menghasilkan proses fermentasi yang lebih stabil.

Secara keseluruhan, identifikasi molekuler berhasil menunjukkan bahwa isolat-isolat dengan viabilitas dan aktivitas enzim tinggi memiliki hubungan kekerabatan dengan kelompok *Escherichia*, *Serratia*, *Shigella*, dan *Klebsiella*. Namun demikian, identifikasi berdasarkan gen 16S rRNA masih memiliki keterbatasan dalam membedakan spesies yang berkerabat sangat dekat, khususnya pada anggota famili *Enterobacteriaceae*. Oleh karena itu, hasil penelitian ini lebih tepat digunakan sebagai identifikasi pada tingkat genus dan sebagai dasar untuk penelitian lanjutan menggunakan metode molekuler dengan resolusi lebih tinggi, seperti MLSA atau *whole genome sequencing*. Meskipun demikian, kombinasi hasil identifikasi molekuler, analisis filogenetik, viabilitas, serta aktivitas enzim yang diperoleh pada penelitian ini telah memberikan dasar ilmiah yang kuat bahwa isolat-isolat tersebut berpotensi dikembangkan sebagai kultur starter dalam fermentasi kopi berbasis mikroorganisme yang meniru proses alami di saluran pencernaan luwak.

BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sebagian besar isolat bakteri asal feses luwak mampu mempertahankan viabilitas selama fermentasi menggunakan media karbon kulit tanduk kopi Arabika hingga minggu ke-8, sedangkan isolat IFL 10 dan IFL 14 mengalami penurunan viabilitas setelah minggu ke-4. Lima isolat terpilih memiliki aktivitas enzim hidrolitik, yaitu IFL 6, IFL 10, dan IFL 14 bersifat selulolitik, sedangkan IFL 6, IFL 8, dan IFL 13 bersifat amilolitik. Aktivitas selulase tertinggi dihasilkan oleh isolat IFL 10 sebesar 60,7 U/mL, sedangkan aktivitas amilase tertinggi dihasilkan oleh isolat IFL 13 sebesar 0,22 U/mL. Analisis molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IFL 6 dan IFL 13 memiliki kemiripan dengan genus *Escherichia*, IFL 8 dengan *Serratia*, IFL 10 dengan *Shigella*, dan IFL 14 dengan *Klebsiella*.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan melakukan identifikasi molekuler menggunakan metode dengan resolusi yang lebih tinggi, seperti *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) atau *whole genome sequencing* (WGS), sehingga identitas isolat dapat ditentukan dengan lebih akurat hingga tingkat spesies. Selain itu, pengujian viabilitas perlu dikembangkan melalui optimasi kondisi fermentasi, meliputi pH, suhu, kelembaban, serta durasi fermentasi untuk mengevaluasi stabilitas viabilitas isolat pada media kulit tanduk kopi. Isolat-isolat yang menunjukkan viabilitas dan aktivitas enzim hidrolitik yang tinggi selanjutnya perlu diuji sebagai kultur starter pada proses fermentasi kopi guna mengevaluasi efektivitasnya dalam meningkatkan kualitas fermentasi

DAFTAR PUSTAKA

- Amadea, M. A. (2025). Skrining bakteri amilolitik dan selulolitik asal kotoran luwak pemakan biji kopi perkebunan Kalisat, Jampit, Bondowoso. [Skripsi]. Universitas Jember
- Andrea, J., Gómez, G., Marina, L., Pardo, F., Camila, Y., & Vargas, L. (2024). Valorization of coffee by - products in the industry , a vision towards circular economy. *Discover Applied Sciences*, 6(480). <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06085-9>
- Arsy, Y., Setyaningrum, E., Handayani, K., & Nukmal, N. (2021). Analisis Senyawa Bioaktif Ekstrak Metabolit Sekunder *Serratia marcescens* strain MBC1. *Journal of Chemical Analysis*, 04(02), 64–71. <https://doi.org/10.20885/ijca.vol4.iss2.art3>
- Aswanto, ahmad andestra, Muhtarudin, M., Farda, F. T., Liman, L., & Tantalo, S. (2023). Potensi nutrisi limbah kulit kopi untuk pakan ternak ruminansia di Kecamatan Kebun Tebu Kabupaten Lampung Barat. *Jurnal Riset Dan Inovasi Peternakan*, 7(3), 306–311.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 18(5), 355–383.
- Bruyn, F. De, Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., & Vuysta, L. De. (2017). crossm Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and. *Appl Environ Microbiol*, 83(1), 1–16.
- Campuzano, F., Escobar, D. M., & Ana María Torres, L. (2024). Physicochemical characterization of coffee parchment of species *Coffea arabica* variety Castillo®. *Coffee Science*, 19. <https://doi.org/10.25186/v19i.2182>
- de Carvalho Neto, D. P., de Melo Pereira, G. V., Finco, A. M. O., Letti, L. A. J., da Silva, B. J. G., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2018). Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies. *Food Bioscience*, 26, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.005>
- Donna, E. C., Kurniatuhadi, R., & Khotimah, S. (2025). Identifikasi *Salmonella* dan *Shigella* pada Cincalok yang beredar di Kota Singkawang. *Protobiont*, 14(3), 81–87.
- Fotou, K., Rozos, G., Zaralis, K., Dadamogia, A., Stavropoulou, E., Demertzis, P., Akrida-demertzi, K., Tzora, A., & Voidarou, C. C. (2024). Pathogens in the Food Chain: *Escherichia coli* Strains in Raw Milk Originating from Ewes Treated for Mastitis with Various Therapeutic Protocols. *Applied Sciences*, 14(3), 1–19.
- Fuwa. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry*, 41(5).
- Ghose. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2).
- Gilberto, V. de M. P., Socco, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Socco, C. R. (2017).

- Microbial Ecology and Starter Culture Technology in Coffee Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 88–2775. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759>
- Gondim, F. F., Rodrigues, J. G. P., Aguiar, V. O., et al. (2024). Biocomposites of Cellulose Isolated from Coffee Processing. *Polymers*, 16(3), 314.
- Gondim, F. F., Rodrigues, J. G. P., Aguiar, V. O., de Fátima Vieira Marques, M., & Monteiro, S. N. (2024). Biocomposites of Cellulose Isolated from Coffee Processing By-Products and Incorporation in Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT) Matrix: An Overview. In *Polymers* (Vol. 16, Number 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/polym16030314>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., & Goswami, V. K. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, 38(11), 1599–1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Hadipernata, M., & Nugraha, S. (2018). Process technology of luwak coffee through bioreactor utilization. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1).
- Han, S., Wan, D., Kim, B., Min, Y., Kang, S., Park, H., Jung, S., Hyuck, J., & Oh, T. (2019). Microbial Pathogenesis Complete genome sequencing of *Shigella* sp . PAMC 28760 : Identification of CAZyme genes and analysis of their potential role in glycogen metabolism for cold survival adaptation. *Microbial Pathogenesis*, 137(June), 103759. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103759>
- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>
- Hidayah, N., Pratama, K. J., & Raharjo, D. (2023). Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa-Amilase Ekstrak Dan Fraksidaun Nipah (*Nypa Fruticans* Wurmmb). *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 9(25), 677–684.
- Horn, S. J., Vaaje-kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. G. H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose*, 5(45).
- Isnaini, F. S., & Muslimin, I. (2020). Isolation and Characterization of Cellulolytic Bacteria in Peatlands in Tagagiri Tama Jaya Village , Pelangiran Dist. *Jurnal UNESA Lentera Bio*, 9(3), 194–203.
- Kalaiselvan, P., Devi, N. C., Deepti, M., Devi, A. A., Akamad, K., Dheeran, P., Debbarma, S., Vadivel, D., & Rajesh, D. (2025). Solid-state fermentation a sustainable future technology in aquafeeds? *Frontiers in Marine Science*, 12(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmars.2025.1669719>
- Kusmiyati, Heratri, A., & Kubikazari, S. (2020). Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Komponen Flavor Kopi Bioluwak Robusta menggunakan Bakteri dari Usus Luwak. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 3(1). <https://doi.org/10.31960/caradde.v3i2.463>
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. *FOOD CHEMISTRY*, 14(6), 182–191.

- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. Van, & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Marcone, M. F. (2004). Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. *Food Research International*, 37, 901–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.008>
- Mesa, D., Figueroa, J. P., Leyes, E. A., Castillo, C. R., Collazo, A., Núñez, H. A., Viltres, D., Mirabal, Y., & Coll, Y. (2024). Preliminary Physical and Chemical Characterization of By-Products from Cuban Coffee Production. *Foods*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/foods13213348>
- Muharam, T., Fitriani, D., Fataya, D., Jannah, M., Zidan, M., Ghifari, A., & Sihombing, R. P. (2022). Karakteristik Daya Serap Air dan Biodegradabilitas Pada Bioplastik. *Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains Dan Teknologi*, 1(1), 35–49.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Resources , Conservation and Recycling Sustainable management of coffee industry by-products and value addition — A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 66, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Muzaifa, M., Hasni, D., Rahmi, F., & Syarifudin. (2019). What is kopi luwak? A literature review on production, quality and problems. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 365(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/365/1/012041>
- Ngamnok, T., Nimlamool, W., Amador-Noguez, D., Palaga, T., & Meerak, J. (2023). Efficiency of Lactiplantibacillus plantarum JT-PN39 and Paenibacillus motobuensis JT-A29 for Fermented Coffee Applications and Fermented Coffee Characteristics. *Foods*, 12(15), 2894.
- Nguyen, D. Van, Duong, C. T. T., Vu, C. N. M., Nguyen, H. M., Pham, T. T., Tran-Thuy, T.-M., & Nguyen, L. Q. (2023). Data on chemical composition of coffee husks and lignin microparticles as their extracted product. *Data in Brief*, 51, 109781. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109781>
- Nocianitri, K. A., Putu, I. D., Pratiwi, K., Wulandari, K., Ramona, Y., & Sujaya, I. N. (2025). Viabilitas probiotik *Lactocaseibacillus rhamnosus* SKG34 pada sari buah terung belanda (*Solanum betaceum* Cav.) terfermentasi selama penyimpanan pada suhu dingin. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 19(3), 679–689. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v19i3.26535>
- Oktiarni, D., Hermansyah, Ibrahim, E., Marsi, Hasanudin, Miksusanti, Yulianto, D. H., Rahmani, N., & Kasmiarti, G. (2023). Short Communication : The isolation of Klebsiella variicola ' s cellulase from Macrotermes gilvus gut in Indralaya Peatlands, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(8), 4218–4222. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240802>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem Eng Journal*, 13(2), 81–84.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues . I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*, 74(1), 69–80.
- Pang, J., Wang, J., Liu, Z., Zhang, Q., & Qi, Q. (2019). Identification and characterization of an Endo-glucanase secreted from cellulolytic Escherichia

- coli ZH-4. *BMC Biotechnology*, 19(63), 1–9.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Sta, J., & Beckham, G. T. (2014). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3). <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Rivera, A. M. P., Silva, J. L., Torres-Valenzuela, L. S., & Dorado, J. L. P. (2024). Development of Starter Inoculum for Controlled Arabica Coffee Fermentation Using Coffee By-Products (Pulp and Mucilage Broth), Yeast , and Lactic Acid Bacteria. *Fermentation*, 10(516), 1–25.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Peck, M. W., Hinton, J. C. D., Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., & Alston, M. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686 –701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Siddique, F., Mingxiu, Y., Xiaofeng, X., Zhe, N., Younis, H., Lili, P., & Junhua, Z. (2023). Comparative Genomic Analysis and Rapid Molecular Detection of *Xanthomonas euvesicatoria* Using Unique ATP-Dependent DNA Helicase *recQ* , *hrpB1* , and *hrpB2* Genes Isolated from *Physalis pubescens* in China. *The Plant Pathology Journal*, 39(2), 191–206.
- Singhania, R. rani, Kumar, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Soccol, C. R., Scopel, E., Alberto, L., Letti, J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Porto, L., & Vandenberghe, D. S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Suharman, Izzati1, N. K., & Himelda, T. A. N. (2023). Analisis Cemaran Mikroba dalam Produk Minuman Sari Kedelai dengan Metode Total Plate Count (TPC). *Journal of Innovative Food Technology and Agricultural Product*, 01(01), 9–13. <https://doi.org/10.31316/jitap.vi.5748>
- Wahyuningtyas, P., Argo, B. D., & Nugroho, W. A. (2013). Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatik Pada Produksi Bioetanol. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 1(1), 21–25.
- Wang, A., Gao, L., Ren, N., Xu, J., Liu, C., Cao, G., Yu, H., Liu, W., Hemme, C. L., He, Z., Zhou, J., Al, W. E. T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2011). Isolation and Characterization of *Shigella flexneri* G3 , Capable of Effective Cellulosic Saccharification under Mesophilic Conditions □ †. *Applied And Enviromental Microbiology*, 77(2), 517–523.
- Watanabe, H., Ng, C. H., Limvipuvadh, V., Suzuki, S., & Yamada, T. (2020). Gluconobacter dominates the gut microbiome of the Asian palm civet *Paradoxurus hermaphroditus* that produces kopi luwak. *PeerJ*, 8(e9579). <https://doi.org/10.7717/peerj.9579>
- Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020:

- A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- Yegin, S. (2025). Solid-state fermentation as a strategy for improvement of bioactive properties of the plant-based food resources. *Bioresources and Bioprocessing*, 12(140), 1–20.
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 67, pp. 319–338). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Zhu, Z., Cao, M., Zhou, X., Li, B., & Zhang, J. (2017). Epidemic characterization and molecular genotyping of *Shigella flexneri* isolated from calves with diarrhea in Northwest China. *Antimicrobial Resistance And Infection Control*, 6(92), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0252-6>

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 3

Lampiran 3. 1 Pembuatan Media *Nutrient Broth*



Lampiran 3. 2 Pembuatan Media *Nutrient Agar*



Lampiran 3. 3 NaOH 1 M



Lampiran 3. 4 Media CMC 1 %



Lampiran 3. 5 Media SSA 1 %



Lampiran 3. 6 NaCl 1 M



Lampiran 3. 7 Larutan Iodin 0,2% KI 2%



Lampiran 3. 8 Larutan Pati %



Lampiran 3. 9 Buffer Fosfat ph 6,2



Lampiran 3. 10 Larutan HCL 0,1 M



Lampiran 3. 11 Media Padat Ekstrak Kulit Tanduk



Lampiran 4

Lampiran 4. 1 Hasil Viabilitas Bakteri Pasca *Solid State Fermentation*



Lampiran 4. 2 Perhitungan Indeks Zona Bening Aktivitas Enzim Selulase



Lampiran 4. 3 Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase



Lampiran 4. 4 Perhitungan Indeks Zona Bening Aktivitas Enzim Amilase



Lampiran 4. 5 Perhitungan Aktivitas Enzim Amilase



Lampiran 4. 6 Kurva Standar Amilum (Amilase)



Lampiran 4. 7 Kurva Kalibrasi Amilum (Selulase)

