

# NILAI CERNA DAN BIODEGRADASI THEOBROMIN POD KAKAO DENGAN PERLAKUAN FERMENTASI MENGGUNAKAN INOKULUM MULTI MIKROBIA

Digestibility Value and Theobromine Biodegradation of Cocoa Pod with Treatment of Fermentation Using Multi Microbial Inoculum

Suci Wulandari<sup>1</sup>, Ali Agus<sup>2</sup>, Mohamad Soejono<sup>2</sup>, Muhammad Nur Cahyanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan, Politeknik Negeri Jember, Jl. Mastrip PO Box 164 Jember

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

<sup>3</sup>Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Email: suci\_ndariwulan@yahoo.com

## ABSTRAK

Beberapa tahun terakhir telah diberitakan adanya kultur multi mikrobia yang dipergunakan untuk fermentasi bahan pakan dan *complete feed*. Kultur multi mikrobia ini dikenalkan dengan nama Saus Burger Pakan® (SBP®). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fermentasi pod kakao menggunakan multimikrobia yang terkandung dalam SBP terhadap nilai cerna serat dan biodegradasi theobromin. Pod kakao difermentasi dalam kondisi anaerob pada suhu ruang. Kadar inokulum yang ditambahkan adalah 0; 0,05; dan 0,1 %. Selama fermentasi dilakukan pengambilan sampel pada hari ke-0, 3, dan 6 untuk mengetahui pertumbuhan bakteri selama fermentasi pod kakao, perubahan pH, perubahan nilai cerna, dan degradasi theobromin selama fermentasi, kemudian dilanjutkan dengan isolasi bakteri untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri dari pod kakao terfermentasi dengan cara isolat yang diperoleh diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase (CMC-ase dan  $\beta$ -glukoseidase) dan kemampuannya dalam mendegradasi theobromin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi pod kakao terjadi kenaikan populasi bakteri asam laktat dan bakteri total, penurunan pH, kenaikan nilai cerna serat, dan penurunan kandungan theobromin dalam pod kakao. Perubahan parameter tersebut lebih nyata terjadi pada pod kakao yang difermentasi dengan kadar air 40% dan diinokulasi dengan SBP® dosis 0,05% dengan lama fermentasi 6 hari. Penurunan theobromin pada pod kakao fermentasi terbesar mencapai 17,02%. Kenaikan nilai cerna serat dan penurunan kandungan theobromin selama fermentasi pod kakao oleh inokulan SBP dikonfirmasi dengan karakteristik isolat-isolat bakteri yang diperoleh dari pod kakao yang terfermentasi. Ada 8 isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim CMC-ase dan  $\beta$ -glukosidase dengan tingkat produksi yang berbeda-beda. Beberapa isolat bakteri juga mampu menurunkan kandungan theobromin dalam kultur cair sebesar 27,07%.

**Kata kunci:** Pod kakao, theobromin, nilai cerna serat, selulase

## ABSTRACT

In the recent years it has been reported that there is a multimicrobe culture which is used for fermentation of feed ingredients and complete feeds. This multi microbial culture is introduced by the name of SBP® (Saus Burger Feed). This research study aims to understand the influence of fermented cocoa pod using multi microbe which is contained in the SBP to digest and biodegrade theobromine in the cocoa pod. Cocoa pod was fermented under anaerobic conditions at room temperature. Inoculums levels which were added consist of 0; 0,05, and 0,1% respectfully. During fermentation of the cocoa pod, its samples were taken on days of 0, 3, and 6, to understand the bacterial growth, pH changes, and changes in digestibility, and biodegradation of theobromine. Furthermore, it was followed by the isolation of bacteria, to understand the characteristics of obtained bacterial isolates, and fermented cocoa pod by way of isolates, and tested its ability in producing the cellulase enzyme (CMC-ase and  $\beta$ -glucosidase), and its ability to degrade the theobromine. The research results showed that during fermentation of cocoa pod there were increasing of lactic acid bacteria population, and total bacteria, decreasing in the pH, increasing in the fiber digestibility, and decreasing in content of theobromine in the cocoa pod. Changes in these parameters, more real case, and the cocoa pod is fermented with a moisture content of

40% and inoculated with a dose of 0,05% SBP® with a long fermentation of 6 days. Decreasing in the fermentation of theobromine in the cocoa pod with the largest reaching of 17,02%. Increasing in the fiber digestibility, and decreasing in the content of theobromine, during fermentation of cocoa pod by inoculants SBP, it is confirmed with characteristic of bacterial isolates which is obtained from the fermented cocoa pod. There were 8 isolates of bacteria, which can produce CMC-ase enzyme, and  $\beta$ -glucosidase with the different level of production. Several bacterial isolates were also able to reduce the content of theobromine, in liquid culture, up to 27,07%.

**Keywords:** Cacao pod, theobromine, digestibility, cellulase

## PENDAHULUAN

Pod kakao sebetulnya mempunyai kandungan gizi yang cukup baik untuk digunakan sebagai bahan pakan ternak pengganti sebagian hijauan, karena mempunyai kandungan protein kasar (PK) 8% dan energi *total digestible nutrients* (TDN) 50,8%. Penggunaan pod kakao sebagai pakan dibatasi oleh adanya zat antinutrisi yaitu suatu zat alkaloid yang disebut theobromin (*3,7-dimethylxantine*) dan dapat menimbulkan keracunan pada ternak (Ching dan Wong, 1986). Pod kakao yang diberikan secara langsung pada ternak juga akan menurunkan berat badan ternak, sebab kandungan lignoselulosa yang tinggi menyebabkan pencernaan pod kakao menjadi rendah. Kandungan selulosa dan hemiselulosa pod kakao masing-masing sebesar 35 % dan 11 % (Sobamiwa, 1993).

Upaya peningkatan kualitas pod kakao dapat dilakukan baik secara fisik, kimia, biologi, atau kombinasinya. Cara yang relatif paling aman, aplikatif, dan tidak mencemari lingkungan yaitu cara biologis dengan metode fermentasi menggunakan inokulum mikrobial. Produk inokulum komersial yang beredar di pasaran sebagian besar produksi luar negeri. Indonesia sangat terbuka kesempatan untuk mengembangkan inokulum dengan menggunakan isolat bakteri lokal. Tingginya keanekaragaman mikroorganisme yang ada di Indonesia sangat memungkinkan untuk ditemukannya isolat potensial melalui *screening* yang efektif. Tahap selanjutnya isolat potensial tersebut dapat dikembangkan sebagai inokulum silase.

Beberapa tahun terakhir telah diberitakan adanya kultur multimikrobial yang dipergunakan untuk fermentasi bahan pakan. Inokulum mikrobial ini dikenalkan dengan nama SBP® (Saus Burger Pakan®). Inokulum mikrobial SBP® merupakan inokulum produksi lokal yang mengandung campuran mikrobial selulolitik, mikrobial asam laktat, mikrobial amilolitik, asam-amino esensial, vitamin, dan mineral.

Atas dasar tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efektivitas penggunaan inokulum mikrobial yang berupa campuran berbagai mikrobial seperti mikrobial selulolitik, mikrobial amilolitik, dan bakteri asam laktat yang terdapat pada SBP® dalam mengatasi masalah antinutrisi berupa serat kasar dan theobromin pada pod kakao.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Pod kakao segar dikumpulkan dari perkebunan rakyat di daerah kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul, DIY. Inokulum yang digunakan berasal dari inokulum mikrobial SBP® (Saus Burger Pakan) produksi CV. Agro Indo Utama, Yogyakarta, media MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) dari Oxoid, *Nutrient broth* (NB) dari Oxoid (mengandung yeast ekstrak 2 g/l, pepton 5 g/l, dan sodium chloride 5 g/l), *Agar bacteriological* dari Oxoid, *cellulose microcrystalline*, tetes, *anaerobic generating kit* dan pewarna *congo red*.

### Fermentasi Pod Kakao

Bubuk pod kakao steril sebanyak 1 kg dicampurkan dengan inokulum mikrobial yang telah diaktifkan pada larutan tetes secara merata dengan dosis sesuai perlakuan (dosis 0= 0 ml/100g; dosis 1= 0,05 ml/100g; dan dosis 2=0,1 ml/100g berat *as fed*) kemudian ditambahkan akuades steril sampai tercapai kadar air sekitar 40%. Dosis tetes yang digunakan sebanyak 2% dari total bubuk kakao yang digunakan. Bahan dimasukkan kedalam silo mini (botol steril) sambil dimampatkan untuk mencapai kondisi anaerob, kemudian ditimbang beratnya, dan ditutup rapat. Selanjutnya dilakukan pemeraman dengan waktu pemeraman sesuai perlakuan (0 hari, 3 hari dan 6 hari). Parameter yang diamati adalah pertumbuhan bakteri selama fermentasi, perubahan pH, kadar gula reduksi, perubahan nilai cerna serat dan pengamatan degradasi serat dengan photo SEM (*Scanning Electron Microscope*), serta degradasi theobromin.

### Isolasi Bakteri

Bubuk pod kakao steril sebanyak sekitar 80 g diatur kadar airnya sampai 40 % dan dicampur dengan inokulum mikrobial yang telah diaktifkan pada larutan tetes dengan dosis standar (0,05 ml/kg). Campuran dimasukkan ke dalam mini silo steril sambil dimampatkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari. Sampel diencerkan secara seri dalam larutan NaCl 0,85 % dan diplating dalam medium NA yang ditambah 1 % selulosa. Setelah inkubasi secara anaerobik pada suhu 37°C selama 48 jam, cawan petri diberi larutan *congo red*. Koloni

bakteri yang dikelilingi zona bening diambil, dimurnikan, dan disimpan untuk pengujian lebih lanjut.

### Pengujian Produksi Enzim Selulase

**Penyiapan inokulum sebagai indukan.** Sebanyak satu ose biakan murni bakteri selulolitik yang berasal dari fermentasi pod kakao diinokulasikan kedalam 10 ml medium cair. Medium cair terdiri dari 1,3% *Nutrient broth* (NB) dan 0,05% sistein HCl. Medium yang telah diinokulasi tersebut diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 48 jam menggunakan *anaerobic jar* yang telah diisi *anaerobic generating kit*. Bakteri selulolitik yang tumbuh digunakan sebagai indukan.

**Penyiapan sumber enzim.** Sebanyak 9 ml media cair diinokulasi dengan 1 ml indukan, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam secara anaerob menggunakan *anaerobic jar* yang telah diisi *anaerobic generating kit*. Medium cair yang digunakan terdiri dari 1,3% *Nutrient broth* (NB) dan 0,05% sistein HCl. Biakan kemudian disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh sebagai enzim yang kemudian diukur aktivitas enzim CMC-ase dan  $\beta$ -glucosidase.

### Pengujian Degradasi Theobromin dalam Kultur Cair

Koloni bakteri selulolitik hasil isolasi ditumbuhkan ke dalam medium cair yang mengandung theobromin 500 ppm. Komposisi medium sama dengan medium selektif (NB dan HCl sistein sebagai pengikat oksigen). Seluruh prosedur dikerjakan secara anaerob, selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 48 jam menggunakan *anaerobic jar* yang telah diisi *anaerobic generating kit*. Bakteri selulolitik yang tumbuh pada media yang mengandung theobromin tersebut dihitung pada jam ke-48 yang merupakan waktu optimal untuk pertumbuhan bakteri selulolitik dari hasil percobaan sebelumnya.

### Cara Analisis dan Pengujian

**Analisis populasi bakteri asam laktat dan bakteri total.** Sampel pod kakao terfermentasi (dengan dosis inokulum mikrobial dan waktu inkubasi sesuai perlakuan) masing-masing ditambahkan larutan isotonik NaCl 0,85% steril sampai tercapai konsentrasi  $10^{-1}$ , kemudian diambil 1 ml dan dilakukan pengenceran seri dengan larutan isotonik NaCl 0,85% steril. Masing-masing pengenceran diambil 1 ml dan diinokulasikan pada media padat dalam *petridish*. Media padat yang digunakan untuk analisis populasi bakteri asam laktat adalah MRS 5,2% ditambah  $\text{CaCO}_3$  (1%), selanjutnya diinkubasi selama 48 jam suhu 37°C secara aerob. Adanya bakteri asam laktat ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar bakteri asam laktat. Sedangkan untuk bakteri total menggunakan media PCA (*plate count agar*) produksi Oxoid

ditambah Sistein HCl 3% secara anaerob menggunakan *anaerobic jar* yang telah diisi *anaerobic generating kit*. (Food and Drug Administration, 1995).

**Analisis pH.** Sampel sebanyak 1 g ditambah dengan 10 ml aquades kemudian dihomogenkan dengan cara diaduk, kemudian dilakukan pengukuran pH dengan alat pH meter merk Hanna tipe HI 8520 (AOAC, 2005).

**Analisis neutral detergent fiber (NDF).** NDF dianalisis menggunakan metode standar. Sampel dipanaskan dalam *neutral detergent solution*, yang merupakan campuran EDTA, sodium hydrogen fosfat, sodium borat, etil etanol, dan sodium sulfat, selama 1 jam. Setelah dicuci dengan aseton beberapa kali, residu dikeringkan sampai beratnya konstan dan ditimbang. Jumlah residu kering merupakan kadar NDF (Van Soest dkk., 1991).

**Analisis gula reduksi.** Sampel sebanyak 0,5 g ditambah 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dilanjutkan dengan deproteinasi sampel dengan cara 0,5 g sampel dimasukkan dalam tabung sentrifuse berisi 1,5 ml aquades dan ditambah 0,2 ml  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,3N dan divorteks, setelah itu ditambah 0,2 ml  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5% dan disentrifuse pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan digunakan untuk pengukuran gula reduksi. Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 1 ml larutan Nelson dan dipanaskan pada air mendidih 20 menit, selanjutnya dilakukan pendinginan sehingga suhu tabung mencapai 25°C, kemudian ditambah 1 ml larutan arsenomolibdat dan divorteks, kemudian ditambah 7 ml aquades, divorteks dan ditera menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Untuk blanko digunakan aquades dengan perlakuan yang sama sejak deproteinasi (Plummer, 1971).

**Analisis acid detergent fiber (ADF).** ADF dianalisis menggunakan metode standar. Sampel dipanaskan dalam *acid detergent solution*, yang merupakan campuran asam sulfat dan CTAB, selama 1 jam. Residu dicuci dengan air panas kemudian aseton beberapa kali dan dikeringkan sampai beratnya konstan. Jumlah residu kering merupakan kadar ADF (Van Soest dkk., 1991).

**Scanning electron microscope (SEM).** Pelaksanaan foto SEM dimaksudkan untuk mengamati secara visual tingkat degradasi serat oleh bakteri selulolitik dari inokulum mikrobial, untuk mendukung data dari hasil pengamatan secara laboratorium dengan uji NDF dan ADF. Prosedur pelaksanaannya adalah: menyiapkan sampel sesuai persyaratan pengujian SEM yaitu: kering sempurna, tidak mengandung gas karena akan mengganggu sistem kefokusian yang berakibat gambar menjadi kabur, bersifat menghantar listrik (dengan melapisi emas). Pod kakao segar diiris tipis dengan posisi melintang, berukuran 5-7 mm. Dikeringkan dengan oven 50°C (sekitar satu jam), kemudian sampel pod kakao ditempelkan pada *specimen stage* menggunakan isolasi

*double side* atau *carbon tape* dan dilakukan *coating* dengan lapisan emas selama 5-10 menit. Setelah itu setiap sampel diamati dengan mikroskop elektron dengan cara memasukkan sampel kedalam kolom dan divakumkan sekitar 2-3 menit sampai pada kondisi siap diamati. Alat SEM yang digunakan merek Jeol JSMT300 dengan resolusi 6 nm dan alat *coating*: Fine coat, ion sputter JFC.1100 (Pusposendjojo, 1988).

**Analisis theobromin.** Sampel pod kakao sebanyak 1 gram diekstrak dengan petroleum ether sebanyak 30 ml, kemudian disentrifuse 200 rpm selama 10 menit. Akuabides ditambahkan 25 ml dan divorteks, dilanjutkan dengan sterilisasi pada suhu 100°C selama 30 menit. Tahap selanjutnya di vorteks dan disentrifuse 2000 rpm selama 5 menit. Sampel diambil, 1 ml sampel dimasukkan dalam labu 10 ml dan ditambahkan H<sub>2</sub>O sampai tanda, kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan millex 0,45 µm dan diinjeksikan pada HPLC. Standar theobromin 1020 ppm dibuat dengan melarutkan 10,2 mg dalam 10 ml aquadest. HPLC yang dipakai menggunakan kolom C18, eluent MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60), flow 1,2 ml/min dan Pj Gel 272 nm (AOAC, 2005).

**Uji aktivitas CMC-ase.** Aktivitas CMC-ase dianalisis dengan menghitung gula mereduksi yang dilepaskan oleh reaksi hidrolisis CMC oleh enzim selulase pada suhu 50°C. Gula reduksi dianalisis menggunakan metode ferrisianida. Satu unit aktivitas CMC-ase didefinisikan sebagai millimol glukosa yang dibebaskan oleh hidrolisis CMC selama satu menit (Halliwell dkk., 1985).

**Uji aktivitas β-glukosidase.** Aktivitas β-glukosidase diuji dengan menggunakan reaksi campuran senyawa yang terdiri dari 1 ml p-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNPG) 0,1% dalam 0,1 M buffer Glycine-NaOH (pH 8) dan 0,5 ml larutan enzim. Reaksi berlangsung pada suhu 50°C selama 15 menit dan dihentikan dengan cara ditambahkan 2 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. p-Nitrophenol (pNP) yang dilepaskan dan diukur

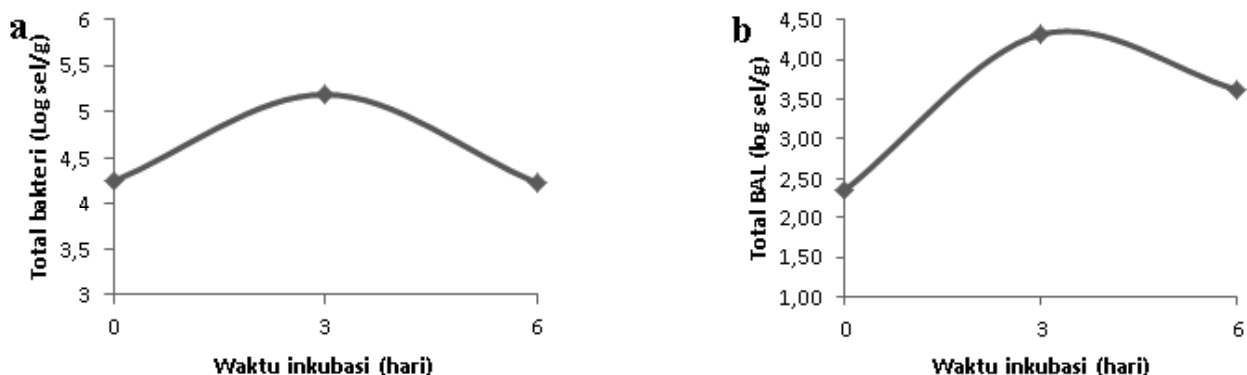
pada panjang gelombang 410 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 µmol pNP per menit (Madhu dkk., 2009).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Bakteri selama Fermentasi Pod Kakao

Pemberian inokulum mikrobial pada silase pod kakao yang terdiri dari campuran bakteri asam laktat, bakteri selulolitik dan bakteri amilolitik, selain untuk mempercepat penurunan pH karena produksi asam organik dari bakteri asam laktat, juga dimaksudkan untuk menurunkan kandungan serat dari pod kakao oleh bakteri selulolitik yang sekaligus mempunyai kemampuan mendegradasi senyawa alkaloid theobromin. Dari hasil isolasi dan *counting* menunjukkan bahwa ada selisih jumlah bakteri total dengan total bakteri asam laktat yaitu terbesar sejumlah 0,87 log sel/g dimana bakteri total tertinggi pada hari ke-3 berjumlah 5,19 log sel/g sedangkan untuk BAL berjumlah 4,32 log sel/g (Gambar 1).

Hal ini menunjukkan bahwa bakteri selain bakteri asam laktat juga tumbuh selama proses silase pod kakao. Sejak hari ke nol fermentasi, bakteri dalam silase pod kakao sudah dapat tumbuh dan terus berkembang sampai fermentasi hari ke tiga dan mengalami penurunan lagi pada fermentasi hari ke enam (Gambar 1a). Sumber energi untuk pertumbuhan awal bakteri tersebut dimungkinkan dari pemanfaatan tetes sebagai sumber karbohidrat terlarut yang ditambahkan saat pembuatan silase. Dinyatakan oleh Emanuel (2005) bahwa tetes utamanya digunakan sebagai sumber gula mikroorganisme dalam proses silase. Penambahan tetes tersebut dapat meningkatkan jumlah gula terlarut bagi perkembangan awal bakteri asam laktat (Eblex, 2011).



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri total (a) dan total bakteri asam laktat (BAL) (b) selama fermentasi pod kakao oleh inokulum SBP®

Penambahan tetes dalam proses silase sangat diperlukan karena pod kakao, seperti limbah pertanian dan perkebunan lainnya, mempunyai kadar serat yang tinggi, sumber energi yang rendah dan pencernaan yang rendah. Kondisi ini serupa dengan hasil penelitian Yang (2006) bahwa jerami utamanya terdiri dari selulosa, hemiselulosa, lignin, rendah energi, rendah pencernaan dan rendah kandungan protein. Untuk mendapatkan silase jerami dengan kualitas yang bagus perlu ditambahkan gula seperti tetes, laktosa, sereal, jagung atau tepung tapioka sebagai sumber karbon mikroorganisme, hal ini dikarenakan rendahnya sumber karbohidrat terlarut dari jerami.

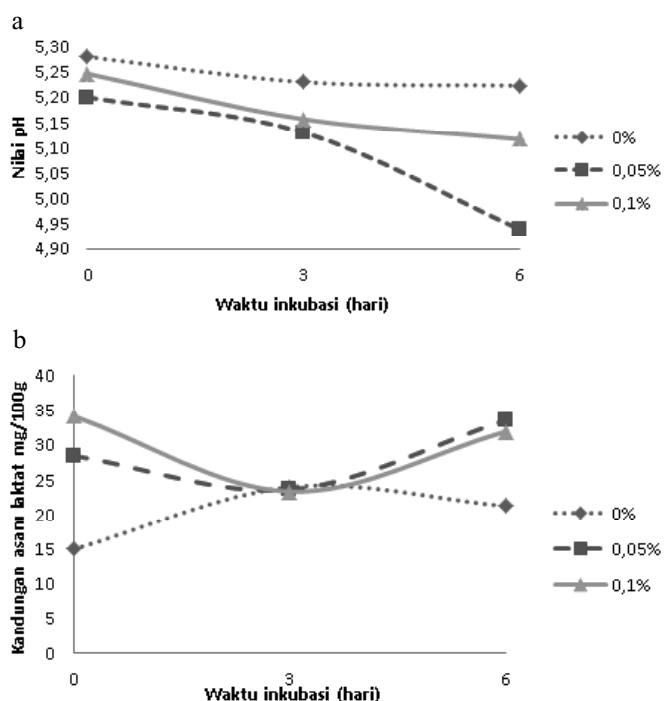
Dari hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa bakteri selulolitik (yang berfungsi meningkatkan pencernaan serat produk) mampu hidup bersama dengan bakteri asam laktat (BAL) (yang menghasilkan asam laktat yang mempunyai sifat preservatif) dalam pod kakao. Dalam perkembangannya bakteri asam laktat tersebut mendapatkan gula terlarut dari hasil perombakan selulosa oleh bakteri selulolitik. Hal ini serupa dengan hasil penelitian Wulandari (2003) bahwa bakteri *L. plantarum* yang ditambahkan dalam silase dapat memanfaatkan karbohidrat terlarut yang dihasilkan dari perombakan komponen yang lebih kompleks oleh *P. cryosporium*.

Waktu fermentasi berpengaruh terhadap jumlah bakteri asam laktat (Gambar 1b), pada waktu fermentasi 3 hari jumlah bakteri asam laktat meningkat yaitu dari  $2,3 \times 10^2 \pm 2,36 \times 10^2$  menjadi  $2,08 \times 10^4 \pm 2,40 \times 10^4$  dan setelah fermentasi 6 hari terjadi penurunan jumlah bakteri asam laktat menjadi  $4,13 \times 10^3 \pm 9,80 \times 10^3$ . Peningkatan jumlah bakteri asam laktat pada 3 hari pertama sangat diperlukan untuk mempercepat penurunan pH yang diakibatkan dari produksi asam laktat agar dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme anaerob yang tidak diinginkan seperti *Clostridia* dan *Listeria*. *Clostridia* akan memfermentasi karbohidrat dan protein yang menyebabkan menurunnya nilai nutrisi pakan. *Clostridia tyrobutyricum* sangat merugikan dalam pembuatan silase karena mendegradasi asam laktat menjadi asam butirat, H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub>. *Listeria monocytogenes* bersifat patogen terhadap manusia dan ternak, namun dibawah kondisi anaerob dengan pH rendah *Listeria* secara cepat dapat dimatikan. Oleh karena itu *Listeria* tidak dapat berkembang pada fermentasi yang baik yaitu proses fermentasi yang dapat dengan cepat memperoleh pH rendah (Elferink dkk., 1999). Menurut Kung (2001) proses pembuatan silase dengan kualitas yang bagus adalah pH silase dapat menurun secara cepat pada hari ke dua sampai ke tiga fermentasi.

Dari hasil penghitungan jumlah bakteri asam laktat dengan perlakuan lama hari dan dosis bakteri menunjukkan bahwa jumlah bakteri asam laktat masih dibawah jumlah optimum dalam silase. Menurut Kung (2001) bahwa jumlah

optimal bakteri asam laktat silase adalah  $1 \times 10^5$  CFU/g berat segar dan menurut Keles dkk. (2010) adalah  $1 \times 10^6$  CFU/g berat segar, sedangkan pada fermentasi pod kakao disini paling banyak dicapai pada hari ke tiga rata-rata hanya sebesar  $2,08 \times 10^4 \pm 2,40 \times 10^4$ .

Rendahnya pH awal fermentasi silase pod kakao yaitu  $5,28 \pm 0,10$  dikarenakan pH pod kakao (sebelum dibuat silase) tersebut bersifat asam dengan pH sekitar 5,32, bukan karena produksi asam laktat dari bakteri asam laktat pada saat awal fermentasi. pH terendah pada fermentasi hari ke-6 dengan dosis 1 (0,05% berat *as feed* pod kakao) yaitu sebesar  $4,94 \pm 0,04$  (Gambar 2a).



Gambar 2. Perubahan nilai pH (a) dan kandungan asam laktat (b) selama fermentasi pod kakao oleh inokulum SBP®

Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan produksi asam laktat masih terjadi sampai pemeraman enam hari. Penurunan pH ini dalam proses silase diperlukan antara lain untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan (2001). Kandungan asam laktat mencerminkan nilai pH silase (Gambar 2b). Kandungan asam laktat tertinggi terdapat pada silase pod kakao pada fermentasi hari ke enam dengan dosis inokulum 1 (0,05% dari berat *as feed* pod kakao) yaitu sebesar  $33,57 \pm 2,42$  mg/100 g berat sampel *as fed*, hal ini nampak dari pH silase pod kakao yang mempunyai nilai terkecil yaitu  $4,94 \pm 0,04$ . Demikian juga pada perlakuan hari ke nol dan dosis inokulum 0 mg/g berat sampel *as fed* mengandung asam laktat yang paling rendah yaitu  $14,98 \pm 0,49$

yang nampak pada nilai pH yang paling tinggi. Semakin tinggi kandungan asam laktat akan semakin menurunkan nilai pH silase.

Perkecualian terjadi pada pod kakao yang difermentasi dengan inokulum mikrobia SBP untuk hari ke nol sampai hari ketiga terjadi tren penurunan pH yang tidak disertai kenaikan asam laktat, hal ini mungkin saja terjadi dikarenakan pada awal fermentasi yang berkembang tidak hanya bakteri asam laktat yang homofermentatif tetapi juga berkembang bakteri asam laktat yang menghasilkan asam lain seperti asam asetat. Menurut McDonald dkk. (1991) bahwa berdasarkan fisiologinya, bakteri asam laktat dibagi menjadi 3 kelompok: 1) obligat homofermentatif, yaitu yang memfermentasi heksosa sebagian besar menjadi asam laktat; 2) fakultatif homofermentatif, yaitu yang memfermentasi heksosa sebagian besar menjadi asam laktat, tetapi juga memfermentasi heksosa sebagian menjadi asam laktat dan asetat dan 3) obligat heterofermentatif, yaitu yang memfermentasi heksosa menjadi asam laktat, asam asetat dan karbondioksida.

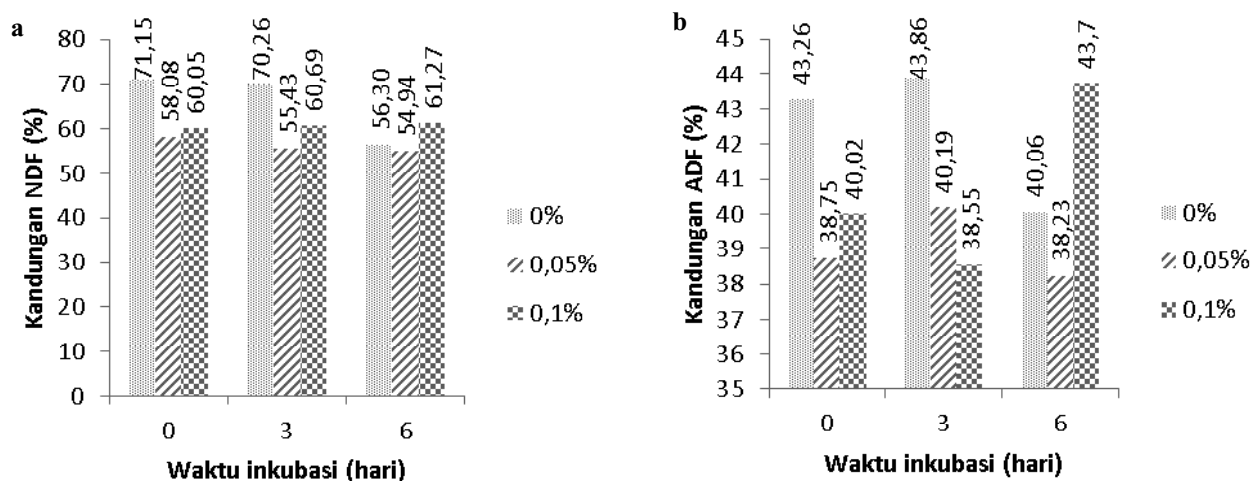
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan gula reduksi dari pod kakao yang difermentasi selalu rendah. Pada perlakuan penambahan dosis inokulum mikrobia 0%, 0,05% dan 0,1% berturut-turut adalah 0,32%, 0,33% dan 0,27%. Kandungan gula reduksi pod kakao dengan lama fermentasi 0, 3 dan 6 hari masing-masing adalah 0,26%, 0,34% dan 0,32%. Selalu rendahnya kandungan gula pod kakao fermentasi tersebut dikarenakan gula hasil degradasi bakteri selulolitik tersebut selain langsung dimanfaatkan bakteri selulolitik itu sendiri juga dimanfaatkan oleh bakteri lain seperti bakteri asam laktat. Menurut Yang dkk. (2006) bahwa gula (seperti glukosa) utamanya digunakan sebagai sumber karbon oleh mikrobia. Dalam proses silase bakteri asam laktat akan mengubah glukosa tersebut menjadi asam laktat dibawah kondisi anaerob.

### Perubahan Nilai Cerna selama Fermentasi Pod Kakao

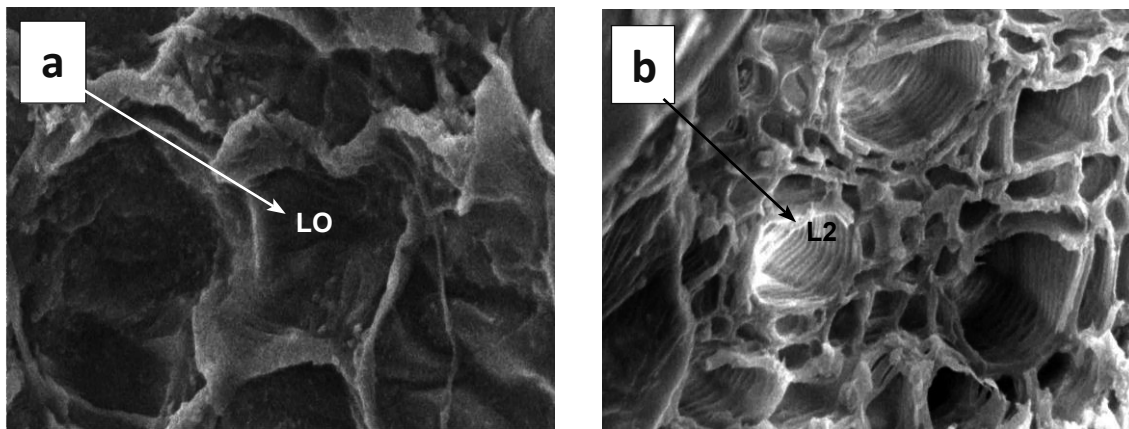
Komponen dinding sel dapat ditentukan dengan menghitung kandungan NDF (Jancik dkk., 2008) dimana komponen utama NDF adalah selulosa, hemiselulosa dan lignin (Van Soest dkk., 1991). Rata-rata kandungan NDF pod kakao disini lebih dari 35% yaitu sebesar  $60,91 \pm 14,80$  (%) sehingga termasuk dalam bahan pakan kelas satu (Hartadi., 2005). Dari hasil analisis nampak perlakuan dosis dan lama pemeraman berpengaruh nyata terhadap kandungan NDF dan terdapat interaksi. Penurunan NDF terbesar terjadi pada pemeraman selama 6 hari dengan dosis inokulum mikrobia 1 atau 0,05% bahan pod kakao (Gambar 3).

Hal ini menunjukkan bahwa setelah 3 hari masih terjadi perombakan dinding sel mampu menurunkan NDF dikarenakan dengan penambahan dosis inokulum mikrobia sebanyak dua kalinya belum mampu meningkatkan jumlah bakteri secara nyata yaitu sebesar  $7,62 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^5$  cfu/g (untuk dosis 1) dan  $1,90 \times 10^4 \pm 1,51 \times 10^4$  cfu/g. Bakteri total tersebut terdiri dari bakteri selulolitik dan BAL, sedangkan menurut McDonald dkk. (1991) kebutuhan starter pada silase untuk memberikan pengaruh yang terbaik diperlukan mikrobia selulolitik sebesar  $1,6 \times 10^4$  cfu/g BK.

Komponen utama dari ADF adalah selulosa dan lignin. Bakteri selulolitik dalam inokulum mikrobia yang ditambahkan dalam pod kakao fermentasi mampu mendegradasi selulosa dinding sel pod kakao. Dari hasil analisis ADF menunjukkan bahwa penggunaan inokulum mikrobia SBP dosis 0,05% mampu menurunkan ADF pod kakao dari  $42,40 \pm 3,02$  (%) menjadi  $39,06 \pm 2,45$  (%) (Gambar 3b). Hal ini dikarenakan adanya enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik yang berkembang selama fermentasi. Menurut Lin dkk. (2012) bahwa enzim selulase merupakan enzim kompleks yang secara bertahap memotong antar molekul pada ikatan  $\beta$ -1,4-glukosidik. Memotong rantai selulosa menjadi



Gambar 3. Perubahan kandungan NDF dan ADF selama fermentasi pod kakao oleh SBP®



Gambar 4. Jaringan pod kakao (kering) pada bagian tengah sebelum (a) dan sesudah (b) fermentasi dengan inokulum mikrobia SBP® (perbesaran 1000X).

unit selobiosa, dan memotong selobiosa dan oligosakarida menghasilkan glukosa.

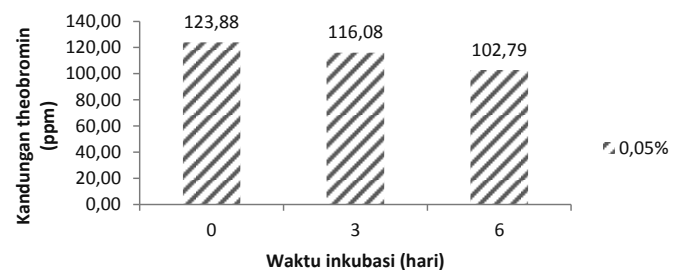
Bentuk jaringan pod kakao bagian tengah bersekat-sekat seperti rumah tawon (Gambar 4). Dengan perlakuan fermentasi secara anaerob selama 6 hari dengan menambahkan inokulum mikrobia SBP® sebanyak 0,05%, nampak adanya degradasi pada bagian yang lunak diantara sekat-sekat dinding sel yang kuat (Gambar 4, L2), sedangkan dinding sel pod kakao nampak pada kondisi tertutup (Gambar 4, L0) saat sebelum dilakukan fermentasi.

Hal ini dimungkinkan karena komponen dari sekat-sekat dinding sel pod kakao yang tidak terdegradasi tersebut diperkuat lignin yang membentuk jaringan kristal yang sukar didegradasi oleh bakteri selulolitik yang berasal dari inokulum mikrobia. Sedangkan bagian yang lunak kemungkinan sebagian besar terdiri dari komponen selulosa dan hemiselulosa. Perez dkk. (2002) menjelaskan bahwa keberadaan lignin dalam dinding sel memperkuat struktur dinding sel, tidak mudah larut dan tahan terhadap serangan mikrobia maupun tekanan oksidatif. Selulosa lebih mudah didegradasi secara enzimatik, sedangkan komponen utama dari hemiselulosa adalah *glucuronoxylan*, dimana *glucomanan* utamanya terdapat pada bagian kayu yang lunak.

#### Degradasi Theobromin selama Fermentasi Pod Kakao

Dari hasil analisis data menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kandungan theobromin pod kakao fermentasi. Fermentasi selama 6 hari menurunkan kandungan theobromin sekitar 17,02%, yaitu dari 123,9 ppm pada awal fermentasi menjadi 102,8 ppm setelah fermentasi selama 6 hari (Gambar 5).

Hal ini mungkin dikarenakan untuk menstimulir aktivitas degradasi theobromin, yang merupakan turunan kafein, bakteri memerlukan sumber karbohidrat berupa



Gambar 5. Perubahan kandungan theobromin pod kakao fermentasi (ppm)

gula-gula sederhana yang dimungkinkan berasal dari hasil degradasi pod kakao, sehingga memerlukan waktu untuk dapat mendegradasi theobromin secara optimal. Hasil penelitian Gokulakrishnan dkk. (2006) menunjukkan bahwa adanya sukrosa dalam medium akan menstimulir aktivitas enzim pendegradasi kafein dari bakteri *Pseudomonas sp.* Adanya sukrosa, aktivitas enzimnya mencapai 100% selama 48 jam. Serupa dengan hal tersebut, adanya laktosa, disakarida yang terdiri galaktosa dan glukosa, mampu mendegradasi kafein sampai lebih dari 90%. Jalur degradasi theobromin sama dengan kafein. Theobromin adalah prekursor langsung dari kafein pada semua tanaman (Mazzafera, 2004).

Peningkatan suhu selama proses fermentasi, dimungkinkan berpengaruh pula terhadap kerusakan theobromin sehingga menyebabkan penurunan kandungan theobromin. Hal ini serupa dengan kerusakan theobromin akibat panas dari proses perebusan ataupun pengeringan. Menurut Sukha (2003) bahwa pod kakao tidak berbahaya diberikan pada ternak jika dihilangkan theobromin seperti melalui perebusan selama 1,5 jam atau pengeringan. Dari banyaknya penurunan kandungan theobromin dapat diketahui bahwa dosis penggunaan inokulum mikrobia SBP terbaik untuk

penurunan theobromin pod kakao secara fermentasi dengan kadar air 40% adalah dosis 0,05% dari berat *as feed* dengan lama fermentasi selama 6 hari.

**Karakteristik Isolat Bakteri dari Pod Kakao Terfermentasi**

Setelah masa inkubasi selesai, bakteri yang tumbuh pada media selektif (media padat NA 1,8% dengan selulosa kristal (1%) sebagai sumber karbon), dilanjutkan dengan uji pewarnaan menggunakan *congo red* (merah kongo) pada cawan petri replika untuk memperjelas zona bening. Merah kongo ini akan berinteraksi kuat dengan ikatan -1,4-glikosidik dalam selulosa. Interaksi ini berlangsung secara nonkovalen. Merah kongo disini dijadikan indikator terjadinya degradasi -D-glukan dalam media agar (Teather dan Wood, 1981). Menurut Ochoa-Solano dan Olmos-Soto (2006), isolat yang menghasilkan diameter zona bening dua kali diameter koloni merupakan produser enzim yang potensial. Dari hasil uji pewarnaan tersebut dihasilkan beberapa jenis isolat bakteri selulolitik. Dari hasil pengamatan secara visual didapatkan 8 jenis bakteri selulolitik yaitu bakteri A, B, C, D, E, F, G, dan H, untuk selanjutnya diuji aktivitas enzim cmc-ase dan  $\beta$  glukosidase (Tabel 1), serta kemampuannya dalam mendegradasi theobromin (Tabel 2).

Tabel 1. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase

| Isolat bakteri | CMC-ase<br>$\mu$ Unit | $\beta$ -glukosidase<br>$\mu$ Unit |
|----------------|-----------------------|------------------------------------|
| A              | 6,691                 | 0,516                              |
| B              | 2,676                 | 0,516                              |
| C              | 2,162                 | 0,605                              |
| D              | 2,882                 | 0,527                              |
| E              | 1,750                 | 0,628                              |
| F              | 1,132                 | 0,583                              |
| G              | 2,059                 | 0,493                              |
| H              | 1,132                 | 0,583                              |

Diantara kedelapan jenis bakteri selulolitik tersebut yang tertinggi aktivitas CMC-ase adalah bakteri A, bakteri yang lain bervariasi dan berada dalam kisaran antara 1 sampai 3  $\mu$ U dengan waktu inkubasi 2 hari. Menurut Meryandini dkk. (2009) bahwa setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, selain karena macam sumber karbon yang digunakan, juga tergantung pula dari gen yang dimiliki. Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua bakteri selulolitik yang mampu hidup di pod kakao yang tinggi kadar serat dan ligninnya mempunyai kemampuan

mendegradasi serat yang tinggi terutama dalam memotong ikatan -1,4-glikosida selulosa amorf menjadi dalam bentuk yang lebih sederhana seperti oligosakarida atau selobiosa. Kondisi ini mungkin saja terjadi seperti pada bakteri D dan F yang lebih dominan menghasilkan enzim lainnya, yaitu enzim -Glukosidase. Hasil penelitian Han dkk. (2003) menunjukkan bahwa ekspresi enzim selulase berhubungan dengan ekspresi enzim hemiselulase. Kemungkinan hal ini juga terjadi pada isolat yang digunakan dalam penelitian ini.

Semua bakteri selulolitik hasil isolasi pod kakao fermentasi menunjukkan adanya aktivitas enzim -glukosidase. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas degradasi dari bakteri selulolitik dimana enzim  $\beta$ -glukosidase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik untuk memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa. Menurut Kim (1995) dan Lin dkk. (2012) bahwa enzim selulase merupakan sistem enzim yang terdiri dari endo-1,4- $\beta$ -glukanase, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase, dan  $\beta$ -D-glukosidase. Peran dari  $\beta$ -D-glukosidase adalah memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa.

Bakteri selulolitik anaerobik hasil dari isolasi pod kakao yang difermentasi dengan penambahan inokulum mikrobial SBP mampu mendegradasi theobromin yang terkandung dalam medium cair *Nutrient broth* (NB). Kemampuan mendegradasi tertinggi sebesar 27,07% dan terendah 7,27% (Tabel 2).

Tabel 2. Kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi theobromin dalam kultur cair

| Kode bakteri | Hasil Theobromin<br>ppm | Persentase degradasi<br>% |
|--------------|-------------------------|---------------------------|
| A            | 407,43                  | 18,51                     |
| B            | 408,90                  | 18,22                     |
| C            | 453,81                  | 9,24                      |
| D            | 404,53                  | 19,09                     |
| E            | 420,89                  | 15,82                     |
| F            | 463,67                  | 7,27                      |
| G            | 445,38                  | 10,92                     |
| H            | 364,67                  | 27,07                     |

\* Kadar theobromin awal dalam medium cair: 452,1 ppm

Hal ini menunjukkan bahwa bakteri-bakteri selulolitik yang tumbuh pada pod kakao tersebut selain mempunyai aktivitas selulolitik sekaligus mampu mendegradasi theobromin. Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan bakteri aerob yang mampu mendegradasi kafein, termasuk theobromin, yaitu *Pseudomonas sp.* (Mazzafera, 2002). Dijelaskan lebih lanjut bahwa ada 14 katabolit hasil



degradasi kafein oleh *Pseudomonas putida* yaitu: thebromin, paraxanthin, 7-monomethylxanthin, xanthin, 3,7-dimethyluric acid, 1,7-dimethyluric acid, 7-methyluric acid, uric acid, allantoin, allantoic acid, ureidoglicolic acid, glycolic acid, urea dan formaldehid (Mazzafera, 2002; Mazzafera, 2004).

## KESIMPULAN

Dari penelitian dapat disimpulkan bahwa inokulum mikrobia SBP dapat digunakan sebagai fermentor untuk peningkatan nilai cerna dan penurunan theobromin pod kakao dengan dosis optimum 0,05% dengan lama waktu inkubasi 6 hari pada kadar air 40%. Dari hasil isolasi bakteri selama fermentasi pod kakao diketahui ada 8 isolat bakteri selulolitik yang tumbuh pada pod kakao tersebut. Bakteri yang tumbuh tersebut selain menghasilkan enzim selulase juga mampu mendegradasi theobromin.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC (2005). *Official Method of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.
- Ching, A.L. dan Wong, H.M. (1986). Utilization of cocoa shell in pig feed. *Singapore Journal of Primary Industries* **14**: 133-13.
- Eblex (2011). Making grass silage for better returns. Agriculture and horticulture development board. [http://www.eblex.org.uk/documents/content/returns/brp\\_b\\_brpmanual5-makinggrassilageforbetterreturns070211.pdf](http://www.eblex.org.uk/documents/content/returns/brp_b_brpmanual5-makinggrassilageforbetterreturns070211.pdf). [2 Maret 2013].
- Elferink, S.J.W.H.O., Driehuis, F., Gottschal, J.C. dan Spoelstra, S.F. (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. Proceedings of The FAO Electronic Conference on Tropical Silage. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 1 September to 15 December 1999.
- Emanuel, V., Adrian, V., Ovidiu, P. dan Gheorghe, C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology* **4**: 403-408.
- Food and Drug Administration (1995). *Microbiological Analytical Methods*. Food and Drug Administration. US.
- Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K. dan Gummadi, S.N. (2006). A preliminary study of caffeine degradation by *Pseudomonas* sp. GSC 1182. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 346-350.
- Halliwell, G., Wahab, M.N.B.A. dan Patel, A.H. (1985). Chemical composition of endo-1,4- $\alpha$ -glucanase to cellulolytic in *Trichoderma coningi*. *Journal of Applied Biochemistry* **7**: 43-45.
- Han, S.O., Yukawa, H., Inui, M. dan Doi, R.H. (2003). Regulation of expression cellulosomal cellulose and hemicellulose genes in *Clostridium cellulovorans*. *Journal of Bacteriology* **185**: 6067-6075.
- Hartadi, H., Reksohadiprodjo, S. dan Tillman, A.D. (2005). *Tabel Komposisi Pakan untuk Indonesia*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Jancik, F., Homolka, P., Cermak, B. dan Lad, F. (2008). Determination of indigestible neutral detergent fibre contents of grasses and its prediction from chemical composition. *Journal of Animal Science* **53**: 128-135.
- Kim, C.H. (1995). Characterization and substrate specificity of an endo-1,4- $\alpha$ -D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 959-965.
- Kung, L. (2001). Silage fermentation and additives. Dalam: *Direct-fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium*. Miller Publishing Co., Minnetonka, Minnesota.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H. dan Wang, D. (2012). Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* **15**(3): 1-7.
- Madhu, K.M., Beena, P.S. dan Chandrasekaran, M. (2009). Extracellular  $\alpha$ -glucosidase production by a marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under solid state fermentation using statistical experimental design. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **14**: 457-466.
- McDonald, P., Henderson, A.R. dan Heron, S.J. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications, 13 Highwoods Drive, Marlow Bottom.
- Mazzafera, P. (2002). Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffeehusk and pulp in animal feeding. *Science and Agriculture* **59**: 815-821.
- Mazzafera, P. (2004). Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Frontiers in Bioscience* **9**: 1348-1359.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania N. dan Satria, H. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains* **13**: 33-38.

- Ochoa-Solano, J.L. dan Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* **23**: 519-525.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., De la Rubia, T. dan Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* **5**: 53-56.
- Plummer, D.T. (1971). *An Introduction to Practical Biochemistry*. McGraw Hill Publ.Co. Ltd. Bombay. New Delhi.
- Pusposendjojo, N. (1988). Mikroskop Elektron. Laboratorium Analisis Kimia dan Fisika Pusat. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sobamiwa, O. (1993). Use of cocoa-pod husk in poultry feeds: a particular reference to the Nigerian situation. *Dalam: De Lafforest J (ed) Proceedings of 11<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, Yamoussoukro Cote D'Ivoire, 18-24 July 1993.*
- Sukha, D.A. (2003). *Potential Value Added Products from Trinidad and Tobago Cocoa*. Proc.of Sem./Exhibition on The Revitalization on The Trinidad and Tobago Cocoa Industry-Targets, Problems and Options. The Association of Professional Agricultural Scientists of Trinidad and Tobago (APASTT). Faculty of Science and Agriculture. The University of the West Indies. St. Augustine. 20<sup>th</sup> September 2003. pp. 69-73.
- Teather, R.M. dan Wood, P.J. (1981). Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **4**: 777:780.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. dan Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**: 3583-3597.
- Wulandari, S. (2003). Pengaruh prehidrolisis enzimatis dari *Phanerochaete cryosporium* dan pemberian inokulan *Lactobacillus plantarum* terhadap nilai nutrisi silase rumput Gajah. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis*. Special Edition. **Oktober**: 279-285.
- Yang, H.Y., Wang, X.F., Liu, J.B. dan Gao, L.J. (2006). Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 232-237.