**PENGARUH LAMA FERMENTASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM DAN LIGNIN PADA PROSES FERMENTASI KULIT BUAH KAKAO MENGGUNAKAN KAPANG**

***Phanerochaete chrysosporium***

**Engkus Ainul Yakin, Ali Mursyid Wahyu Mulyono**

Fakultas Pertanian, Universitas Veteran Bangun Nusantara, Jl. Letjen Sujono Humardani

No. 1, Sukoharjo 57521. Telp. +62-0271-593156, fax. +62-0271-591065

Email : engkus\_ainul@yahoo.com

**ABSTRAK**

Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim lignilolitik dan lignin pada proses fermentasi kulit buah kakao. Substrat yang digunakan yaitu kulit buah kakao sedangkan penggunaan kapang yaitu *Phanerochaete chrysosporium.* Preparasi KBK yaitu KBK segar dicacah, digiling halus kemudian dikeringkan. Preparasi kapang dengan menumbuhkan kapang dalam medium cair. Metode penelitian yang dilakukan yaitu lama fermentasi yang dilakukan adalah melakukan fermentasi KBK dengan lama hari yang berbeda yaitu 5, 7, 9, 11 dan 13 hari pada suhu 370  C dan pH 7 menggunakan lima perlakuan dan lima ulangan. P0 = fermentasi KBK selama 5 hari, P1 = fermentasi KBK selama 7 hari, P2 = fermentasi KBK selama 9 hari, P3 = fermentasi KBK selama 11 hari, P4 = fermentasi KBK selama 13 hari. Fermentasi dengan menggunakan erlenmeyer 500 ml dan ditutup dengan kapas. Variabel yang diamati meliputi aktivitas enzim LiP dan MnP, NDF, ADF, lignin. Analisis data yang diperoleh akibat perlakuan diuji dengan Analisis Variansi (ANOVA) dengan rancangan penelitian pola searah, bila terdapat perbedaan variabel karena perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan’s multiple range test (DMRT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan fermentasi selama 7 hari aktivitas enzim tertinggi LiP sebesar 0,527 ± 0,04 unit/ml dan MnP sebesar 0,063 ± 0,00 unit/ml, kandungan lignin terendah 26,30± 0,35%. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu fermentasi dengan menggunakan kapang *Phanerochete chrysosporium* baik pada fermentasi selama 7 hari.

Kata kunci : hari, fermentasi, kulit buah kakao, *Phanerochete chrysosporium*

ABSTRACT

The study was conducted to determine the enzyme activity ligninolitik and lignin content in the fermentation process of cacao pod. The substrate used was the cocoa pod while the fungi use *Phanerochaete chrysosporium.* Preparation of cocoa pod was chopped, finely ground and then dried. Preparation of fungi by growing fungi in liquid medium. Research methodology was the optimization of fermentation is fermentation conducted with cocoa pod different days are 5, 7, 9, 11 and 13 days at a temperature of 370 C and pH 7 using five treatments and five replications. T0 = 5 days fermentation of cocoa pod, T1 = 7 days fermentation of cocoa pod, T2 = 9 days fermentation of cocoa pod, T3 = 11 days fermentation of cocoa pod, T4 = 13 days fermentation of cocoa pod. Fermentation used a erlenmeyer with cotton at the top. Variables observed enzyme activity LiP and MnP, NDF, ADF, lignin. This study was designed using research design completely randomized design with a unidirectional pattern analysis of variance (ANOVA oneway). Significant variables followed Duncan's multiple range test (Duncan Multiple Range Test / DMRT). The results showed fermentation for 7 days LiP highest enzyme activity of 0.527 ± 0.04 units / ml and MnP amounted to 0.063 ± 0.00 units / ml, low lignin content of 26.30 ± 0.35%. The conclusion from this research that the fermentation by using fungi Phanerochete chrysosporium well in fermentation for 7 days.

Keywords: day, fermentation, cocoa fruit skin, Phanerochete chrysosporium

**PENDAHULUAN**

Limbah tanaman pangan dan perkebunan memiliki peran yang cukup penting dan berpotensi dalam penyediaan pakan hijauan bagi ternak ruminansia seperti sapi, kambing, domba dan kerbau terutama pada musim kemarau. Pada musim kemarau hijauan rumput terganggu pertumbuhannya, sehingga pakan hijauan yang tersedia kurang baik dari segi kuantitas maupun kualitas. Bahkan di daerah-daerah tertentu rumput pakan ternak akan kering dan mati sehingga menimbulkan krisis pakan hijauan. Selain itu, sistem pemeliharaan ternak ruminansia sebagian besar masih tergantung pada hijauan pakan berupa rumput-rumputan dan pakan hijauan lainnya dengan sedikit atau tidak ada pakan tambahan.

Kulit buah kakao (KBK) memiliki peran yang cukup penting dan berpotensi dalam penyediaan pakan ternak ruminansia khususnya kambing terutama pada musim kemarau. Pemanfaatan kulit buah kakao sebagai pakan ternak dapat diberikan dalam bentuk segar maupun dalam bentuk tepung setelah diolah. Dilihat dari komposisinya, kulit buah kakao mengandung 7,75% protein dan energi sebesar 3900 kkal/kg yang melebihi komposisi rumput gajah yaitu 6,9% dan energi sebesar 3800 kkal/kg (Puastuti *et al., 2009*).

Kulit buah kakao adalah merupakan limbah agroindustri yang dihasilkan tanaman kakao *(Theobroma cacao L.)* Buah kakao yang terdiri dari 74 % kulit buah, 2 % plasenta dan 24 % biji. Hasil analisa proksimat mengandung 22 % protein dan 3-9 % lemak Nasrullah dan A. Ella, 1993).

*Phanerochaete chrysosporium* merupakan salah satu mikroorganisme yang mempunyai kemampuan mendegradasi lignoselulosa secara selektif (Tuomelo *et al*., 2000) yaitu mendegradasi komponen lignin terlebih dahulu diikuti dengan komponen selulosa. Selulosa dan hemiselulosa dimanfaatkan oleh kapang sebagai sumber karbon. Kapang ini juga mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada suhu yang relatif tinggi yaitu 36-40oC sehingga cocok digunakan dalam proses fermentasi yang banyak menghasilkan panas (Tuomelo *et al*., 2002). Efisiensi degradasi lignin yang tinggi dan minimal dalam memanfaatkan polimer selulosa dibanding fungi pelapuk putih lain menjadikan *P. chrysosporium* sebagai pilihan terbaik dalam perlakuan degradasi lignin.

Kapang pendegradasi lignin yang paling aktif adalah *white-rot* *fungi* seperti misalnya *Phanerochaete chrysosporium* dan *Coriolus versicolor* yangmampu merombak hemisellulosa, sellulosa dan lignin dari limbah tanaman menjadi CO2 dan H2O (Paul, 1992; Limura, 1996). Pada umumnya basidiomisetes *white-rot* mensintesis 3 macam enzim, yaitu Lignin-peroksidase (LiP), Manganese-peroksidase (MnP) dan Laccase. Ketiga enzim tersebut sangat berperan dalam proses degradasi lignin ( Srinivasan *et al.,* 1995).

**METODE PENELITIAN**

**Proses fermentasi**

Proses fermentasi skala laboratorium dilakukan pada ruang steril Kulit buah kakao difermentasi dalam erlemeyer 500 ml. Fermentasi KBK dilakukan secara aerobik dengan cara memasukkan cacahan KBK sebanyak 100 g pada wadah fermentasi berupa Erlenmeyer 250 ml yang kemudian ditutup dengan kapas selanjutnya diautoklaf pada suhu 121o C selama 15 menit. Kulit buah kakao steril selanjutnya diinokulasi dengan kapang sebanyak 1 % dari berat substrat berdasar bahan kering selanjutnya dimasukkan dalam *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm dan suhu 30oC. Setelah proses fermentasi selesai, KBK dikeluarkan dan dikeringkan-anginkan selama 6 jam. Penimbangan KBK setelah fermentasi dilakukan pada semua perlakuan. Pengeringan sampel menggunakan oven pada suhu 550 C selama 5 hari. KBK yang sudah kering digiling menggunakan *Thomas-Wiley*  (tipe 4) dengan diameter saringan 1 mm.

### Rancangan percobaan.

Fermentasi KBK dengan menggunakan kapang *Phanerochaete chrysosporium* dilakukan dengan lama hari yang berbeda yaitu 5, 7, 9, 11, dan 13 hari. Suhu dan pH yang digunakan sama pada semua perlakuan yaitu pada suhu 370  C dan pH 7.

Percobaan ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap pola searah dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan sehingga terbentuk 25 unit percobaan. Kelompok perlakuan yaitu : P0 = fermentasi KBK selama 5 hari, P1 = fermentasi KBK selama 7 hari, P2 = fermentasi KBK selama 9 hari, P3 = fermentasi KBK selama 11 hari, P4 = fermentasi KBK selama 13 hari.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

1. **Lignin Peroksidase**

Tabel 1. Rerata aktivitas enzim Lignin Peroksidase

fermentasi kulit buah kakao (U/ml)

|  |  |
| --- | --- |
| Ulangan  | Perlakuan |
| P0 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 1 | 0,219 | 0,521 | 0,223 | 0,054 | 0,025 |
| 2 | 0,223 | 0,562 | 0,126 | 0,036 | 0,046 |
| 3 | 0,265 | 0,460 | 0,114 | 0,049 | 0,018 |
| 4 | 0,238 | 0,567 | 0,081 | 0,033 | 0,040 |
| Rerata | 0,236c ± 0,02 | 0,527d ± 0,04 | 0,136b ± 0,06 | 0,043a± 0,01 | 0,032a ± 0,01 |

Hasil rerata aktivitas enzim Lignin peroksidase (LiP) tercantum dalam tabel 1. Rerata kelima perlakuan berturut-turut yaitu P0 = 0,236 ± 0,02, P1 = 0,527 ± 0,04, P2 = 0,136± 0,06, P3 = 0,043± 0,01 dan P4 = 0,032 ± 0,01 menunjukkan hasil berbeda sangat nyata (P<0,01).

Untuk dapat memperjelas berikut digambarkan grafik aktifitas enzim LiP

Gambar 1. Grafik rerata aktivitas enzim LiP

Bila dilihat hasil penelitian yang telah dilaksanakan yaitu fermentasi dengan lama hari yang berbeda terlihat aktivitas enzim tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P1 = 0,527 ± 0,04 U/ml yaitu perlakuan fermentasi selama 7 hari.

 Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian Puspita (2007) menunjukkan bahwa jamur *Pleurotus* sp. 1 memiliki aktivitas enzim LiP tertinggi pada inkubasi hari ke-6 yaitu sebesar 0,430 U/ml. Aktivitas enzim LiP tertingi pada 7 hari disebabkan karena puncak dari pertumbuhan kapang terjadi pada hari yang ketujuh sehingga pelepasan enzim LiP juga mencapai titik yang tertinggi. Setelah tujuh hari pertumbuhan kapang cenderung stagnan bahkan cenderung menurun sehingga hal ini juga berefek pada aktivitas enzim LiP yang juga turun.

LiP merupakan katalis utama dalam proses ligninolisis oleh kapang karena mampu memecah unit non fenolik yang menyusun 90 persen struktur lignin (Srebotnik *et al.*, 1998). LiP mengkatalisis suatu oksidasi senyawa aromatic non fenolik lignin membentuk radikal kation aril. Disamping itu, karena LiP merupakan oksidan yang kuat maka enzim ini juga mempunyai kemampuan mengoksidasi senyawa fenolik, amina, eter aromatic dan senyawa aromatic polisiklik. Oksidasi substruktur lignin yang dikatalisis oleh LiP dimulai dengan pemisahan satu elektron cincin aromatik substrat donor dan menghasilkan radikal kation aril, yang kemudian mengalami berbagai reaksi postenzymatic.

1. **Mangan Peroksidase**

Tabel 2. Rerata aktivitas enzim Mangan Peroksidase

fermentasi kulit buah kakao (U/ml)

|  |  |
| --- | --- |
| Ulangan  | Perlakuan |
| P0 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 1 | 0,041 | 0,062 | 0,022 | 0,005 | 0,002 |
| 2 | 0,032 | 0,066 | 0,012 | 0,003 | 0,004 |
| 3 | 0,036 | 0,060 | 0,011 | 0,004 | 0,001 |
| 4 | 0,033 | 0,067 | 0,008 | 0,003 | 0,040 |
| Rerata | 0,035b ± 0,00 | 0,063c ± 0,00 | 0,013a ± 0,00 | 0,003a± 0,00 | 0,011a ± 0,01 |

Hasil rerata aktivitas enzim Mangan Peroksidase (MnP) tercantum dalam tabel 2. Rerata kelima perlakuan berturut-turut yaitu P0 = 0,035 ± 0,00, P1 = 0,063 ± 0,00, P2 = 0,013± 0,00, P3 = 0,003± 0,00 dan P4 = 0,011 ± 0,01 menunjukkan hasil berbeda sangat nyata (P<0,01).

Untuk dapat memperjelas berikut digambarkan grafik aktivitas enzim MnP

Gambar 2. Grafik rerata aktivitas enzim MnP

Bila dilihat hasil penelitian yang telah dilaksanakan yaitu fermentasi dengan lama hari yang berbeda terlihat aktifitas enzim MnP tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P1 = 0,063 ± 0,00 U/ml yaitu perlakuan fermentasi selama 7 hari.

 Aktifitas enzim MnP tertinggi pada 7 hari disebabkan karena puncak dari pertumbuhan kapang terjadi pada hari yang ketujuh sehingga pelepasan enzim LiP juga mencapai titik yang tertinggi. Setelah tujuh hari pertumbuhan kapang cenderung stagnan bahkan cenderung menurun sehingga hal ini juga berefek pada aktifitas enzim MnP yang juga turun.

Enzim MnP mengoksidasi Mn2+ menjadi Mn3+ dan H2O2 sebagai katalis untuk menghasilkan gugus peroksida (Camarero *et.al*., 1996). Mn3+ yang dihasilkan dapat berdifusi ke dalam substrat dan mengaktifkan proses oksidasi. Hal ini didukung pula oleh aktivitas kation radikal dari veratril alkohol dan enzim penghasil H2O2. Proses ini akan diakhiri dengan bergabungnya O2 ke dalam struktur lignin (de Jong *et.al*., 1994).

Menurut Pelczar dan Chan (2005) fungsi utama suatu enzim ialah mengurangi hambatan energi aktivasi pada suatu reaksi kimiawi. Enzim dikenal ada dua tipe yaitu enzim ekstraseluler dan intraseluler. Fungsi utama dari enzim ekstraseluler ialah melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel. Enzim intraselular mensintesis bahan seluler dan juga menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel.

1. **Kandungan lignin**

Tabel 3. Rerata Kandungan lignin fermentasi kulit buah kakao (%)

|  |  |
| --- | --- |
| Ulangan  | Perlakuan |
| P0 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 1 | 27,26 | 26,11 | 28,21 | 29,97 | 31,69 |
| 2 | 27,77 | 26,29 | 28,11 | 29,44 | 30,46 |
| 3 | 26,58 | 26,81 | 29,34 | 30,29 | 30,93 |
| 4 | 27,39 | 26,01 | 29,67 | 30,95 | 31,04 |
| Rerata | 27,25b ± 0,49 | 26,30a ± 0,35 | 28,83c ± 0,79 | 30,16d± 0,63 | 31,03e ± 0,50 |

Rerata kandungan lignin berturut-turut yaitu P0 = 27,25± 0,49%, P1 = 26,30± 0,35%, P2 = 28,83± 0,79%, P3 = 30,16± 0,63% dan P4 = 31,03± 0,50% menunjukkan hasil berbeda sangat nyata (P<0,01).

Untuk dapat memperjelas berikut digambarkan kandungan lignin fermentasi kulit buah kakao

Gambar 3. Grafik kandungan lignin

Bila dilihat hasil penelitian yang telah dilaksanakan yaitu fermentasi kulit buah kakao selama 7 hari terlihat sekali bahwa lignin pada P1 berbeda nyata lebih rendah dibandingkan dengan P0, P2, P3 maupun P4. Rendahnya kandungan lignin pada P1 bila dibandingkan dengan P0, P2, P3 maupun P4 karena pada perbedaan waktu fermentasi.

Fermentasi kulit buah kakao selama 7 hari memperlihatkan kandungan lignin yang paling rendah dikarenakan waktu fermentasi selama 7 hari merupakan puncak dari pertumbuhan kapang sehingga produksi enzim yang dihasilkan juga tinggi sehingga mempengaruhi degradasi lignin di dalam proses fermentasi kulit buaha kakao.

Lignin merupakan komponen dinding sel tanaman yang mengalami perkembangan setelah tanaman mengalami roses pendewasaan. Kulit buah kakao sebagai limbah tanaman tua telah mengalami lignifikasi tahap lanjut. Besaran dari kandungan lignin sangat dipengaruhi oleh lamanya fermentasi. Perubahan kandungan lignin pada substrat terjadi karena perombakan struktur lignin menjadi komponen yang lebih sederhana.

Kandungan lignin pada P1 yaitu 26,30± 0,35 menunjukkan paling rendah diantara perlakuan yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa penuruna kandungan lignin terjadi pada hari ketujuh fermentasi. Ini seperti pendapat dari Shi *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa sebagian besar degradasi lignin terjadi pada hari 4-10 setelah fermentasi. Gupte *et al.* (2007) juga melaporkan bahwa kehilangan lignin maksimum oleh Phanerochaete chrysosporium terjadi pada hari kesepuluh setelah inkubasi.

Kandungan lignin pada lama fermentasi berhubungan dengan produksi enzim ligninase. Jager *et al.* (1985) melaporkan bahwa produksi enzim ligninase tertinggi terjadi pada hari keenam setelah inokulasi. Degradasi lignin ini akan membuka jalan untuk perombakan selulosa dan hemiselulosa.

**KESIMPULAN**

 KBK yang diberi perlakuan fermentasi dengan lama waktu yang berbeda menunjukkan fermentasi selama 7 hari memberikan hasil yang terbaik. Fermentasi KBK selama 7 hari menunjukkan aktifitas enzim tertinggi LiP sebesar 0,527 ± 0,04 unit/ml dan MnP sebesar 0,063 ± 0,00 unit/ml. Fermentasi KBK selama 7 hari menunjukkan kandungan lignin terendah sebesar 26,30± 0,35%.

**DAFTAR PUSTAKA**

Camarero, S., B. Bockle, M.J. Martinez, & A.T. Martinez. 1996*.* Manganese mediated degradation by Pleurotus pulmonarius. *Appl. Environ. Microbiol*. 62:1070-1072

De Jong, J.A. Field, & J.A.M. de Bont. 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Reviews*. 13:153-188.

Gupte A., S. Gupte and H. Patek. 2007. Ligninolytic enzyme production under solid-state fermentation by white rot fungi. *J. Scient. Industr. Res.* 66:611-614.

Limura ,Y. P . Hartikainen , K . Tatsumi. 1996 . Dechlorinationof tetrachloroguaiacol by laccase of white rot basidiomycete *Coriolus versicolorAppl. Microbiol.* *Biotechnol.* 45 : 434-439

PaulEA. 1992. Organic Matter Decompositionn. Encyclopedia of Microbiology, Vol.3. Academic Press. Inc.

Pelczar MJJr, Chan ECS. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume ke-1. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology.*

Puastuti, W., D. Yulistiani dan Supriyati. 2009. Ransum berbasis kulit buah kakao diperkaya mineral : Tinjauan pada kecernaan dan fermentasi rumen *in vitro*. Prosiding. Seminar Nisional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 13-14 Agustus 2009. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor. Hal 442-448.

Puspita ID. 2007. Aktivitas enzim ligninase isolat *Pleurotus* spp. liar asal Bogor [skripsi]. Bogor: Departemen Silvikultur Fakultas Kehutanan IPB.

Srebotnik, E., K.A. Jensen, and K.E. Hammel. 1998. Cleavage of Nonphenolic Lignin Structure by Laccase in The Presence of 1-Hydroxibenzotriazole.

Shi J., R.R. Sharma-Shivappa and M.S. Chin. 2009. Microbial pretreatmen of cotton stalk by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium. Bioreour. Technol.* 100:4388-4395.

Srinivasan, C, T.M.D. Souza, K. Boominathan, and C.A. Reddy. 1995. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium. Apliedand Environmental Microbiology,* 61 (2): 4274-4277.

Tuomelo M., M. Vikman, A. Hatakka and Itavaara M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biosresour. Technol.* 72:169-183.

Nasrullah dan A. Ella, 1993. Limbah Pertanian dan Prospeknya Sebagai Sumber Pakan Ternak di Sulawesi Selatan. Makalah. Ujung Pandang

Jager A., S. Croan and T.K. Kirk. 1985. Production of ligninase and degradation of lignin in agitated submerged culutrues of *Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol.* 50:1274-1278.