

Viabilitas mikroba selulolitik pada media berbasis *pod* dan *pulp* kakao (*Theobroma cacao*)

Cellulolytic microbial viability on cocoa (*Theobroma cacao*) *pod* and *pulp*-based media

Nisfatin SHOFIANA¹⁾, Titi Candra SUNARTI²⁾ & Anja MERYANDINI^{1,3)*}

¹⁾ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Dramaga Bogor 16680

²⁾ Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Dramaga, Bogor 16680

³⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi, IPB University, Dramaga, Bogor 16680

Diterima tgl 21 Sep 2023 / Perbaikan tgl 19 Okt 2023 / Disetujui tgl 30 Okt 2023

Abstract

Cocoa (*Theobroma cacao*) production in Indonesia is increasing from year to year. The high production of cocoa has an impact on increasing cocoa *pod* and *pulp* waste. Cocoa *pod* contains lignocellulose, while cocoa *pulp* contains many sugars. The composition of cocoa *pod* and *pulp* allows the cellulolytic microbe to grow. This study aims to perform microbial selection from fermented cocoa and sugar cane can grow in the cocoa *pod* and *pulp*-based media. The selection method using the CMC 1%, *pod* 1%, *pulp* 1%, and *pod* 0.5%+*pulp* 0.5% media. Then, the analysis of reducing sugar was conducted using DNS method, while the total sugar analysis using phenol-H₂SO₄ method. Sugars from hydrolysis were analyzed quantitatively using TLC. The results of microbial selection on CMC 1%, *pod* %, *pulp* 1%, and *pod* 0.5%+*pulp* 0.5% media obtained *Paenibacillus polymyxa* TBT 3.2 that have the largest cellulolytic index on the *pod* 1% media. Isolates TBT 3.2 grown on *pod* 1% medium produce reducing sugar is 4.965 mg/mL at 30 hours sampling with highest total sugar at 6 hours sampling is 9.789 mg/mL. The types of sugars identified using the TLC are mannose, galactose, glucose, and cellobiose.

[Keywords: DNS, galactose, cellobiose, cellulose]

Abstrak

Produksi kakao (*Theobroma cacao*) di Indonesia semakin meningkat dari tahun ke tahun. Produksi kakao yang tinggi berdampak pada meningkatnya limbah *pod* dan *pulp* kakao. *Pod* kakao mengandung lignoselulosa, sedangkan *pulp* kakao banyak mengandung gula. Komposisi dari *pod* dan *pulp* kakao ini memungkinkan mikroba selulolitik dapat tumbuh. Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi mikroba asal fermentasi kakao dan tebu yang dapat tumbuh pada media berbasis *pod* dan *pulp* kakao. Metode seleksi dilakukan menggunakan media CMC 1%, *pod* 1%, *pulp* 1%, dan *pod* 0,5%+*pulp* 0,5%. Kemudian, analisis gula reduksi dilakukan menggunakan metode DNS, sedangkan analisis total gula menggunakan metode fenol-H₂SO₄. Gula hasil hidrolisis dianalisis secara kuantitatif menggunakan KLT. Hasil seleksi mikroba pada media CMC 1%, *pod* 1%, *pulp* 1%, dan *pod* 0,5%+*pulp* 0,5% diperoleh isolat *Paenibacillus polymyxa* TBT 3.2 yang memiliki indeks selulolitik terbesar pada media *pod* 1%. Isolat TBT 3.2 yang ditumbuhkan pada media *pod* 1% menghasilkan gula reduksi sebesar 4,965 mg/mL pada jam ke-30 dengan total gula tertinggi pada jam ke-6, yaitu 9,789 mg/mL. Jenis gula yang teridentifikasi menggunakan KLT berupa manosa, galaktosa, glukosa, dan selobiosa.

[Kata kunci: DNS, galaktosa, selobiosa, selulosa]

*) Penulis korespondensi: ameryandini@apps.ipb.ac.id

0125-9318/ 1858-3768 ©2023 Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)

Menara Perkebunan is DOAJ indexed Journal and accredited as Sinta 2 Journal (<https://sinta.kemdikbud.go.id/journals/profile/3125>)

How to Cite: Shofiana, N., Sunarti, T.C., & Meryandini, A. (2023). Viabilitas mikroba selulolitik pada media berbasis *pod* dan *pulp* kakao (*Theobroma cacao* L.). *Menara Perkebunan*, 91(2), 161-168. <http://dx.doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v91i2.552>

Pendahuluan

Produksi buah kakao di Indonesia menurut Badan Pusat Statistik pada tahun 2022 mencapai 667.300 ton (Data Indonesia 2023). Tingginya produksi buah kakao mengakibatkan meningkatnya limbah dari buah kakao tersebut karena pemanfaatan buah kakao terbatas pada biji. Limbah dari buah kakao dapat berupa *pod* dan *pulp* kakao. *Pod* kakao merupakan bagian mesokarp buah kakao yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum biji. Menurut Kilama et al. (2019), *pod* kakao berkisar 74% dari berat total buah kakao yang akan dibuang selama proses pengolahan kakao dan dapat menyebabkan masalah lingkungan. Sel endokarp yang melekat pada lapisan luar epidermis kulit biji membentuk *pulp* buah. *Pulp* mengandung 82–87% air dan 8–14 % gula yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba pelaku fermentasi (Kadow et al., 2013). Salah satu metode alternatif dalam mengurangi limbah *pod* dan *pulp* kakao, yaitu menggunakan mikroba selulolitik (Putri et al., 2023; Putri et al., 2019; Kurniawati et al., 2016).

Selulosa merupakan komponen utama dinding sel tumbuhan. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia atau mekanis dan erat berasosiasi dengan lignin dan hemiselulosa. Selulosa merupakan polisakarida dengan ikatan β -1,4 glukosidik yang dihubungkan melalui ikatan hidrogen dan gaya van der Waals (Li et al., 2020). Degradasi selulosa dapat dilakukan oleh enzim selulase yang tersusun atas endoglukanase, eksoselobiohidrolase, dan β -glukosidase. Selo-oligosakarida yang dihasilkan dari proses degradasi selulosa dapat dimanfaatkan sebagai senyawa prebiotik, sedangkan selobiosa dan glukosa digunakan oleh mikroba sebagai sumber karbon dalam pembentukan energi dan bioetanol.

Penelitian mengenai pemanfaatan *pod* dan *pulp* kakao di Indonesia hingga kini masih belum banyak dilakukan, padahal kandungan selulosa dalam *pod* kakao sebanyak 74% (Daud et al., 2013). Menurut Nisa & Putri (2014), selulosa dari *pod* kakao dapat digunakan sebagai bahan pembuatan CMC. Fauzi et al. (2012) menunjukkan bahwa *pod* kakao dapat dimanfaatkan untuk pembuatan bioetanol *fuel grade*. Selain *pod* kakao, limbah *pulp* kakao dapat digunakan untuk pembuatan bioetanol menggunakan bantuan khamir (Kristiani et al., 2013). Pemanfaatan limbah *pulp* kakao juga dapat digunakan sebagai herbisida untuk beberapa gulma berdaun lebar (Pujiswanto, 2011). Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemanfaatan limbah *pod* dan *pulp* kakao memiliki potensi besar dalam menunjang kehidupan manusia. Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi mikroba asal fermentasi kakao dan tebu yang dapat tumbuh pada media berbasis *pod* dan *pulp* kakao.

Bahan dan Metode

Persiapan substrat *pod* dan *pulp* kakao

Buah kakao diperoleh dari kebun rakyat di Leuwikopo Bogor. Preparasi media dilakukan dengan membelah buah kakao yang sudah masak. Kemudian, kulit (*pod*) dan *pulp* kakao dipisahkan dari bijinya. *Pod* dan *pulp* kakao dipotong lembaran ukuran 1x1 cm², lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 3 hari. Potongan *pod* dan *pulp* yang sudah kering dihaluskan dan diayak menggunakan saringan 80 mesh. Bubuk *pod* dan *pulp* lolos digunakan sebagai media seleksi mikroba yang akan digunakan.

Seleksi mikroba

Sebanyak 23 isolat mikroba yang diperoleh dari fermentasi kakao dan tebu yang merupakan koleksi laboratorium Bioprospeksi Mikrob Pusat Penelitian Bioteknologi IPB, diremajakan pada media *yeast-peptone-glucose* (YPG) padat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat-isolat tersebut diseleksi pada media CMC 1% (1g CMC; 0,02g MgSO₄.7H₂O; 0,075g KNO₃; 0,05g K₂HPO₄; 0,002g FeSO₄.7H₂O; 0,004g CaCl₂.2H₂O; 0,2g ekstrak khamir, 2,3 g agar-agar bakto, dan 0,1g glukosa), dan dilanjutkan pada media *pod* 1%, *pulp* 1%, *pod* 0,5%+*pulp* 0,5% yaitu dengan menggantikan CMC dengan *pod* atau *pulp*.

Seleksi pada media CMC: Sebanyak 1 ose isolat mikroba berusia 24 jam diinokulasikan pada media CMC 1% padat, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Diameter koloni mikroba diukur. Cawan berisi isolat kemudian digenangi dengan reagen merah kongo selama 15 menit, lalu dibilas menggunakan NaCl 0,2 M sebanyak 3 kali dan ditunggu hingga kering. Diameter zona bening kemudian diukur. Nilai indeks potensial dihitung mengikuti Downie et al. (1994) dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$$

Isolat dengan nilai indeks potensial yang tertinggi akan dipilih untuk karakterisasi selanjutnya.

Seleksi pada substrat *pod* dan *pulp* kakao: Sebanyak 4 isolat mikroba terpilih berdasarkan indeks selulolitik yang tinggi diambil 1 ose, lalu diinokulasikan pada 3 macam media berbeda, yaitu media YPG (1 g ekstrak khamir, 2 g pepton, 2 g glukosa, 2,3 g bubuk agar-agar bioteknologi dan 100 mL akuades) dengan penambahan *pod* 1%, *pulp* 1%, dan *pod* 0,5%+*pulp* 0,5%. Isolat diinkubasi pada suhu ruang (30 °C) selama 24 jam. Kemudian koloni yang terbentuk diukur diameternya, dan cawan di-

rendam dengan reagen merah konngo selama 15 menit. Isolat dibilas menggunakan NaCl 0,2 M sebanyak 3 kali, lalu dikeringkan. Diameter zona bening diukur dan didokumentasikan dalam bentuk foto. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Indeks potensial dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$$

Isolat dengan nilai indeks potensial yang tertinggi yang berarti memiliki kemampuan untuk menggunakan pod atau *pulp* kakao untuk tumbuh akan dipilih untuk karakterisasi selanjutnya.

Hidrolisis pod kakao oleh isolat terpilih

Isolat mikroba terpilih ditumbuhkan pada media *pod* 1% dengan suplementasi glukosa 0,1%. Setiap 3 jam sekali selama 30 jam dilakukan pengambilan inokulum untuk diukur total gula, gula pereduksi, dan jumlah koloni. Total gula diukur menggunakan metode fenol-H₂SO₄ (Dubois et al., 1989), sedangkan gula pereduksi menggunakan metode DNS (Miller, 1959). Koloni mikroba dihitung menggunakan metode *total plate count* (TPC).

Perhitungan koloni mikroba menggunakan metode TPC. Sebanyak 1 mL sampel diencerkan dengan 9 mL NaCl fisiologis hingga pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵. Pada pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵ diambil sebanyak 100 µL untuk ditumbuhkan pada media YPG padat dengan cara disebar menggunakan batang penyebar, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kemudian, jumlah koloni diantara 25 hingga 250 dihitung dalam satuan log CFU/mL.

Karakterisasi produk hidrolisat dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolat mikroba yang ditumbuhkan pada media *pod* kakao diambil pada jam ke-30 dengan konsentrasi substrat *pod* 1%, 3%, dan 5%. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Larutan standar yang digunakan, yaitu manosa, galaktosa, xilosa, glukosa, dan selobiosa dengan masing-masing konsentrasi 1000 ppm.

Plat KLT ditandai menggunakan pensil 2B pada batas awal penotolan (1 cm dari tepi bawah plat) dan batas akhir elusi (1 cm dari tepi atas plat). Plat *TLC Silica gel 60 F254I (Merck)* dimasukkan ke dalam

oven 80 °C selama ± 5 menit. Kemudian, sebanyak 25 totol standar dan 20 totol sampel ditotolkan pada batas awal dengan jarak masing-masing 1 cm, lalu ditunggu hingga kering. Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber glass* yang telah berisi eluen (n-butanol : asam asetat : akuades dengan perbandingan 2:1:1) hingga pergerakan eluen mencapai batas akhir elusi. Plat KLT dikeringkan menggunakan *hair dryer*, kemudian disemprot dengan pewarna DAP. Plat KLT dikeringkan kembali menggunakan *hair dryer*. Plat yang sudah kering dimasukkan ke dalam oven 100 °C selama 15 menit untuk memunculkan noda (Reiffova & Nemcova, 2006). Hasil KLT didokumentasikan dalam bentuk foto dan dihitung nilai Rf-nya menggunakan rumus berikut :

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Hasil dan Pembahasan

Pod dan *pulp* kakao

Preparasi media *pod* dan *pulp* kakao dimulai dengan mencari buah kakao yang telah masak. Buah kakao masak memiliki ciri-ciri antara lain : kulit buah berubah warna dari hijau menjadi kuning atau dari merah menjadi jingga tua, tangkai buah kering, dan jika buah diguncang akan menghasilkan bunyi. Buah yang telah masak dipisahkan antara *pod* dan *pulp* dari bijinya. *Pod* kakao yang sudah kering mengandung hemiselulosa 23.36%, selulosa 24.51%, dan lignin 30.46% (Rambat et al., 2015). Serbuk *pod* dan *pulp* kakao disaring menggunakan saringan 80 mesh untuk memperoleh selulosa dan meningkatkan luas permukaan substrat.

Serbuk *pod* dan *pulp* kakao tidak larut dalam media YPG. Serbuk *pod* kakao berwarna coklat muda, sedangkan serbuk *pulp* kakao berwarna coklat kekuningan (Gambar 1). Pada media padat, serbuk *pod* kakao berwarna lebih gelap daripada serbuk *pulp* kakao, sedangkan *pod* dan *pulp* kakao akan mengendap pada media cair. Mikroba dapat tumbuh dengan mudah pada media padat dari *pod* dan *pulp* kakao. Pada kultur *pod* dan *pulp* kakao cair, pertumbuhan mikroba teramati pada bagian atas endapannya. Endapan yang telah terdegradasi oleh mikroba akan berwarna coklat terang, sedangkan substrat *pod* dan *pulp* tetap berwarna coklat gelap.



Gambar 1. Serbuk kakao ukuran 80 mesh asal *pod* (a) dan *pulp* (b); isolat TBT 3.2 pada media *pod* kakao (c)

Figure 1. The 80 mesh dry cocoa powder from the pods (a) and pulp (b); TBT3.2 isolate on the pods media (c)

Seleksi mikroba selulolitik pada media CMC

Sebanyak 23 isolat mikroba yang diisolasi dari fermentasi kakao dan tebu ditumbuhkan pada media CMC 1%+YPG. Seleksi ini dilakukan untuk memperoleh isolat unggul yang dapat mendegradasi selulosa. Hasil seleksi menunjukkan bahwa isolat 2P8, 3B2, 4B1, dan TBT 3.2 (Tabel 1, Gambar 2) memiliki indeks selulolitik terbesar.

Zona bening dapat teramati setelah dilakukan pewarnaan dengan merah kongo dan dibilas menggunakan NaCl 0,2 M. Merah kongo berikatan dengan polisakarida yang terdapat dalam substrat membentuk warna merah. Zona bening yang terbentuk pada media disebabkan oleh terdegradasinya selulosa menjadi selo-oligosakarida atau selobiosa sehingga terbentuk zona berwarna bening atau merah pudar. Semakin besar diameter zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa semakin banyak enzim yang mendegradasi substrat (Downie et al., 1994). Isolat 2P8, 3B2, 4B1, dan TBT 3.2 memiliki indeks selulolitik terbesar yang menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim pendegradasi selulosa lebih tinggi dibandingkan dengan isolat mikroba lainnya.

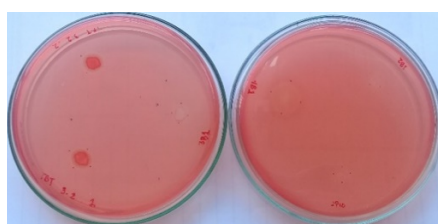
Seleksi isolat terpilih pada substrat pod dan pulp kakao

Isolat mikroba yang memiliki indeks selulolitik terbesar dilakukan seleksi kembali pada media *pod* dan pulp. Konsentrasi media yang digunakan, yaitu *pod* 1%, *pulp* 1%, dan *pod* 0,5%+*pulp* 0,5%. Konsentrasi ini disesuaikan dengan substrat CMC 1% yang berfungsi sebagai kontrol. Hasil seleksi menunjukkan isolat TBT 3.2 menghasilkan zona bening terbesar pada ketiga media berbeda (Tabel 2, Gambar 3).

Isolat 2P8, 3B2, dan 4B1 memiliki kemampuan mendegradasi selulosa pada *pod* kakao lebih rendah dibandingkan dengan isolat TBT 3.2. Hal tersebut dapat disebabkan oleh konsentrasi lignin yang tinggi pada substrat *pod*. Lignin adalah senyawa kompleks dari unit-unit aromatik *syringil* (S), *guaiacyl* (G), dan *p-hydroxyphenyl* (H) yang tergabung melalui keterkaitan antarunit, dimana keterkaitan β-O-4' yang paling melimpah (45-94% dari total keterkaitan antarunit) (Aminah et al., 2019; Munk et al., 2015; Vanholme et al., 2010). Selain itu, komposisi *pulp* yang banyak mengandung gula digunakan mikroba untuk pertumbuhannya sehingga tidak dihasilkan enzim ekstraseluler untuk mendegradasi selulosa.

Tabel 1. Indeks selulolitik dari berbagai isolat mikroba pada media CMC 1%
 Table 1. Cellulolytic index of various microbial isolates on 1% CMC media

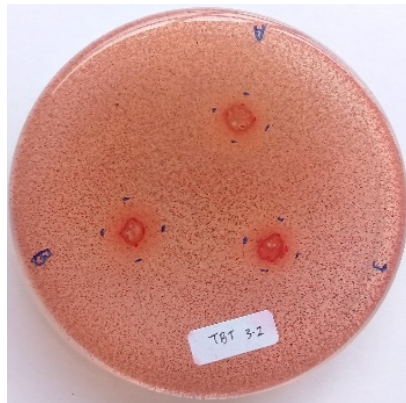
Kode Isolat <i>Isolate code</i>	Indeks selulolitik <i>Cellulolytic index</i>	Kode Isolat <i>Isolate code</i>	Indeks selulolitik <i>Cellulolytic index</i>
0P1	0,179	2P7	0,154
0P2	0,179	2P8	0,364
1P3	0,120	2P9	0,154
1P4	0,000	2P10	0,000
1B2	0,000	2B1	0,286
1B3	0,000	2B3	0,167
2P1	0,042	3B1	0,100
2P2	0,296	3B2	0,462
2P3	0,214	4B1	0,386
2P4	0,000	4B2	0,111
2P5	0,000	TBT 3.2	0,712
2P6	0,185		



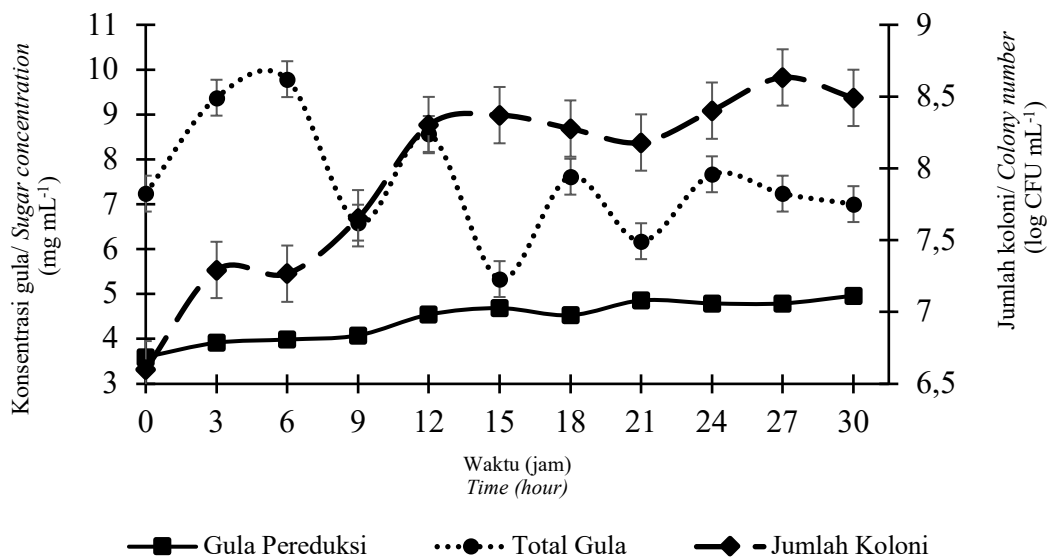
Gambar 2. Pertumbuhan beberapa isolat pada media CMC 1%
 Figure 2. Growth of several isolates on 1% CMC media

Tabel 2. Indeks selulolitik pada media *pod* dan *pulp* kakao
 Table 2. Cellulolytic index on *pod* media and cocoa *pulp*

Kode Isolat <i>Isolate code</i>	Jenis Substrat <i>Type of substrate</i>		
	<i>Pod</i> 1%	<i>Pulp</i> 1%	<i>Pod</i> 0,5%+ <i>Pulp</i> 0,5%
2P8	0,000 ± 0,00	0,112 ± 0,05	0,103 ± 0,18
3B2	0,000 ± 0,00	0,044 ± 0,04	0,208 ± 0,09
4B1	0,092 ± 0,16	0,000 ± 0,00	0,191 ± 0,04
TBT 3.2	1,574 ± 0,39	1,251 ± 0,18	1,061 ± 0,14



Gambar 3. Pertumbuhan isolat TBT 3.2 pada media yang mengandung pod kakao 1%
 Figure 3. Growth of TBT 3.2 isolate on media containing 1% cocoa pods



Gambar 4. Grafik hubungan antara kurva pertumbuhan dan produksi gula *Paenibacillus polymyxa* TBT 3.2 pada media *pod* 1% pH 7 yang diinkubasi pada suhu ruang

Figure 4. Graph of the relationship between the growth curve and sugar production of *Paenibacillus polymyxa* TBT 3.2 on 1% pH 7 *pod* media incubated at room temperature

Kenaikan jumlah koloni menunjukkan bahwa *Paenibacillus polymyxa* TBT 3.2 mengalami pertumbuhan dengan menggunakan *pod* kakao sebagai sumber karbonnya. Jumlah gula pereduksi diawal inkubasi berasal dari suplementasi glukosa 0,1% pada media kultur sehingga sel dapat tumbuh. Kemudian, sel mikroba akan mendegradasi selulosa yang terdapat pada *pod* kakao menjadi gula-gula sederhana, seperti selobiosa dan glukosa. Glukosa hasil merupakan sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri.

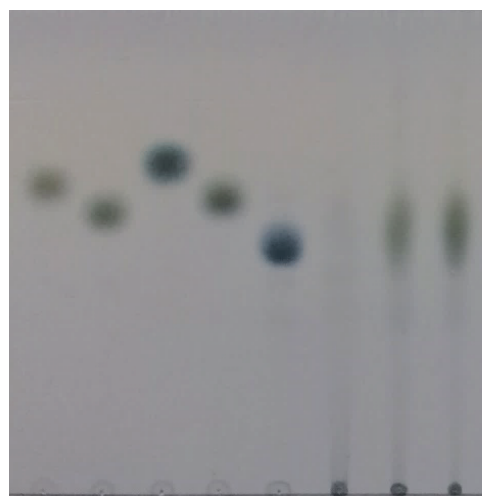
Gula pereduksi merupakan gula yang memiliki gugus aldehyd atau keton bebas sehingga dapat mereduksi suatu senyawa, seperti glukosa, fruktosa, manosa, maltosa, dan laktosa (Astuti & Rustanti, 2014). Total gula merupakan jumlah gula pereduksi dan non pereduksi yang terdapat pada media. Pengukuran total gula menggunakan metode fenol-H₂SO₄. Metode fenol-H₂SO₄ adalah metode analisis karbohidrat yang paling mudah dan akurat. Metode ini digunakan untuk mengukur gula dalam bentuk oligosakarida, proteoglikan, glikoprotein, dan glikolipid. Total gula mengalami fluktuasi pada setiap jam, kondisi ini diduga akibat adanya degradasi selulolitik dari pod oleh bakteri. Kenaikan total gula terjadi pada jam ke-3, 6, 12, 18, dan 24 dengan puncaknya pada jam ke-6 sebesar 9,789 mg/mL, sedangkan konsentrasi total gula terkecil pada jam ke-15, yaitu sebesar 5,335 mg/mL. Calvo et al. (2021) menemukan kadar total gula yang menurun antara 55 – 64% selama proses fermentasi 8 hari, sedangkan Indrayati et al. 2021 mengamati penurunan konsentrasi total gula selama 12 hari fermentasi. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan singkatnya waktu pengamatan sehingga proses yang terjadi adalah aktifnya mikroba mendegradasi selulosa sehingga banyak terbentuk gula-gula sederhana. Hal tersebut ditunjang dengan data jumlah koloni yang juga meningkat, yaitu 6,602 log CFU/mL pada awal inkubasi dan terus meningkat menjadi 8,491 log CFU/mL pada jam ke-30.

Penurunan total gula yang terjadi pada jam ke-9, 15, dan 21 disebabkan oleh gula-gula sederhana hasil degradasi selulosa digunakan oleh mikroba untuk tumbuh. Pada jam ke-24 total gula terus mengalami penurunan hingga jam ke-30 yang menunjukkan bahwa jumlah selulosa dan gula-gula lainnya semakin berkurang karena telah terdegradasi sebelumnya.

Karakteristik produk hidrolisat dengan KLT

Uji kromatografi lapis tipis bertujuan melihat jenis sakarida yang dihasilkan dari degradasi selulosa. Hasil percobaan ditunjukkan pada gambar 5. Nilai Rf dari standar gulanya, yaitu manosa (0,625), galaktosa (0,562), xilosa (0,662), glukosa (0,6), dan selobiosa (0,5). Hasil elusi menunjukkan bahwa pada konsentrasi *pod* kakao 1% gulanya tidak dapat teridentifikasi, sedangkan pada konsentrasi 3% dan 5% teramati jenis gula yang sama dengan nilai Rf antara 0,4 – 0,625. Nilai Rf tersebut berarti gula yang dihasilkan dapat berupa manosa, galaktosa, glukosa, dan selobiosa.

Gula-gula sederhana yang dihasilkan dari degradasi *pod* kakao ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber bioetanol. Rahman et al. (2023) menggunakan *microwave* untuk menyiapkan pod kakao sebagai media untuk produksi bioethanol. Pemanfaatan *microwave* pada suhu 180 °C memberikan komposisi glukosa dan xilosa tertinggi. Isolat khamir dapat ditambahkan pada hasil hidrolisat *pod* kakao oleh isolat TBT 3.2 untuk difermentasi lebih lanjut.



man gal xyl glu selo 1 3 5

Gambar 5. Kromatografi lapis tipis *pod* kakao pada jam ke-30 dengan berbagai konsentrasi. Keterangan: man = manosa, gal = galaktosa, xyl = xilosa, glu = glukosa, selo = selobiosa, 1 = *pod* 1%, 3 = *pod* 3%, 5 = *pod* 5%

Figure 5. Thin layer chromatography of cocoa pods at 30 hours with various concentrations. Note: man = manose, gal = galactose, xyl = xylose, glu = glucose, selo = celelobioea, 1 = *pod* 1%, 3 = *pod* 3%, 5 = *pod* 5%

Kesimpulan

Paenibacillus polymyxa TBT 3.2 merupakan isolat mikroba terbaik yang memiliki indeks selulolitik terbesar baik pada media CMC 1%, *pod* 1%, maupun *pulp* 1% dengan indeks selulolitik tertinggi pada substrat *pod* kakao. Gula pereduksi hasil degradasi *pod* kakao terus meningkat setiap jam dengan puncaknya pada jam ke-30. Namun, total gula mengalami fluktuasi dengan konsentrasi tertinggi pada jam ke-6 dan konsentrasi terendah pada jam ke-15. Identifikasi gula dengan KLT diperoleh hasil degradasi *pod* kakao berupa gula manosa, galaktosa, glukosa, dan selobiosa. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan menggunakan *co-culture* untuk memanfaatkan gula pereduksi yang dihasilkan seperti untuk pembuatan bioethanol.

Daftar Pustaka

- Akram, S. R., Sunarti, T. C., & Meryandini, A. (2019). Characteristic of dextran producing bacteria isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 24(2), 160 – 167. <https://doi.org/10.18343/jipi.24.2.160>
- Aminah, N. S., Isma, C., & Kristanti, A. N. (2019). Skopoletin suatu senyawa fenilpropanoid dari ekstrak etil asetat umbi jalar (*Ipomoea batatas* L.). *Jurnal Kimia Riset*, 3(2), 116-121 <https://doi.org/10.20473/jkr.v3i2.12061>
- Astuti, I. M., Rustanti N. (2014). Kadar protein, gula total, total padatan, viskositas dan nilai pH es krim yang disubstitusi inulin umbi gambili (*Dioscorea esculenta*). *Journal of Nutrition College*, 3(3), 331-336. <https://doi.org/10.14710/jnnc/v3i3.6584>
- Black, J. G., Black, L.J. (2015). *Microbiology Principles and Explorations* (No.Ed. 9). John Wiley & Sons Inc.
- Calvo, A. M., Botina, B. L., García, M.C., Cardon, W. A., Montenegro, A. C. & Criollo, J. (2021). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Scientific Reports*, 11,16746 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- Zawawi, D., Kassim, A. S. M., Aripin, A. M., Awang, H. & Hatta, M. Z. M. (2013). Chemical composition and morphological of cocoa pod. *Australian Journal of Basic & Applied Science*, 7(9), 406-411.
- Downie, B., Hilhorst, H. W. M. & Bewley, J. D. (1994). A New assay for quantifying endo-β-D-mannanase activity using congo red dye. *Pytochemistry*, 36, 829-835.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fauzi, A. R., Haryadi, D., & Priyanto, S. (2012). Pengaruh waktu fermentasi dan efektivitas adsorben dalam pembuatan bioetanol *fuel grade* dari limbah *pod* kakao (*Theobroma cacao*). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1(1), 179-185.
- Indrayati, S., Rahmadani, S. Y., Periadnadi., & Nurmiati. (2021) Potensi mikrobiota indigenous pulp tiga varietas kakao (*Theobroma Cacao* L.) sebagai starter dalam fermentasi biji kakao. *Jurnal Biopropal Industri*, 12(1), 19-32. <https://doi.org/10.36974/jbi.v12i1.6459>
- Kilama, G., Lating, P. O., Byaruhanga, J., & Biira, S. (2019). Quantification and characterization of cocoa pod husks for electricity generation in Uganda. *Energy, Sustainability and Society*, 9, 22. <https://doi.org/10.1186/s13705-019-0205-4>
- Kadow, D., Bohlmann J, Phillips, W., & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine flavour components in two genotypes of the chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany Food Quality*, 86, 90-98. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.013>
- Kurniawati, N., Meryandini, A. & Sunarti, T.C. (2016). Introduction of actinomycetes starter on coffee fruits fermentation to enhance quality of coffee pulp. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(3), 188-195. https://doi.org/10.1007/978-95-330-7200-0_192
- Lopak, S. S., Meryandini, A. & Sunarti, T. C. (2020). Dietary fibre production from cassava pulp fibre using *Actinomycetes* cellulase. *International Food Research Journal*, 27(4), 702-711.
- Meryandini, A., Basri, A., & Sunarti, T. C. (2019). Peningkatan kualitas biji kakao (*Theobroma cacao*) melalui fermentasi menggunakan *Lactobacillus* sp. dan *Pichia kudriavzevii*. *Jurnal Biologi dan Bioteknologi Indonesia*, 6(1), 11-19. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i1.3048>

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?. *Biotechnology Advances* 33(1),13–24. <http://doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
- Nisa, D., Putri, W. D. R. (2014). Pemanfaatan selulosa dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai bahan baku pembuatan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(3), 34-42.
- Pujiswanto, H. (2011). Pengaruh fermentasi limbah cair pulp kakao terhadap tingkat keracunan dan pertumbuhan beberapa gulma berdaun lebar. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 12(1), 13-19.
- Putri, E., Rukayadi, Y., Sunarti, T.C. & Meryandini, A. (2019). Cellulolytic and xylanolytic *Actinomyces* selection to degrade lignocellulosic biomass of robusta coffee pulp (*Coffea canephora*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 299, 2-11. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/299/1/012014>
- Putri, E., Rukayadi, Y., Sunarti, T.C. & Meryandini, A. (2023). Increase in polyphenolic substances from fermented robusta coffee pulp (*Coffea canephora* L.) by using indigenous *Actinomyces*. *Hayati Journal of Biosciences*, 30(3), 457-465. <https://doi.org/10.4308/hjb.30.3.457-465>
- Rahman, S. A., Meryandini, A., Juansilfero, A. B & Fahrurrozi. (2023). Cocoa Pod Husk (CPH) for biomass on bioethanol production. *International Journal on Advance Science Engineering Information Technology*, 13(3), 828-836.
- Rambat, Aprilita, N. H., & Rusdiarso, B. (2015). Aplikasi limbah kulit buah kakao sebagai media fermentasi asam laktat untuk bahan baku bioplastik. *Jurnal Kimia Kemasan*, 37(2), 103-110.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905. <https://doi:10.1104/pp.110.155.119>